

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 151**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07847829 .4**  
96 Fecha de presentación: **05.12.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2183599**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2010**

54 Título: **Inmunoensayos de alta sensibilidad y kits para la determinación de péptidos y proteínas de interés biológico**

30 Prioridad:  
**02.08.2007 EP 07380227**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.03.2012**

73 Titular/es:  
**ARACLON BIOTECH, S.L.**  
**PASEO DE LA INDEPENDENCIA, N 30, 2 A**  
**50004 ZARAGOZA, ES**

72 Inventor/es:  
**SARASA BARRIO, J Manuel**

74 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

ES 2 377 151 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

Inmunoensayos de alta sensibilidad y kits para la determinación de péptidos y proteínas de interés biológico.

**Campo técnico**

- 5 La invención se refiere al campo de los inmunoensayos que permite la detección de péptidos y proteínas en muestras y que proporcionan una sensibilidad mayor que los ensayos del estado de la técnica. La invención también se refiere a kits que proporcionan los componentes necesarios para llevar a cabo dichos inmunoensayos.

**Antecedentes de la invención**

- 10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad degenerativa progresiva del sistema nervioso central caracterizada por una pérdida de memoria progresiva y en aumento, seguida por la pérdida del control de las funciones corporales y de las extremidades y finalmente la muerte. Es con mucho la causa más común de demencia, afectando del 1 al 6% de la población de más de 65 años y entre el 10 y el 20% de la que tiene más de 80.

- 15 La EA se distingue de otros tipos de demencia por varias características patológicas, que incluyen la aparición progresiva en el cerebro de los pacientes de placas seniles en el espacio extracelular entre las neuronas. Las placas tienen núcleos centrales de depósitos de amiloide formados principalmente por fibrillas de un péptido de 40-42 aminoácidos denominado péptido  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) rodeado de neuritis degenerada y células de glía. Este péptido proviene del procesamiento proteolítico de una proteína precursora llamada proteína precursora de  $\beta$  amiloide ( $\beta$ APP). La  $\beta$ APP se encuentra en el organismo como diferentes isoformas derivadas del corte y empalme alternativo del transcrito primario del gen que codifica para  $\beta$ APP. Estas isoformas son principalmente  $\beta$ APP-695,  $\beta$ APP-751 y  $\beta$ APP-770, en las que las cifras se refieren al número de aminoácidos. El gen de  $\beta$ APP se encuentra en los seres humanos en el cromosoma 21, cuya trisomía (síndrome de Down) da como resultado la sobreexpresión de la proteína y la aparición temprana de placas amiloides en el cerebro de los pacientes (Selkoe D.J. (2001) *Physiol. Rev.* 81, 741-766).  $\beta$ APP es una proteína transmembrana que puede procesarse por distintas enzimas proteolíticas (secretasas) para dar lugar a diferentes productos. Normalmente,  $\beta$ APP se somete a escisión por la  $\alpha$  secretasa en su región extracelular para generar un fragmento secretado largo y soluble y un fragmento más corto anclado a la membrana llamado C83, que se escinde adicionalmente por la  $\gamma$ -secretasa para producir el péptido p3 ( $p3_{40}$  o  $p3_{42}$ ) y un péptido 57 ó 59 que se degrada adicionalmente por otras proteasas. Cuando  $\beta$ -secretasa escinde la  $\beta$ APP, da como resultado un fragmento secretado soluble ( $s\beta$ APP- $\beta$ ) y un fragmento C99 que puede escindirse por la  $\gamma$ -secretasa para producir el péptido amiloide  $A\beta$  y un péptido de 57 ó 59 aminoácidos anclado en la membrana (Selkoe D.J. (2001) *Physiol. Rev.* 81, 741-766).

- 25 La EA puede clasificarse según la edad de aparición como de inicio temprano (edad menor de 60 años) y de inicio tardío (edad de más de 60 años), según la existencia de una herencia autosómica dominante, como EA familiar o EA esporádica. El inicio temprano de las formas familiares de la EA puede asociarse a mutaciones conocidas en los genes que codifican para la  $\beta$ APP, presenilina 1 y presenilina 2 (ubicados, respectivamente, en los cromosomas 21, 14 y 2). Estas clasificaciones no son mutuamente excluyentes. Las formas más frecuentes son formas esporádicas de inicio tardío.

- 40 En la práctica clínica, el diagnóstico de la EA se lleva a cabo usando criterios clínicos basados en la presencia de marcas clínicas típicas y en la exclusión de otros tipos de demencia usando técnicas de obtención de neuroimagen y análisis de sangre. Usando estos criterios, la fiabilidad del diagnóstico es aceptable aunque, según estudios realizados usando autopsia de cerebro, entre el 10-20% de los pacientes diagnosticados con EA padecían una enfermedad diferente. Además, los métodos de diagnóstico actuales sólo pueden llevarse a cabo cuando el proceso neurodegenerativo está tan avanzado que el paciente padece demencia grave y los daños cerebrales son tan extensos que el número de medidas terapéuticas está limitado. El diagnóstico definitivo requiere el examen patológico de tejido cerebral cadavérico.

- 45 Por tanto, existe una necesidad de identificar marcadores biológicos para el diagnóstico temprano de la EA que sean sensibles y específicos y que permitan distinguir el deterioro cognitivo debido a la edad de los asociados con los primeros síntomas del proceso, así como para distinguir cambio debidos a la EA y debidos a otros estados degenerativos. Según Growdon *et al.*, (*Neurobiol. Aging* 1998, 19: 109-116), el marcador ideal para la EA debe satisfacer los siguientes requisitos:

- 50 - Debe detectar una característica fundamental de la neuropatología
- Debe estar validado en casos de la enfermedad confirmados neuropatológicamente
  - Debe mostrar un sensibilidad de al menos el 80% para detectar la EA
  - Debe mostrar una especificidad de al menos el 80% para distinguir la EA de otros tipos de demencia y
  - Debe ser fiable, reproducible, no invasivo, sencillo de realizar y económico.

En el estado de la técnica se conocen métodos para diagnosticar la EA detectando los niveles de marcadores biológicos presentes en el cerebro o el LCR de pacientes. Se han caracterizado diferentes marcadores biológicos cuya determinación se lleva a cabo en LCR. El LCR refleja directamente la composición del espacio extracelular del sistema nervioso central y por tanto, proporciona concentraciones más altas como marcadores biológicos. Sin embargo, el LCR solo se puede recuperar mediante punción lumbar, que no es un método de diagnóstico rutinario aceptado fácilmente por los pacientes que padecen demencia, por no mencionar los pacientes con trastornos de memoria. Por tanto, hay una necesidad de marcadores biológicos de EA que puedan detectarse en muestras que puedan recuperarse de forma no invasiva del cuerpo.

Los marcadores biológicos adecuados para la EA descritos en el estado de la técnica y que pueden detectarse en plasma incluyen (i) marcadores derivados de la placa amiloide, (ii) autoanticuerpos contra A $\beta$  o  $\beta$ APP, (iii) marcadores inflamatorios tales como IL-6, su receptor o gp130, la proteína C reactiva o moléculas del estrés oxidativo (isoprostanos), (iv) marcadores del metabolismo lipídico (apoE, oxisteroles) y (v) marcadores de enfermedad vascular (homocisteína, lipoproteína b Clq) (Scheuner D *et al.* (1996) Nature Med 2, 864-870).

Sin embargo, en vista del hecho que A $\beta$  se acumula en el cerebro de pacientes con EA y es un elemento central en la patogenia de la EA, esta proteína se ha considerado como el candidato más adecuado como marcador biológico de la EA. Sin embargo, el uso de A $\beta$  como marcador biológico en plasma para la EA se enfrenta al problema de que las concentraciones de los péptidos A $\beta$  (A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42)) en suero son extremadamente bajas, de modo que no hay ensayos que sean lo suficientemente sensibles para permitir una detección fiable de dichas especies de péptidos.

Scheuner *et al.* (Nature Med., 1996, 2: 864-870) realizaron un estudio preliminar para detectar si las concentraciones extracelulares de presenilina-1, presenilina-2 o  $\beta$ APP estaban aumentadas en pacientes de familias que portaban mutaciones asociadas a la EA familiar. Aunque se observaron niveles elevados de A $\beta$ 1-42(43) en el plasma de sujetos con mutaciones PS1 (P<0,0001), PS2<sub>N141I</sub> (P=0,009), APP<sub>K670N, M671L</sub> (P<0,0001), y APP<sub>V717I</sub> (un sujeto) relacionadas con EAF (enfermedad de Alzheimer familiar), estos estudios no se validaron para analizar la EA esporádica, en la que las concentraciones de los péptidos A $\beta$  en suero son mucho más bajas. El kit de ensayo usado en este documento es el ensayo de ELISA de tipo *sándwich* descrito previamente por Suzuki, N. *et al.* (Science, 1994, 264: 1336-1340), que usa un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección conjugado con peroxidasa.

Se ha sugerido que no hay correlación entre los niveles de A $\beta$  y la EA esporádica. De acuerdo con esto, Tamaoka, A *et al.* (J. Neurol. Sci., 1996, 141: 65-68) midieron los niveles de A $\beta$  en el plasma de 28 pacientes con EA esporádica, 40 pacientes con procesos neurológicos diferentes con demencia y 40 controles sanos. Los autores concluyeron que los niveles en plasma de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 son similares en los sujetos control y los pacientes que padecen EA esporádica. Resultados similares se obtuvieron por Kosaka *et al.* (Neurology, (1997) 48, 741-745). El ensayo usado por Tamaoka y colaboradores se ha caracterizado adicionalmente en el documento WO200722015 para la medición en plasma de A $\beta$ 1-40. El ensayo es un ensayo de ELISA de tipo *sándwich* en el que los péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 se capturan en un soporte sólido usando el anticuerpo monoclonal (Acm) 1A10 y se detectan usando el Acm 14F1 conjugado con peroxidasa. Este ensayo proporciona un nivel de sensibilidad en el intervalo de un solo dígito pg/ml.

Vanderstichele H. *et al.* (Amyloid, 2000, 7, 245-258) determinaron los niveles de A $\beta$ (1-42) en LCR, plasma y orina de 12 controles sanos, 39 pacientes con EA y 6 pacientes que padecían demencia con cuerpos de Lewy, 10 pacientes con otros tipos de demencia y 9 pacientes con otras patologías neurológicas que no mostraban demencia, pero no se pudo observar correlación entre los niveles de A $\beta$ (1-42) y el diagnóstico, el sexo o los resultados de MEC. Para estos estudios, se utilizó la prueba INNOTEST  $\beta$ -amiloide(1-42) basada en un ensayo de ELISA de tipo *sándwich* en el que el A $\beta$ (1-42) se capturó en un soporte sólido usando el Acm 21F12 que reconoce la región N-terminal de A $\beta$ (1-42) y se detectó usando el Acm biotinilado 3D6 que reconoce la región C-terminal de A $\beta$ (1-42) y estreptavidina acoplada a HRP.

Fukamoto *et al.* (Arch. Neurol. 2003, 60, 958-964) estudiaron la correlación de los niveles en plasma de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 con respecto a diferentes variables clínicas, demográficas y genéticas en 146 pacientes con EA, 37 pacientes con deterioro cognitivo leve y 96 pacientes con enfermedad de Parkinson. Los resultados indicaron que hay un aumento significativo con la edad pero que no hay diferencias con respecto al diagnóstico, la historia familiar, el genotipo de ApoE o el tratamiento con diferentes fármacos tales como inhibidor de la acetilcolinesterasa o estatinas. Las mediciones se realizaron usando un ensayo de ELISA de tipo *sándwich* usando el Acm que reconoce los aminoácidos 11 a 28 de A $\beta$  (BNT77) y Acm acoplados a HRP que reconocen específicamente A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 (Acm BA27 y BC05).

Mehta *et al.*, (Arch. Neurol. 57, 2000, 100-105) midieron los niveles en plasma y LCR de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en 78 pacientes con EA y 61 controles sanos y observaron que los niveles en plasma de A $\beta$ 40 son más altos en pacientes con EA con un alelo de ApoE4 que en el grupo control sin dicho alelo, que los niveles de A $\beta$ 42 son similares entre pacientes con EA y controles y que no había ninguna diferencia con respecto al sexo o a la puntuación en el minexamen cognoscitivo (MEC). Las mediciones se realizaron usando un ensayo de ELISA de tipo *sándwich* que usó el Acm anti-A $\beta$  6E10 como anticuerpo de captura y un antisuero biotinilado producido contra péptidos específicos para A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40.

- 5 Mayeux R. *et al.* (Ann Neurol. 1999, 46, 412-416) midieron los niveles en plasma de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en una cohorte de sujetos (530) y 18 meses después (307 sujetos) usando el mismo ensayo de ELISA que Mehta *et al.* (Arch. Neurol. 57, 2000, 100-105). Observaron que los sujetos que desarrollaban EA tenían niveles de A $\beta$ 42 más altos que los que no desarrollaban EA durante el estudio. Los niveles de A $\beta$ 42 descendieron tras tres años de un diagnóstico establecido de EA. No se observaron diferencias con respecto al fenotipo de EA.
- 10 Lanz, T.A y Schachter, J.B. (J. Neuroscence Methods, 2006, 157: 71-81) describen un ensayo de ELISA de tipo *sándwich* colorimétrico y fluorimétrico para detectar o bien el contenido total de péptidos A $\beta$  o bien las cantidades individuales de los péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42. Para detectar la cantidad total de péptidos A $\beta$ , se usa el Acm 6E10 para la captura de los péptidos A $\beta$  y después se detectan usando 4G8 biotinilado y estreptavidina conjugada con europio o estreptavidina-HRP. Para detectar la cantidad de los péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, se usa el Acm 6E10 como anticuerpo de captura y anticuerpos policlonales de conejo biotinilados específicos para cada uno de los fragmentos seguido por o bien estreptavidina conjugada con europio o bien estreptavidina-HRP. Sin embargo, este método proporcionó el límite de detección más bajo de 10 pg/ml y sólo se utilizó para medir A $\beta$  en extractos de cerebro.
- 15 El documento WO200750359 describe un inmunoensayo para detectar formas multiméricas de A $\beta$ 42 lo que implica capturar los péptidos derivados de A $\beta$ 42 usando anticuerpos policlonales específicos para dichas formas multiméricas y detectar la cantidad de péptidos unidos usando un Acm y un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP. Sin embargo, este ensayo proporciona un límite de detección de 1000-3000 pM, que corresponde a 4000 pg/ml.
- 20 El documento WO0162801 describe un ensayo de ELISA de tipo *sándwich* para determinar A $\beta$  que usa el Acm 3D6 anti-extremo N-terminal como anticuerpo de recubrimiento y un Acm que reconoce los aminoácidos 15 a 24 de A $\beta$  maduro para la detección, pero sólo se usa para medir valores de concentración de A $\beta$  en el intervalo de 100 a 200 pg/ml.
- 25 El documento WO0315617 describe un ensayo de ELISA para medir A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en plasma que usa un anticuerpo que reconoce los aminoácidos 13 a 28 de los péptidos A $\beta$  maduros pero sólo es capaz de detectar concentraciones de dichos péptidos en el intervalo de 250-400 pg/ml y por tanto, sólo es adecuado para medir A $\beta$  en plasma con EA familiar.
- 30 El documento WO0246237 describe un ensayo de ELISA de tipo *sándwich* para medir las especies de A $\beta$  total (A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42) en homogeneizado de cerebro que usa un Acm específico para los aminoácidos 13 a 28 de A $\beta$ 42 como anticuerpo de captura y el Acm 3D6 biotinilado específico para la región N-terminal del péptido A $\beta$ 42 seguido por estreptavidina conjugada con peroxidasa. Este documento también describe un ensayo de ELISA de tipo *sándwich* específico para A $\beta$ 42 que usa el Acm 21F12 específico para los aminoácidos 33-42 de A $\beta$ 42 como anticuerpos de captura y el Acm 3D6 biotinilado como anticuerpo de detección. Sin embargo, estos ensayos tienen niveles de sensibilidad más bajos de 50 ng/ml para el ensayo de A $\beta$  total y de 125 mg/ml para el ensayo específico de A $\beta$ 42, lo que los hace inadecuados para medir el A $\beta$  total o el A $\beta$ 42 en plasma o en suero.
- 35 El documento WO413172 describe un ensayo de ELISA de tipo *sándwich* para medir  $\beta$ -amiloide(1-42) en extractos de cerebro en ácido fórmico y LCR usando el Acm 3D6 como anticuerpo de detección y anticuerpos policlonales específicos para diferentes regiones de los péptidos A $\beta$  maduros como anticuerpo de captura.
- 40 Sin embargo, todos los ensayos basados en ELISA conocidos hasta la fecha tienen un límite de detección inferior que está en el intervalo de un único dígito pg/ml como mucho, que es suficiente para detectar A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en LCR así como para detectar dichas especies en plasma en pacientes que padecen EA familiar, pero que son inadecuados para detectar A $\beta$ 42 en plasma de pacientes que padecen EA esporádica, en los que la concentración en plasma de A $\beta$ 42 es mucho más baja. En particular, el ensayo INNOTEST  $\beta$ -amiloide(1-42) tiene un límite de detección inferior de 20 pg/ml, lo que permite la detección de A $\beta$ 42 en LCR así como las mediciones en plasma en pacientes con EA familiar, pero no es lo suficientemente sensible para detectar A $\beta$ 42 en pacientes que padecen EA
- 45 esporádica que muestran unos niveles de A $\beta$ 42 en plasma mucho más bajos. Este kit sólo se recomienda para medir niveles de péptido A $\beta$  en LCR. Esta recomendación ha sido además validada por un estudio reciente usando el INNOTEST  $\beta$ -amiloide(1-42) en el que se ha demostrado que los niveles de péptido en LCR son entre 100 y 1000 veces más altos que en plasma (Lewczuk, P *et al.* (2004) Neurobiol. Aging 25, 273-281).
- 50 Otros kits comerciales son los kit Biosource  $\beta$  amiloide(1-40) y  $\beta$ -amiloide(1-42). Estos kits proporcionan un ensayo de ELISA de tipo *sándwich* en el que los péptidos se capturan en el soporte usando un Acm dirigido contra el extremo amino terminal del péptido maduro y se detectan usando un anticuerpo policlonal de conejo que reacciona con la región C-terminal de los péptidos  $\beta$  maduros y anticuerpo anti-IgG de conejo-peroxidasa. Este kit tiene sensibilidad, según el fabricante, de menos de 10 pg/ml, pero se usa para detectar concentraciones de A $\beta$  de entre 15,6 y 1000 pg/ml. Los kits de Biosource están recomendados por los fabricantes para la detección de péptidos A $\beta$
- 55 en suero, LCR y cultivos celulares. Sin embargo, los niveles promedio de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en suero en pacientes con EA esporádica están por debajo del límite de sensibilidad inferior de los ensayos de modo que no parece posible usarlos para medidas en suero.

5 La solicitud de patente canadiense (CA2585148), que corresponde a la solicitud de patente internacional WO200646644, describe el único ensayo de péptido A $\beta$  que muestra un límite de detección inferior de 0,5 pg/ml. El ensayo usado en este documento es un ensayo de tipo *sándwich* de electroquimioluminiscencia (ECL) en el que el Acm 21F12 (que reconoce los aminoácidos 32-42 de A $\beta$ 42) está unido a perlas magnéticas, que se usan luego para capturar el péptido A $\beta$ 42 en la muestra que contiene A $\beta$ 42 y que está en contacto además con el Acm 3D6 acoplado a un complejo de rutenio. La cantidad de anticuerpo 3D6 unido se detecta entonces mediante la luminiscencia emitida por el complejo de rutenio cuando se aplica energía eléctrica. Usando este ensayo, los inventores pueden detectar tan solo 0,5 pg/ml de un patrón de A $\beta$ 42. Sin embargo, cuando se usa el mismo ensayo para comparar A $\beta$ 42 en muestras de plasma de pacientes con EA y controles sanos, no pudieron observarse diferencias significativas entre los dos conjuntos de pacientes, lo que llevó a los inventores a concluir que la cantidad de A $\beta$ 42 intacto en suero es muy baja debido a la degradación y a cambiar a un ensayo de ELISA competitivo usando el Acm 21F12 que proporciona niveles de sensibilidad menores en el intervalo de ng/ml.

10 El documento EP 1 491 889 da a conocer: un kit para la detección de un polipéptido diana seleccionado del grupo de A42 (A $\beta$ 42), A40 (A $\beta$ 40) y una mezcla de los mismos que comprende:

15 (i) un primer anticuerpo (el anticuerpo de captura) o combinación de anticuerpos que reconocen dicho polipéptido diana (las sustancias de unión que son anticuerpos),

(ii) un segundo anticuerpo (el anticuerpo indicador) o combinación de anticuerpos que reconocen una región diferente del polipéptido diana de la región reconocida por el primer anticuerpo o combinación de anticuerpos (las sustancias de unión que son anticuerpos),

20 (iii) un reactivo (tal como, por ejemplo, otro "anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de conejo)") que muestra afinidad por el segundo anticuerpo y estando acoplado el reactivo al primer miembro de un par de unión (los anticuerpos anti-conejo que reconoce el anticuerpo de conejo) y

(iv) un segundo miembro del par de unión, tal como un marcador detectable o una enzima (fosfatasa). El documento 25 1 491 889 da a conocer adicionalmente que el sistema puede incluir además un sustrato para el marcador enzimático.

Por tanto, existe una necesidad en la técnica de ensayos inmunológicos y kits mejorados para detectar péptidos derivados de A $\beta$  que superen los problemas de los métodos y kits conocidos en la técnica, en particular, que sean suficientemente sensibles para detectar péptidos A $\beta$  de una forma fiable en plasma de pacientes que padecen EA esporádica.

### 30 **SUMARIO DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la invención se refiere a un kit para la detección de un polipéptido diana seleccionado del grupo de A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 y una mezcla de los mismos que comprende

35 (i) un primer anticuerpo o combinación de anticuerpos que reconocen dicho polipéptido diana en el que el primer anticuerpo se dirige contra un epítipo ubicado dentro de los aminoácidos 1 a 16 de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, en el que el primer anticuerpo está previamente unido a un soporte sólido;

(ii) un segundo anticuerpo o combinación de anticuerpos que reconocen una región diferente del polipéptido diana de la región reconocida por el primer anticuerpo o combinación de anticuerpos

(iii) un reactivo que muestra afinidad por el segundo anticuerpo, estando acoplado dicho reactivo a un primer miembro de un par de unión y

40 (iv) un segundo miembro de un par de unión acoplado a un marcador fluorescente, luminiscente o enzimático,

en el que el par de unión se selecciona del grupo que consiste en:

hapteno y anticuerpo;

antígeno y anticuerpo;

biotina y avidina;

45 biotina y estreptavidina;

un análogo de biotina y avidina;

un análogo de biotina y estreptavidina;

azúcar y lectina;

enzima y cofactor;

ácido nucleico y ácido nucleico complementario y

análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario.

5 En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso del kit de la invención para determinar o detectar el polipéptido diana en una muestra, así como para el diagnóstico de un trastorno neurodegenerativo en un sujeto.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para determinar o detectar la cantidad de un polipéptido diana seleccionado del grupo de A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 y la mezcla de los mismos en una muestra que comprende las etapas de

10 (i) capturar el polipéptido diana presente en la muestra con un primer anticuerpo o combinación de anticuerpos que se unen específicamente a dicho polipéptido diana, en el que el primer anticuerpo se dirige contra un epítipo ubicado dentro de los aminoácidos 1 a 16 de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, en el que el primer anticuerpo se ha inmovilizado previamente en un soporte sólido,

15 (ii) poner en contacto los complejos inmunitarios formados en la etapa (a) con un segundo anticuerpo o combinación de anticuerpos que reconocen una región del polipéptido diana que es diferente de la región que reconoce el primer anticuerpo o combinación de anticuerpos,

(iii) poner en contacto los complejos formados en la etapa (ii) con un reactivo que muestra afinidad por el segundo anticuerpo y que está acoplado a un primer miembro de un par de unión,

(iv) poner en contacto los complejos formados en la etapa (iii) con un segundo miembro de un par de unión que está acoplado a un marcador fluorescente, luminiscente o enzimático y

20 (v) detectar o determinar la actividad o cantidad del marcador unido al segundo miembro del par de unión,

en el que el par de unión se selecciona del grupo que consiste en:

hapteno y anticuerpo;

antígeno y anticuerpo;

biotina y avidina;

25 biotina y estreptavidina;

un análogo de biotina y avidina;

un análogo de biotina y estreptavidina;

azúcar y lectina;

enzima y cofactor;

30 ácido nucleico y ácido nucleico complementario y

análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario.

35 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método para diagnosticar un trastorno degenerativo en un sujeto que comprende determinar la cantidad de A $\beta$ 40 o A $\beta$ 42 en una muestra de un paciente usando un método según la invención y correlacionar la concentración de uno o ambos péptidos en la muestra de dicho sujeto con respecto a la concentración de dicho péptido o péptidos en una muestra de un individuo sano con la aparición del trastorno degenerativo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 La figura 1 muestra una curva de titulación patrón del ensayo de ELISA de tipo *sándwich* en la que se representan los valores de absorbancia a 450 nm frente a concentraciones conocidas de preparaciones patrón de A $\beta$ 40 (en pg/ml).

La figura 2 muestra una curva de titulación patrón del ensayo de ELISA de tipo *sándwich* en la que se representan los valores de absorbancia a 450 nm frente a concentraciones conocidas de preparaciones patrón de A $\beta$ 42 (en pg/ml).

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

- Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que usando un kit que tiene los componentes tal como se define en la reivindicación 1, es posible determinar los niveles de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 con un límite de detección inferior de menos de 0,1 pg/ml. Este kit permite una cuantificación fiable de dichas especies moleculares en cualquier muestra de cualquier sujeto y, en particular, en el plasma de sujetos que se sospecha que padecen EA esporádica, en los que las concentraciones en plasma son tan bajas que hasta la fecha no han sido posibles mediciones fiables.
- En consecuencia, en un primer aspecto, la invención se refiere a un kit para la detección de un polipéptido diana seleccionado del grupo de A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 y una mezcla de los mismos que comprende
- (i) un primer anticuerpo o combinación de anticuerpos que reconocen dicho polipéptido diana en el que el primer anticuerpo se dirige contra un epítipo ubicado dentro de los aminoácidos 1 a 16 de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42; en el que el primer anticuerpo está previamente unido a un soporte sólido;
- (ii) un segundo anticuerpo o combinación de anticuerpos que reconocen una región diferente del polipéptido diana de la región reconocida por el primer anticuerpo o combinación de anticuerpos
- (iii) un reactivo que muestra afinidad por el segundo anticuerpo, estando acoplado dicho reactivo a un primer miembro de un par de unión y
- (iv) un segundo miembro de un par de unión acoplado a un marcador fluorescente, luminiscente o enzimático, en el que el par de unión se selecciona del grupo que consiste en:
- hapteno y anticuerpo;
- antígeno y anticuerpo;
- biotina y avidina;
- biotina y estreptavidina;
- un análogo de biotina y avidina;
- un análogo de biotina y estreptavidina;
- azúcar y lectina;
- enzima y cofactor;
- ácido nucleico y ácido nucleico complementario y
- análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario.
- Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que el aumento en la sensibilidad se debe al uso del reactivo (iii) que permite que se amplifique la señal que resulta del anticuerpo de detección.
- “A $\beta$ 42”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido de 42 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 672 a 713 (SEQ ID NO: 4) y que se produce mediante la escisión proteolítica secuencial de la proteína precursora de amiloide (SEQ ID NO: 6) por las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$ .
- “A $\beta$ 40”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido de 40 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 672 a 711 (SEQ ID NO: 5) y que se produce mediante la escisión proteolítica secuencial de la proteína precursora de amiloide (SEQ ID NO: 6) por las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$ .
- En el contexto de la presente invención, el primer anticuerpo se denominará “anticuerpo de captura”, lo que significa que este anticuerpo se usa para recuperar de una muestra todas las especies moleculares a las que se une específicamente el anticuerpo. No hay prácticamente limitación con respecto al tipo de anticuerpo que puede usarse como anticuerpo de captura siempre que contenga al menos un sitio de unión al antígeno específico para A $\beta$ 40 y/o A $\beta$ 42. Por tanto, las moléculas de anticuerpos adecuadas para su uso como anticuerpo de captura incluyen
- anticuerpos “íntactos” que comprenden una región variable de unión al antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3,
  - fragmentos “Fab” que resultan de la digestión con papaína de un anticuerpo íntacto y que comprenden un único sitio de unión al antígeno y una región CL y una CH1,
  - fragmentos “F(ab')<sub>2</sub>” que resultan de la digestión con pepsina de un anticuerpo íntacto y que contienen dos sitios

de unión al antígeno,

- fragmentos “Fab’” que contienen el dominio constante de cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de cadena pesada y únicamente tiene un sitio de unión al antígeno. Los fragmentos Fab’ se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo,
- “Fv” es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación estrecha, no covalente. En esta configuración, las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad en la unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.
- Fv de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpo “scFv” comprenden los dominios de anticuerpo VL y VH, estando presentes estos dominios en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, las regiones VL y VH están conectadas por un ligador polipeptídico que permite a scFv formar estructuras deseadas para la unión al antígeno.
- Los “diacuerpos” comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL) conectados mediante un ligador peptídico que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto fuerza el emparejamiento con los dominios complementarios de otra cadena y potencia el ensamblaje de una molécula dimerica con dos sitios de unión al antígeno funcionales.
- Los “anticuerpos biespecíficos” (BAb) son anticuerpos individuales, divalentes (o fragmentos eficaces en inmunoterapia de los mismos) que tienen dos sitios de unión al antígeno específicos de manera diferente. Los dos sitios de antígeno pueden estar acoplados entre sí químicamente o mediante métodos de ingeniería genética conocidos en la técnica.

Todos estos fragmentos de anticuerpos se pueden modificar adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando delección(es), inserción(es), sustitución(es), adición(es) de aminoácidos y/o recombinación(es) y/o cualquier otra modificación(es) (por ejemplo, modificaciones postraduccionales o químicas, tales como glicosidación y fosforilación) conocidas en la técnica, solas o en combinación. Los métodos para introducir tales modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina los conoce bien el experto en la técnica; véase, por ejemplo Sambrook *et al.*; Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición 1989 y 3ª edición 2001.

Los anticuerpos adecuados como anticuerpos de captura incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales. Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar diversos huéspedes incluyendo cabras, conejos, ratas, ratones, camellos, dromedarios, llamas, seres humanos, aves y otros mediante inyección con un péptido correspondiente a un fragmento de Aβ40 o Aβ42 que tiene propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie del huésped, pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen, pero sin limitarse a, de Freund, geles minerales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolectina, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, KLH y dinitrofenol. Entre los adyuvantes usados en seres humanos son especialmente preferidos el BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Si el antígeno es un péptido, puede ser útil que se conjugue con una proteína que sea inmunogénica en la especie que va a inmunizarse. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa californiana (KLH), Blue Carrier (hemocianina aislada de *Concholepas concholepas*), tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, éster de maleimidobenzóilsulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico o SOCl<sub>2</sub>.

Para la producción de anticuerpos monoclonales, pueden usarse técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales usando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975) usando el procedimiento descrito en detalle en las unidades 11.4 a 11.11 de Ausubel, F.M. *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc.; edición en anillas, 2003). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales pueden aislarse mediante procedimientos de ADN recombinante de bibliotecas de anticuerpos de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (en el intervalo nM) mediante intercambio de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como por infección combinatoria y recombinación in vivo como estrategia para construir bibliotecas muy grandes de fagos (Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos policlonales pueden usarse directamente como un antisuero obtenido de huéspedes inmunizados tras la extracción de sangre y la retirada de coágulos de fibrina. Los anticuerpos monoclonales pueden usarse directamente como sobrenadante del cultivo de hibridoma o como líquido ascítico tras la implantación del hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped adecuado. Alternativamente, las moléculas de inmunoglobulinas, ya sean policlonales o monoclonales, pueden purificarse antes de su uso mediante medios convencionales tales como purificación por afinidad usando péptidos derivados de Aβ40 o Aβ42, purificación en gel no desnaturizante, HPLC o RP-HPLC, exclusión molecular, purificación en una columna de proteína A, o cualquier combinación de estas técnicas.

En una realización preferida, los anticuerpos de captura reconocen una región común a Aβ40 y Aβ42, de modo que permiten la captura simultánea de ambas especies con una sola especie de anticuerpo. En principio, puede usarse como anticuerpo de captura cualquier anticuerpo específico para una región común a las secuencias tanto de Aβ40 como de Aβ42. Los epítomos preferidos que pueden ser dianas del anticuerpo de captura incluyen epítomos ubicados en los aminoácidos 1 a 16, 1 a 17, 13 a 28, 15 a 24, 1 a 5 y 1 a 11 de Aβ40 y Aβ42. En una realización más preferida, el anticuerpo de captura se dirige contra una región en Aβ40 y/o Aβ42 que es diferente de la región C-terminal. En una realización aún más preferida, el anticuerpo de captura se dirige contra un epítomo de la región N-terminal de los péptidos Aβ40 y Aβ42. En otra realización preferida, el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal. En otra realización aún más preferida, el anticuerpo de captura reconoce una región correspondiente a los aminoácidos 1-16 de los péptidos Aβ. En una realización aún más preferida, el anticuerpo monoclonal usado como anticuerpo de captura es el Acm 6E10 según se ha descrito en Kim, K.S. (Neuroscience Res. Comm. 1988, 2: 121-130).

El segundo componente del kit de la invención corresponde a un anticuerpo o combinación de anticuerpos que reconocen una región diferente del polipéptido diana que la región reconocida por el primer anticuerpo o combinación de anticuerpos. En el contexto de la presente invención, el segundo anticuerpo se denominará "anticuerpo de detección", ya que este anticuerpo se usará para detectar la cantidad de antígeno que se ha retenido por el anticuerpo de captura.

Como con el anticuerpo de captura, no hay prácticamente limitación con respecto al tipo de anticuerpo que puede usarse como anticuerpo de detección. Sin embargo, el experto en la técnica entenderá también que el anticuerpo de detección (i) debe unirse a una región del antígeno no cubierta por el anticuerpo de captura y (ii) debe contener no sólo el sitio de unión al antígeno sino también una región o regiones adicionales que pueden detectarse específicamente por un reactivo que muestra unión de alta afinidad para dicho anticuerpo, para permitir la detección del anticuerpo que está unido al antígeno capturado por el anticuerpo de captura. Preferiblemente, dichas regiones adicionales que pueden unirse específicamente por dicho reactivo corresponden a la región constante de la molécula de inmunoglobulina.

Anticuerpos de detección adecuados incluyen anticuerpos intactos, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab' y Fv, anticuerpos Fv de cadena sencilla, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos y similares, siendo estos compuestos tal como se definieron previamente. De manera similar al caso del anticuerpo de captura, el anticuerpo de detección puede ser policlonal o monoclonal, nativo o modificado postraduccionalmente y puro o enriquecidos en moléculas de unión al antígeno, usando los mismos procedimientos que se han descrito para los anticuerpos de captura. El experto en la técnica apreciará que, para usar el anticuerpo de detección, debe diluirse hasta una concentración de trabajo adecuada y que dicha dilución puede determinarse de manera rutinaria para cada lote de anticuerpo. Además, será evidente que una dilución de trabajo adecuada será diferente dependiendo de si se usan los antisueros o más bien una fracción de IgG purificada. Diluciones típicas son 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/4000, 1/5000, 1/6000, 1/7000, 1/8000, 1/9000, 1/10000 y similares.

En una realización preferida, los anticuerpos de detección comprenden cualquier anticuerpo policlonal seleccionado del grupo de

(i) un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido Aβ42 que se une específicamente a Aβ42 sin producir reacción cruzada sustancial con Aβ40 o Aβ43

(ii) un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido Aβ40 que se une específicamente a Aβ40 sin producir reacción cruzada sustancial con Aβ42, Aβ39, Aβ38, Aβ41 o Aβ43

(iii) un anticuerpo que reconoce simultáneamente la región C-terminal de Aβ40 y Aβ42 o

(iv) una combinación de los anticuerpos de (i) y (ii).

En una realización más preferida, el péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido Aβ42 usado para preparar el anticuerpo específico para Aβ42 es un péptido según se define en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, el péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido Aβ40 usado para preparar el anticuerpo específico para Aβ40 es un péptido según se define en SEQ ID NO: 3. Anticuerpos específicos para Aβ40 y Aβ42 y los métodos para su preparación se han descrito en detalle en los documentos WO2004024770 y

WO2004098631, cuyos contenidos se incorporan al presente documento como referencia.

El experto en la técnica entenderá que puede usarse el método para detectar A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 o ambas especies simultáneamente dependiendo del tipo de anticuerpos de captura y detección usados en el método.

5 Para detectar o determinar específicamente A $\beta$ 40, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo que reconoce la región N-terminal de A $\beta$ 40 (y también la de A $\beta$ 42, ya que ambos péptidos tienen regiones N-terminales idénticas) y el anticuerpo de detección puede ser un anticuerpo que reconoce específicamente la región C-terminal de A $\beta$ 40 sin producir reacción cruzada con A $\beta$ 42. Alternativamente, puede detectarse específicamente A $\beta$ 40 usando un anticuerpo de captura que reconoce la región C-terminal de A $\beta$ 40 sin producir reacción cruzada con A $\beta$ 42 y un anticuerpo de detección que reconoce una región de A $\beta$ 40 que es común a A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, preferiblemente la región N-terminal de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40.

10 Para detectar o determinar específicamente A $\beta$ 42, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo que reconoce la región N-terminal de A $\beta$ 42 (y también la de A $\beta$ 40, ya que ambos péptidos tienen regiones N-terminales idénticas) y el anticuerpo de detección puede ser un anticuerpo que reconoce específicamente la región C-terminal de A $\beta$ 42 sin producir reacción cruzada con A $\beta$ 40. Alternativamente, puede detectarse específicamente A $\beta$ 42 usando un anticuerpo de captura que reconoce la región C-terminal de A $\beta$ 42 y un anticuerpo de detección que reconoce una región de A $\beta$ 42 que es común a A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40.

15 Para detectar o determinar simultáneamente A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo que reconoce la región N-terminal común a A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 y el anticuerpo de detección puede ser una combinación de al menos dos anticuerpos, en el que el primer anticuerpo reconoce específicamente la región C-terminal de A $\beta$ 42 sin producir reacción cruzada con A $\beta$ 40 y el segundo anticuerpo reconoce específicamente la región C-terminal de A $\beta$ 40 sin producir reacción cruzada con A $\beta$ 42. Alternativamente, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo que reconoce la región N-terminal común a A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 y el anticuerpo de detección puede ser un anticuerpo que reconoce la región C-terminal de A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40. Alternativamente, A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 pueden detectarse simultáneamente usando como anticuerpo de captura una mezcla de al menos dos anticuerpos que comprende un primer anticuerpo que reconoce específicamente la región C-terminal de A $\beta$ 42 sin producir reacción cruzada con A $\beta$ 40 y un segundo anticuerpo que reconoce específicamente la región C-terminal de A $\beta$ 40 sin producir reacción cruzada con A $\beta$ 42 y un anticuerpo de detección que reconoce la región N-terminal común a A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40. Alternativamente, A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 pueden detectarse simultáneamente usando como anticuerpo de captura un anticuerpo que reconoce la región C-terminal de A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 y un anticuerpo de detección que reconoce la región N-terminal común a A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40.

20 En una realización preferida, los anticuerpos primero y/o segundo o combinación de anticuerpos se han purificado por afinidad usando un polipéptido que comprende la secuencia del polipéptido usado para su preparación.

25 El tercer elemento del kit corresponde a un reactivo que muestra afinidad por el anticuerpo de detección y que está acoplado a un primer miembro de un par de unión. El reactivo de unión al anticuerpo puede unirse no covalentemente a un tipo(s) particular(es), a una(s) clase(s) particular(s) y/o a una(s) subclase(s) particular(s) de un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo. Alternativamente, el reactivo de unión al anticuerpo puede unirse no covalentemente a un anticuerpo específico para un antígeno particular. En ciertas realizaciones, el reactivo de unión al anticuerpo se une no covalentemente a la región Fc o a la región F(ab) del anticuerpo de detección. Los reactivos de unión a anticuerpos preferidos incluyen proteína A, proteína G, proteína V, proteína L, un anticuerpo anti-Fc o un fragmento de unión a anticuerpo y un receptor de Fc (FcR) o un fragmento del mismo que se une al anticuerpo. Ejemplos no limitativos de anticuerpos que pueden unirse no covalentemente al anticuerpo de detección incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de dominio único, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv unidos por puentes disulfuro (sdFv), intracuerpos, y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores. Ejemplos no limitativos de receptores de Fc incluyen Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIA $\alpha$ , Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ , Fc $\epsilon$ RI $\xi$  y Fc $\gamma$ RIIA $\xi$ .

30 El cuarto elemento del kit de la invención corresponde al segundo miembro de un par de unión que está acoplado a un marcador fluorescente, luminiscente o enzimático.

en el que el par de unión se selecciona del grupo que consiste en:

- 50 hapteno y anticuerpo;  
antígeno y anticuerpo;  
biotina y avidina;  
biotina y estreptavidina;

un análogo de biotina y avidina;

un análogo de biotina y estreptavidina;

azúcar y lectina;

enzima y cofactor;

5 ácido nucleico y ácido nucleico complementario y

análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario.

10 Se entenderá que la expresión miembro “primero” y “segundo” de un par de unión es relativo y que cada uno de los miembros anteriores pueden considerarse como el miembro primero o segundo del par de unión. En una realización preferida, el primer miembro de un par de unión es biotina o una variante funcionalmente equivalente de la misma y el segundo miembro del par de unión es avidina, estreptavidina o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

En una realización preferida, el segundo miembro del par de unión es estreptavidina.

15 Los marcadores detectables adecuados incluyen, sin limitación, restos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, cumarina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos), restos luminiscentes (por ejemplo, las nanopartículas Qdot™ suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA). Si el marcador detectable es una enzima, entonces esta enzima debe poder generar una señal detectable, por ejemplo, tras la adición de un activador, sustrato, agente de amplificación y similares. Las enzimas que son adecuadas como marcadores detectables para la presente invención y los sustratos correspondientes incluyen:

• Fosfatasa alcalina:

20 ○ Sustratos cromogénicos: sustratos basados en fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP), fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT), Fast-Red/fosfato de naftol-AS-TS

○ Sustratos fluorogénicos: fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona (CPPCQ), difosfato de 3,6-fluoresceína (3,6-FDP), sales diazónicas de Fast Blue BB, Fast Red TR, o Fast Red Violet LB.

25 • Peroxidasas:

○ Sustratos cromogénicos basados en ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DACM) y 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y tetraclorhidrato de 3,3',-diaminobenzidina (DAB).

30 ○ Sustratos fluorogénicos: ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazinas reducidas, benzotiazinas reducidas, incluyendo el reactivo Amplex® Red, Amplex UltraRed e dihidroxantenos reducidos.

• Glicosidasas:

○ Sustratos cromogénicos: o-nitrofenil-β-D-galactósido (0-NPG), p-nitrofenil-β-D-galactósido y 4-metilumbeliferil-β-D-galactósido (MUG) para la β-D-galactosidasa.

35 ○ Sustratos fluorogénicos: resorufina-β-D-galactopiranosido, fluoresceína-digalactósido (FDG), fluoresceína-diglucurónido, 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido, carboxiumbeliferil-β-D-galactopiranosido y cumarina-β-D-galactopiranosidos fluorinados.

• Oxidorreductasas (Luciferasa):

○ Sustratos luminiscentes: luciferina.

40 En una realización preferida, el marcador detectable es peroxidasa de rábano y el reactivo de detección es TMB.

45 En una realización preferida, el kit comprende además un soporte sólido. Tal como se usa en el presente documento, el término “soporte” o “superficie” se refiere a una fase sólida que es un material poroso o no poroso insoluble en agua que puede tener cualquiera de un número de formas, tal como una tira, varilla, partículas, incluyendo partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas, perlas, membranas, pocillos de microtitulación y tubos de plástico. En principio, cualquier material es adecuado como soporte sólido siempre que sea capaz de unir cantidades suficientes de anticuerpo de captura. Por tanto, la elección del material de fase sólida se determina basándose en las características de rendimiento deseadas del formato del ensayo. Materiales adecuados para el soporte sólido incluyen materiales poliméricos, particularmente materiales de celulosa y materiales derivados de

- celulosa, tales como papeles que contienen fibra, por ejemplo, papel de filtro, papel cromatográfico, papel de fibra de vidrio, etc.; polímeros sintéticos o que se producen de manera natural modificados, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), dextrano reticulado, agarosa, poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, poli(metacrilato), poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), etc.; pueden usarse por sí mismos o conjuntamente con otros materiales; vidrio tal como, por ejemplo, vidrio disponible como biovidrio, cerámica, metales, y similares. Se prefieren polímeros no reticulados de estireno y estireno carboxilado o estireno funcionalizado con otros grupos activos tales como amino, hidroxilo, halógeno y similares. En algunos casos, se usarán copolímeros de estirenos sustituidos con dienos tales como butadieno.
- 5
- El soporte sólido y el anticuerpo de captura pueden proporcionarse por separado en el kit o, alternativamente, el soporte puede distribuirse ya recubierto previamente con el anticuerpo de captura. En este caso, el soporte puede haberse tratado con una disolución de bloqueo tras la unión del anticuerpo de captura. Si el soporte está recubierto previamente, se prefiere que el soporte se trate con una disolución concentrada de trehalosa y se deje secar, en cuyo caso la trehalosa seca forma un halo sobre el soporte. Estos soportes que contienen la trehalosa seca son excepcionalmente estables y pueden almacenarse hasta dos años si se mantienen a 4°C en la oscuridad.
- 10
- Los componentes adicionales del kit pueden incluir:
- Medios para extraer del paciente la muestra que va a analizarse.
  - Tampones y disoluciones requeridas para preparar las curvas patrón de los péptidos diana.
  - Tampones y disoluciones para lavar y bloquear el soporte sólido durante el ensayo.
  - Tampones y disoluciones para recubrir el soporte sólido con el anticuerpo que recubre.
- 15
- Reactivos para revelar la señal coloreada o fluorogénica del marcador detectable.
  - Reactivos para detener la formación del producto coloreado o fluorogénico del marcador detectable (por ejemplo, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N).
  - Medios para mantener los péptidos en un estado desplegado (por ejemplo, clorhidrato de guanidinio concentrado).
  - Una muestra que contiene una disolución madre de los péptidos Aβ40 y Aβ42 o una combinación de los mismos.
- 20
- En una realización preferida, el anticuerpo de captura se inmoviliza en un soporte sólido. La inmovilización puede llevarse a cabo antes de la unión del polipéptido diana que va a detectarse o una vez que el péptido/proteína se une al anticuerpo de captura. En cualquier caso, si se usa un soporte sólido, es conveniente bloquear el exceso de sitios de unión a proteínas en el soporte antes de añadir la muestra que contiene el polipéptido diana que va a determinarse. Preferiblemente, el bloqueo o extinción de los sitios de unión a péptidos en el soporte se lleva a cabo usando el mismo tampón que se usa para lavar los complejos tras cada reacción de unión (por ejemplo, Tris-HCl 50 mM, pH 8, PBS u opcionalmente TBS que comprende Tween 20) complementado con un compuesto macromolecular (por ejemplo, albúmina sérica bovina, leche desnatada en polvo, reactivo de bloqueo de inmunotransferencia tipo Western, caseína, lactoalbúmina, ovoalbúmina) a concentraciones de desde aproximadamente el 0,05% hasta el 10%, preferiblemente del 1% al 5%, más preferiblemente de aproximadamente el 3%. Si el soporte que comprende el anticuerpo de captura inmovilizado debe almacenarse durante algún tiempo, se prefiere que el soporte se trate con una disolución concentrada de trehalosa y se deje secar, en cuyo caso la trehalosa seca forma un halo sobre el soporte. Estos soportes que contienen la trehalosa seca son excepcionalmente estables y pueden almacenarse hasta dos años cuando se mantienen a 4°C en la oscuridad.
- 25
- Los kits de la invención permiten la detección o determinación con alta sensibilidad de los polipéptidos que se reconocen específicamente por los componentes de anticuerpos primero y segundo del kit. Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un kit de la invención para detectar una proteína o proteína en una muestra. En una realización preferida, el kit se usa para detectar un péptido seleccionado del grupo de Aβ40, Aβ42 y la combinación de los mismos en la muestra.
- 30
- Una "muestra", tal como se entiende en la presente invención, incluye cualquiera de cultivo tisular, plasma, suero, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), lágrimas, moco, sudor, leche, extractos cerebrales y similares. En una realización preferida, la muestra es una muestra de plasma.
- 35
- En vista de la capacidad del kit de la invención para proporcionar una determinación con alta sensibilidad de las concentraciones de Aβ40 y Aβ42 en cualquier muestra, puede usarse para el diagnóstico de cualquier enfermedad en la que hay una concentración alterada de cualquiera de estos dos péptidos en cualquier fluido celular o tejido, en particular, enfermedades degenerativas y, más particularmente, enfermedades neurodegenerativas. Ejemplos no limitativos de enfermedades degenerativas que pueden diagnosticarse basándose en la aparición de niveles alterados de Aβ40 y/o Aβ42 incluyen:
- 40
- trastornos degenerativos óseos tales como osteopenia, osteomalacia, osteoporosis, osteomiéloma, osteodistrofia,
- 45
- 50

enfermedad de Paget, osteogénesis imperfecta, esclerosis ósea, trastorno aplásico óseo, mieloma hipercalcémico humoral, mieloma múltiple, y adelgazamiento del hueso tras metástasis.

- trastornos degenerativos del cartílago tal como el síndrome de Gorham-Stout, enfermedades artríticas; osteoartritis; artritis reumatoide; artritis psoriásica; enfermedad reumatoide; y osteogénesis imperfecta.
- 5
- enfermedades degenerativas musculares tales como distrofia muscular, atrofia muscular, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, atrofia muscular progresiva, sarcopenia, caquexia.
  - enfermedades degenerativas cardíacas incluyendo la muerte celular cardíaca debido a isquemia, muerte de tejido y órgano debido a rechazo de trasplante, pérdida de audición debida a autotoxicidad.
  - trastornos degenerativos de la retina como la retinitis pigmentosa.
- 10
- enfermedades degenerativas del sistema nervioso tales como la enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, demencia asociada al VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia por cuerpos de Lewy, enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelar de tipo 3), esclerosis múltiple, atrofia sistémica múltiple, neuroborreliosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedades de priones, enfermedad Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, esquizofrenia, enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten (también conocida como enfermedad de Batten), ataxia espinocerebelar, atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski, tabes dorsal. En una realización preferida, el trastorno neurodegenerativo que se diagnostica usando el kit de la invención es la enfermedad de Alzheimer.
- 15
- 20

Se apreciará que el parámetro que podría requerirse para decidir sobre una posible enfermedad no son sólo las concentraciones absolutas de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, sino también parámetros derivados de la combinación de dichos valores, tales como las proporciones A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 o A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, los porcentajes de A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 con respecto al total de péptidos A $\beta$  o de la suma de las concentraciones de A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40.

- 25
- En una realización preferida, la enfermedad que puede diagnosticarse es la enfermedad de Alzheimer, más particularmente, la EA esporádica, basada en la aparición en una muestra de un paciente con EA de concentraciones de péptidos A $\beta$ 40 y/o A $\beta$ 42 menores que las cantidades de dicho péptido o péptidos en una muestra biológica del mismo origen obtenida de un individuo sano.

- 30
- En el uso, el kit de la invención permite llevar a cabo un método de cinco etapas para detectar la cantidad de un polipéptido diana seleccionado del grupo de A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 y la combinación de los mismos en una muestra. Dicho método, que es otro objeto de la presente invención, que comprende las etapas de

- 35
- (i) capturar el polipéptido diana presente en la muestra con un primer anticuerpo o combinación de anticuerpos que se unen específicamente a dicho polipéptido diana, en el que el primer anticuerpo se dirige contra un epítipo ubicado dentro de los aminoácidos 1 a 16 de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, en el que el primer anticuerpo se ha inmovilizado previamente en un soporte sólido,

- (ii) poner en contacto los complejos inmunitarios formados en la etapa (a) con un segundo anticuerpo o combinación de anticuerpos que reconocen una región del polipéptido diana que es diferente de la región que reconoce el primer anticuerpo o combinación de anticuerpos,

- 40
- (iii) poner en contacto los complejos formados en la etapa (ii) con un reactivo que muestra afinidad por el segundo anticuerpo y que está acoplado a un primer miembro de un par de unión,

(iv) poner en contacto los complejos formados en la etapa (iii) con un segundo miembro de un par de unión que está acoplado a un marcador fluorescente, luminiscente o enzimático y

(v) detectar o determinar la actividad o cantidad del marcador unido al segundo miembro del par de unión,

- 45
- en el que el par de unión se selecciona del grupo de:

- primer miembro: hapteno y anticuerpo / segundo miembro: anticuerpo;
- primer miembro: biotina o análogos de biotina / segundo miembro: avidina o estreptavidina;
- primer miembro: azúcar / segundo miembro: lectina;
- primer miembro: enzima / segundo miembro: cofactor; y

- 50
- primer miembro: ácido nucleico o análogo de ácido nucleico / segundo miembro: ácido nucleico complementario.

En una realización preferida, los péptidos que se detectan corresponden a formas no oligoméricas de dicho péptido, más preferiblemente, formas monoméricas de cualquiera de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 .

Los reactivos usados en cada etapa del método se han descrito en detalle anteriormente.

5 En la primera etapa del método según la presente invención, la muestra que contiene los péptidos A $\beta$ 40 y/o A $\beta$ 42 se pone en contacto con un primer anticuerpo para formar un primer complejo inmunitario.

10 Tras llevar a cabo la primera etapa de unión, los complejos pueden lavarse para retirar cualquier exceso de proteína/péptido encontrado en la muestra original que no se ha unido al anticuerpo de captura. Los tampones de lavado preferidos que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen cualquier tampón con un pH próximo al fisiológico (por ejemplo, Tris-HCl 50 mM) que opcionalmente comprende sales (por ejemplo NaCl 150 mM) y que opcionalmente comprende concentraciones bajas de un detergente (por ejemplo, Tween-20 al 0,05%).

En una segunda etapa, los complejos formados entre el anticuerpo de captura y el péptido o péptidos A $\beta$  en la muestra se ponen entonces en contacto con el segundo anticuerpo para formar un complejo inmunitario de "tipo *sándwich*".

15 Tras llevar a cabo la segunda etapa, los complejos inmunitarios pueden lavarse para eliminar los anticuerpos unidos de manera no específica usando esencialmente los mismos tampones y procedimientos que se han descrito anteriormente.

En la tercera etapa, el método de la invención implica poner en contacto los complejos formados entre el péptido o péptidos capturados y el anticuerpo de detección con un reactivo que muestra afinidad por el anticuerpo de detección y que está acoplado a un primer miembro de un par de unión.

20 En una cuarta etapa, el método de la invención implica poner en contacto los complejos formados entre el reactivo de unión al anticuerpo y el anticuerpo de detección con un segundo miembro de un par de unión que está acoplado a un marcador detectable.

25 En la quinta etapa del método según la invención, el método implica detectar el marcador detectable. Se entenderá que la detección y/o la cuantificación del marcador detectable dependen de la naturaleza del marcador y que se conoce en la técnica. Cuando un sustrato intacto o marcador detectable contiene un componente luminiscente o colorante, la detección puede ser mediante observación visual en un transiluminador UV, o usando sistema de detección de cámara con un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) basado en UV, un escáner de geles basado en láser, un sistema de detección de cámara con CCD basado en arco de xenón, una cámara Polaroid combinada con un transiluminador UV, así como una variedad de otros dispositivos usados para la detección de luminiscencia. Cuando el marcador detectable es una enzima, la quinta etapa del método según la invención implica exponer los complejos inmunitarios marcados con el marcador (por ejemplo, el péptido capturado, el anticuerpo de detección y el reactivo marcado con el marcador detectable) a activadores, sustratos, o agentes de amplificación de la enzima usada como marcador detectable. Marcadores detectables bien conocidas que pueden generar una señal detectable incluyen anticuerpos marcados con enzimas. Enzimas a modo de ejemplo bien conocidas para este fin incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y glicosidasas, incluyendo  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucuronidasa. Como ejemplo, un reactivo que se une específicamente al anticuerpo de detección puede estar marcado con peroxidasa de rábano. Tras la formación un complejo resto de captura-anticuerpo de detección-reactivo, puede realizarse la detección usando cualquiera de un amplio intervalo de sustratos bien conocidos para la enzima usada como marcador detectable.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa que comprende medir los niveles de A $\beta$ 40 y/o A $\beta$ 42 en una muestra de un sujeto que se sospecha que tiene dicha enfermedad y correlacionar la concentración de uno y/o ambos péptidos en la muestra de dicho sujeto con respecto a la concentración de dicho péptido o péptidos en una muestra de un individuo sano con la aparición del trastorno neurodegenerativo.

45 En una realización preferida, la enfermedad degenerativa es la enfermedad de Alzheimer en la que si la cantidad de péptidos A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 o una combinación de los mismos en dicha muestra es inferior a la cantidad de dicho péptido o péptidos en una muestra de un individuo sano, es indicativo de que el sujeto padece enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, la determinación se lleva a cabo en plasma o suero.

50 Se prefiere llevar a cabo las diferentes etapas del método usando en paralelo las muestras que van a determinarse y varias muestras que tienen concentraciones crecientes y conocidas del compuesto que debe determinarse. Si deben determinarse A $\beta$ 40 y/o A $\beta$ 42, debe prepararse una curva patrón para cada péptido usando concentraciones crecientes. La curva patrón sirve para el doble propósito de (i) establecer el intervalo de concentración en el que la señal aumenta de forma lineal con la concentración del péptido diana y (ii) determinar la concentración de los péptidos en las muestra de prueba mediante la interpolación de la señal obtenida con las muestras de prueba en la  
55 curva para obtener los valores de concentración. En vista de la alta sensibilidad del ensayo de la invención, las concentraciones de la muestra de prueba preferidas son por ejemplo, 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 y 200 pg/ml. Se

apreciará que las concentraciones de las muestras usadas para obtener la curva patrón variarán para cada sustrato de prueba. Sin embargo, la determinación del intervalo lineal del ensayo puede determinarse fácilmente por el experto en la técnica mediante métodos convencionales. En vista de las cantidades más altas de los péptidos A $\beta$ 42 y A $\beta$ 40 en muestras de LCR así como en muestras de suero de pacientes con formas familiares de EA en comparación con el suero de pacientes con EA esporádica, se prefiere que, si el kit de la invención se usa para determinar los péptidos A $\beta$  en muestras de LCR o suero de pacientes con EA familiar, éstas se diluyan de modo que las concentraciones finales de A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 se encuentren en el intervalo que está en el lado lineal del ensayo.

Los siguientes ejemplos se proporcionan como ilustración y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### ELISA de tipo *sándwich* colorimétrico con amplificación con biotina-estreptavidina

Para aumentar la sensibilidad, la señal puede amplificarse usando biotina-estreptavidina. La placa se cubrió usando el anticuerpo de captura Acm 6E10 que reconoce los aminoácidos 1-17 en el amiloide A $\beta$ 40 y el péptido amiloide A $\beta$ 42. El recubrimiento se llevó a cabo a una concentración de 5  $\mu$ g/ml en tampón carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,6, durante la noche a 4°C. La placa se bloqueó entonces con 300  $\mu$ l de una disolución de bloqueo (Tris-HCl 50 mM, pH 8, Tween-20 al 0,2%, BSA al 0,5%) durante 3 h a temperatura ambiente con agitación o durante 2 h a 37°C. Cuando es necesario, las placas pueden tratarse, tras el bloqueo, con 100  $\mu$ l de una disolución de Tris-HCl 50 mM pH 8 que contiene trehalosa 20 mg/ml. Las placas se dejaron evaporar hasta que aparece un halo blanco característico de la trehalosa. Las placas así tratadas podían tratarse para mantenerse a 4°C cubiertas con lámina de aluminio y son estables durante dos años.

Se prepararon las muestras de la curva patrón a partir de una disolución madre 200 pg/ml de los péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en las placas cubierta con el Acm 6E10 y tratadas con trehalosa. A partir de estas disoluciones, se realizaron diluciones en serie 1:2 en SDB para dar concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 pg/ml. Se añadieron 100  $\mu$ l de cada una de las muestras diluidas o sin diluir en SDB (1/1.000.000) y se incubaron durante la noche a 4°C (o durante 2 h a 37°C).

El anticuerpo de detección (un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido A $\beta$ 42 o un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido A $\beta$ 40, dependiendo de si va a detectarse A $\beta$ 42 o A $\beta$ 40) se añadió diluido en SDB. Se añadieron 100  $\mu$ l a cada pocillo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente.

A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de una dilución 1/5000 en SDB de un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con biotina (SIGMA) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Después se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l de una dilución 1/4000 en SDB de estreptavidina acoplada a HRP (de SIGMA) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente.

Para revelar la placa, se añadieron 100  $\mu$ l del sustrato cromogénico TMB (ZEU Inmunotec.) y se incubó en la oscuridad durante 15-30 minutos. Como disolución de parada, se añadieron por pocillo 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Synergy HT (Bio Tek Instruments).

Entre cada una de las etapas, la placa se lavó usando un lavador automático de placas (Elx50 Bio Tek Instruments) programado para realizar 5 aclarados cada vez. La disolución de lavado contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8, Tween-20 al 0,05% y NaCl 150 mM (filtrada antes de su uso).

### Ejemplo 2

#### Ensayo de ELISA de tipo *sándwich* colorimétrico

Se cubrió la placa con 6E10 en tampón bicarbonato (5  $\mu$ g/ml) durante la noche a 4°C. La placa se bloqueó después 3 h a temperatura ambiente con agitación (300  $\mu$ l/pocillo). Se añadieron entonces a las placas las muestras de prueba y de la curva patrón y se incubaron durante la noche a 4°C. Se añadió una dilución 1/4000 del anticuerpo de detección (suero anti-A $\beta$ 40 o anti-A $\beta$ 42) a cada pocillo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Se añadieron diluciones en serie del anticuerpo acoplado a FITC (diluciones 1/1000, 1/5000, 1/10000) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. La fluorescencia se obtuvo usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 528.

Alternativamente, el ensayo se lleva a cabo usando el sustrato fluorescente *Quanta-Blu* (PIERCE), que aumenta la sensibilidad del ensayo de ELISA. La excitación máxima se da a 325 nm y la emisión máxima a 420 nm. Puede detectarse en el intervalo de excitación de 315-340 nm y en el intervalo de emisión de 370-470 nm. La disolución de trabajo QuantaBlu se prepara mezclando 9 partes de disolución de sustrato QuantaBlu con 1 parte de disolución

estable de peroxidasa QuantaBlu (la disolución es estable durante 24 h a temperatura ambiente). Puede incubarse desde 1,5 minutos hasta 90 minutos a temperatura ambiente y puede leerse parando la reacción o sin pararla (se produce un color azul).

5 La placa se cubre con Acm 6E10 en tampón bicarbonato (5 µg/ml) durante la noche a 4°C y se bloquea después durante 3 h a temperatura ambiente con agitación (300 µl/pocillo). Se preparan entonces diferentes curvas patrón con las siguientes concentraciones de péptidos Aβ42 y Aβ40:

- 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 y 15,65 pg/ml
- 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 pg/ml
- 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 y 0,39 pg/ml
- 10 • 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 y 0,156 pg/ml
- 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,156 y 0,078 pg/ml
- 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 y 0,0156 pg/ml

15 Se añadió el anticuerpo de detección (suero anti-Aβ40 o anti-Aβ42 ) (diluido a 1/4000) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Se añadió después el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP 1/1000 y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Para revelar la reacción, se añadieron 100 µl de disolución de trabajo Quanta-Blue y se incubó durante 30', 60' y 90' a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lee entonces la fluorescencia (Excitación: 360/40 nm; Emisión: 460/40 nm) a 30', 60' y 90' sin parar la reacción o parando la reacción con disolución de parada.

### Ejemplo 3

#### 20 Preparación de las curvas patrón de Aβ40 y Aβ42

25 Para la preparación de la curva patrón de Aβ40, se reconstituyó una muestra liofilizada de Aβ40 humana a 10 µg/ml. A partir de la disolución madre, se prepararon muestras que contenían las siguientes concentraciones (en pg/ml): 25.000 pg/ml, 2.500 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml, 3,125 pg/ml, 1,56 pg/ml, 0,78 pg/ml. Las muestras se prepararon en presencia de 1 mM del inhibidor de proteasas AEBSF. Las muestras se procesaron después según el método definido en los ejemplos anteriores. Los resultados se muestran en la figura 1.

30 Para la preparación de la curva patrón de Aβ42, se reconstituyó una muestra liofilizada de Aβ42 humana a 10 µg/ml. A partir de la disolución madre, se prepararon muestras que contenían las siguientes concentraciones (en pg/ml): 25.000 pg/ml, 2.500 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml, 3,125 pg/ml, 1,56 pg/ml, 0,78 pg/ml. Las muestras se prepararon en presencia de 1 mM del inhibidor de proteasas AEBSF. Las muestras se procesaron después según el método definido en los ejemplos anteriores. Los resultados se muestran en la figura 2.

### Ejemplo 4

#### Correlación entre diagnóstico de EA y niveles de Aβ40/Aβ42

35 Se determinaron los niveles de Aβ40 y Aβ42 usando el ensayo de ELISA de tipo *sándwich* descrito en los ejemplos anteriores en muestras de plasma de una cohorte de sujetos control y de una cohorte de pacientes a los que se había diagnosticado EA usando la puntuación del miniexamen cognoscitivo (MEC) con un valor de punto de corte de 24. En la tabla 1 se muestran las concentraciones en pg/ml de Aβ40 y Aβ42.

## ES 2 377 151 T3

Tabla 1

Sanos	AB40	AB42	AB40/AB42	AB42/AB40	AB40+AB42	% AB40	% AB42
LSA	31,2	160,1	0,19	5,13	191,30	16,31	83,69
CPB	93,4	159,4	0,59	1,71	252,80	36,95	63,05
CFA	730,5	893,6	0,82	1,22	1624,10	44,98	55,02
VCL	145,0	329,6	0,44	2,27	474,60	30,55	69,45
FLA	430,1	19,6	21,94	0,05	449,70	95,64	4,36
ILS-7	102,9	34,2	3,01	0,33	137,05	75,08	24,92
MPG-8	57,0	59,2	0,96	1,04	116,17	49,07	50,93
PLA-17	29,6	8,7	3,39	0,30	38,27	77,21	22,79
ARL-24	34,0	25,8	1,32	0,76	59,82	56,89	43,11
BGM-28	23,4	7,4	3,16	0,32	30,77	75,95	24,05
EA	AB40	AB42	AB40/AB42	AB42/AB40	AB40+AB42	% AB40	% AB42
BEG	12,0	71,5	0,17	5,96	83,50	14,37	85,63
CPG	74,3	136,7	0,54	1,84	211,00	35,21	64,79
VAC	26,7	34,7	0,77	1,30	61,40	43,49	56,51
MTF	55,6	141,7	0,39	2,55	197,30	28,18	71,82
CPG	34,2	28,0	1,22	0,82	62,24	54,95	45,05
MVA-5	17,2	21,9	0,79	1,27	39,05	43,99	56,01
JGS-40	13,6	16,6	0,82	1,22	30,18	45,10	54,90
PTG-35	37,3	24,8	1,50	0,66	62,11	60,07	39,93
CBC-30	11,6	6,1	1,90	0,53	17,63	65,51	34,49
JHC-2	25,4	23,4	1,09	0,92	48,84	52,07	47,93

Se calcularon los valores medios y los resultados se facilitan en la Tabla 2.

Tabla 2

	Sanos	Pacientes con EA
A $\beta$ 40 (pg/ml)	167,70	30,78
A $\beta$ 42 (pg/ml)	169,75	50,53

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ARACLON BIOTECH S.L.

<120> INMUNOENSAYOS DE ALTA SENSIBILIDAD Y KITS PARA LA DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS DE INTERÉS BIOLÓGICO

5

<130> P3158EP00

<160> 6

10 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido usado para preparar el anticuerpo policlonal específico anti-Abeta42

20 <400> 1

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

1

5

10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido usado para preparar el anticuerpo policlonal específico anti-Abeta42

30 <400> 2

Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

1

5

<210> 3

ES 2 377 151 T3

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido usado para preparar el anticuerpo policlonal específico anti-Abeta40

<400> 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

1 5

10

<210> 4

<211> 42

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys |

1 A \N 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

35 40

<210> 5

<211> 40

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5



ES 2 377 151 T3

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn  
 85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val  
 100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu  
 115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys  
 130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu  
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile  
 165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu  
 180 185 190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val  
 195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys  
 210 215 220

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu  
 225 230 235 240

ES 2 377 151 T3

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu  
 245 250 255

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile  
 260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg  
 275 280 285

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile  
 290 295 300

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe  
 305 310 315 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr  
 325 330 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr  
 340 345 350

Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala  
 355 360 365

Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp  
 370 375 380

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala  
 385 390 395 400

ES 2 377 151 T3

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala  
 405 410 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile  
 420 425 430

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn  
 435 440 445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met  
 450 455 460

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu  
 465 470 475 480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys  
 485 490 495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe  
 500 505 510

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser  
 515 520 525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser  
 530 535 540

Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp  
 545 550 555 560

ES 2 377 151 T3

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val  
 565 570 575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala  
 580 585 590

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro  
 595 600 605

Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe  
 610 615 620

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val  
 625 630 635 640

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser  
 645 650 655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp  
 660 665 670

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu  
 675 680 685

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly  
 690 695 700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu  
 705 710 715 720

ES 2 377 151 T3

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val  
725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met  
740 745 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met  
755 760 765

Gln Asn  
770

**REIVINDICACIONES**

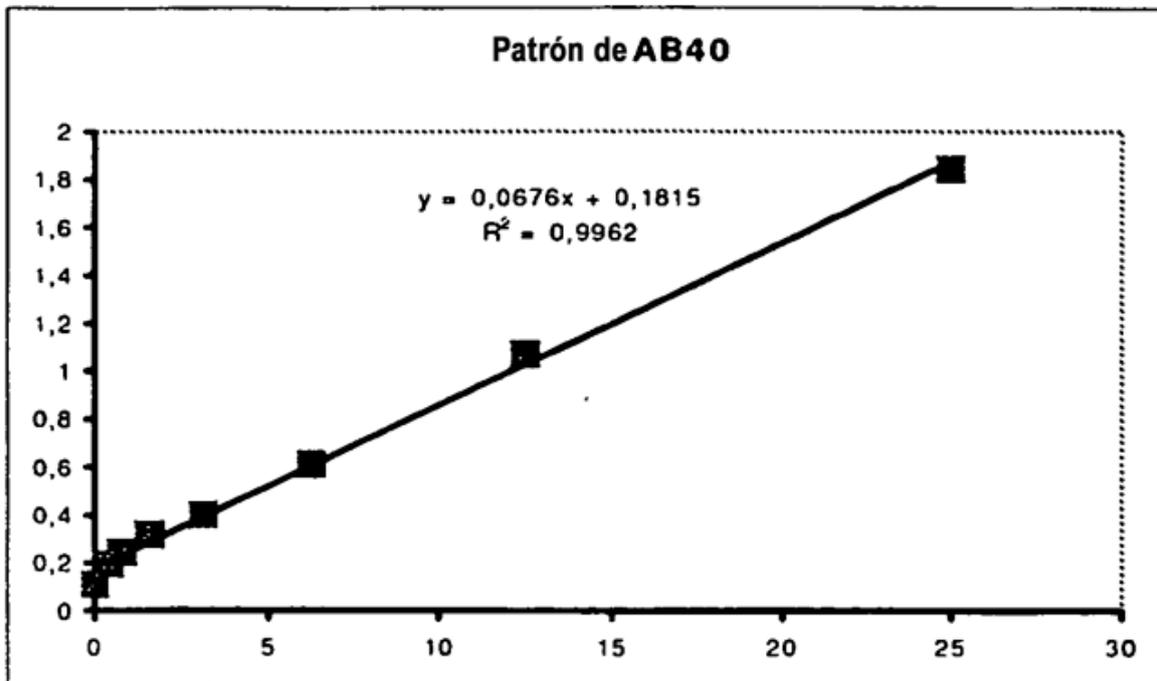
1. Kit para la detección de un polipéptido diana seleccionado del grupo de A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 y una mezcla de los mismos que comprende
  - (i) un primer anticuerpo o combinación de anticuerpos que reconocen dicho polipéptido diana en el que el primer anticuerpo se dirige contra un epítipo ubicado dentro de los aminoácidos 1 a 16 de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42; en el que el primer anticuerpo está previamente unido a un soporte sólido;
  - (ii) un segundo anticuerpo o combinación de anticuerpos que reconocen una región diferente del polipéptido diana de la región reconocida por el primer anticuerpo o combinación de anticuerpos
  - (iii) un reactivo que muestra afinidad por el segundo anticuerpo, estando acoplado dicho reactivo a un primer miembro de un par de unión y
  - (iv) un segundo miembro de un par de unión acoplado a un marcador fluorescente, luminiscente o enzimático, en el que el par de unión se selecciona del grupo que consiste en:
    - hapteno y anticuerpo;
    - antígeno y anticuerpo;
    - biotina y avidina;
    - biotina y estreptavidina;
    - un análogo de biotina y avidina;
    - un análogo de biotina y estreptavidina;
    - azúcar y lectina;
    - enzima y cofactor;
    - ácido nucleico y ácido nucleico complementario y
    - análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario.
2. Kit según la reivindicación 1, que se ha tratado con una disolución concentrada de trehalosa y se ha dejado secar.
3. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además una muestra que contiene los péptidos A $\beta$ 40 y/o A $\beta$ 42.
4. Kit según las reivindicaciones 1 a 3, en el que, si el segundo miembro del par de unión está acoplado a un marcador enzimático, entonces el kit comprende además un sustrato que puede convertirse por dicha enzima en un producto detectable.
5. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para determinar o detectar un polipéptido en una muestra, en el que el polipéptido diana que va a determinarse o detectarse se selecciona del grupo de A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 o una mezcla de los mismos.
6. Uso según la reivindicación 5, en el que la muestra se selecciona del grupo de sangre, plasma, suero o LCR.
7. Uso de un kit según las reivindicaciones 1 a 6, para el diagnóstico de un trastorno degenerativo en un sujeto.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que el trastorno degenerativo es un trastorno neurodegenerativo.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que el trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Alzheimer.
10. Método para determinar o detectar la cantidad de un polipéptido diana seleccionado del grupo de A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 y la mezcla de los mismos en una muestra que comprende las etapas de
  - (i) capturar el polipéptido diana presente en la muestra con un primer anticuerpo o combinación de anticuerpos que se unen específicamente a dicho polipéptido diana, en el que el primer anticuerpo se dirige contra un epítipo ubicado dentro de los aminoácidos 1 a 16 de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, en el que el primer anticuerpo se ha inmovilizado previamente en un soporte sólido,

- (ii) poner en contacto los complejos inmunitarios formados en la etapa (i) con un segundo anticuerpo o combinación de anticuerpos que reconocen una región del polipéptido diana que es diferente de la región que reconoce el primer anticuerpo o combinación de anticuerpos,
- 5 (iii) poner en contacto los complejos formados en la etapa (ii) con un reactivo que muestra afinidad por el segundo anticuerpo y que está acoplado a un primer miembro de un par de unión,
- (iv) poner en contacto los complejos formados en la etapa (iii) con un segundo miembro de un par de unión que está acoplado a un marcador fluorescente, luminiscente o enzimático y
- (v) detectar o determinar la actividad o cantidad del marcador unido al segundo miembro del par de unión, en el que el par de unión se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 hapteno y anticuerpo;  
antígeno y anticuerpo;  
biotina y avidina;  
biotina y estreptavidina;  
un análogo de biotina y avidina;
- 15 un análogo de biotina y estreptavidina;  
azúcar y lectina;  
enzima y cofactor;  
ácido nucleico y ácido nucleico complementario y  
análogo de ácido nucleico y ácido nucleico complementario.
- 20 11. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o método según la reivindicación 10, en el que el primer anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o método según la reivindicación 10, en el que el anticuerpo de captura monoclonal es el Acm 6E10.
- 25 13. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o método según la reivindicaciones 10, en el que el segundo anticuerpo es un anticuerpo seleccionado del grupo de
- (i) un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido A $\beta$ 42 que se une específicamente a A $\beta$ 42 sin producir reacción cruzada sustancial con A $\beta$ 40
- (ii) un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido A $\beta$ 40 que se une específicamente a A $\beta$ 40 sin producir reacción cruzada sustancial con A $\beta$ 42
- 30 (iii) un anticuerpo que reconoce simultáneamente la región C-terminal tanto de A $\beta$ 40 como de A $\beta$ 42 y
- (iv) una combinación de los anticuerpos según (i) y (ii).
14. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o método según la reivindicación 13, en el que la región C-terminal del péptido A $\beta$ 42 usada para preparar el segundo anticuerpo es el péptido seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o en el que la región C-terminal del péptido A $\beta$ 40 usada para preparar el segundo anticuerpo es el péptido seleccionado del grupo de o SEQ ID NO: 3.
- 35 15. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en el que los anticuerpos primero y/o segundo se han purificado por afinidad usando un polipéptido que comprende la secuencia del polipéptido usado para su preparación.
- 40 16. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el reactivo que muestra afinidad por el segundo anticuerpo se selecciona del grupo de un anticuerpo anti-IgG, proteína A o proteína G o una variante funcionalmente equivalente de los mismos.
17. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que dicho primer miembro de un par de unión es biotina.
18. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o método según la reivindicación 17, en el que el

segundo miembro de un par de unión es avidina, estreptavidina o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

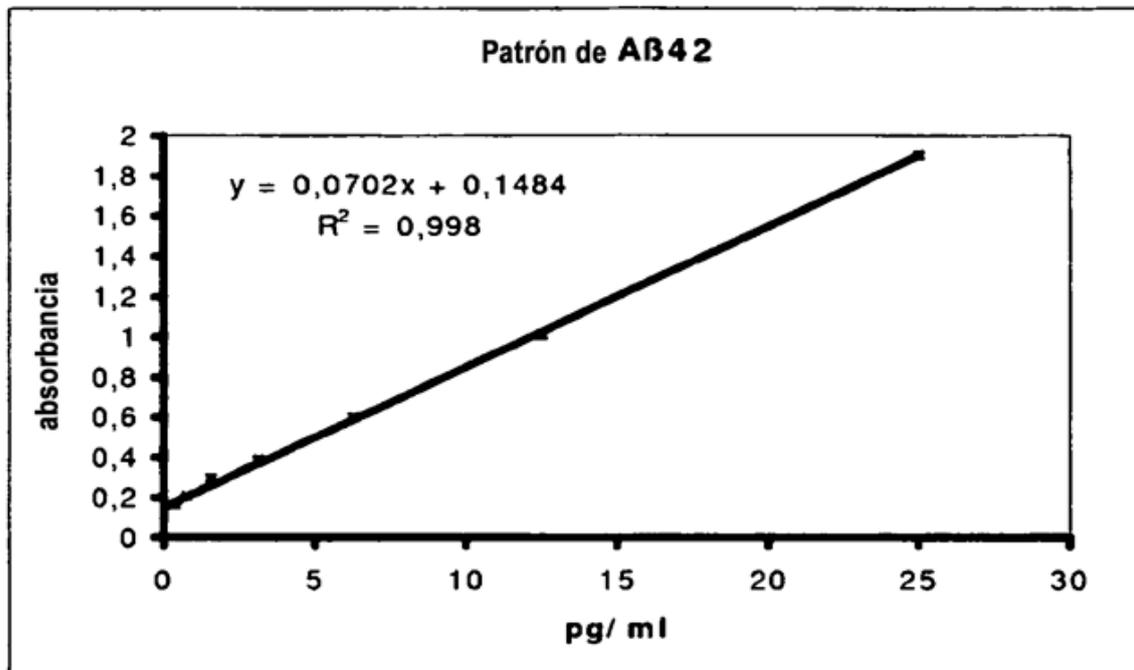
19. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo de sangre, suero, plasma y LCR.
- 5 20. Método para el diagnóstico de un trastorno degenerativo en un sujeto que comprende determinar la cantidad de A $\beta$ 40 o A $\beta$ 42 en una muestra de un paciente usando un método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19 y correlacionar la concentración de uno o ambos péptidos en la muestra de dicho sujeto con respecto a la concentración de dicho péptido o péptidos en una muestra de un individuo sano con la aparición del trastorno degenerativo.
- 10 21. Método según la reivindicación 20, en el que el trastorno degenerativo es un trastorno neurodegenerativo.
22. Método según la reivindicación 21, en el que el trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Alzheimer y en el que si la cantidad de péptidos A $\beta$ 40 y/o A $\beta$ 42 en dicha muestras es inferior a las cantidades de dicho péptido o péptidos en una muestra biológica del mismo origen obtenida de un individuo sano, es indicativo de que el sujeto padece enfermedad de Alzheimer.
- 15 23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en el que la muestra en la que va a detectarse A $\beta$ 40 y/o A $\beta$ 42 es una muestra de plasma o suero.

Patrón de AB40 (pg/ml)	DO a 450 nm
0	0,112
0,78	0,246
1,56	0,321
3,125	0,402
6,25	0,612
12,5	1,071
25	1,845



**Figura 1**

Patrón de AB42 (pg/ml)	DO a 450 nm
0	0,098
0,78	0,207
1,56	0,297
3,125	0,389
6,25	0,601
12,5	1,009
25	1,903



**Figura 2**