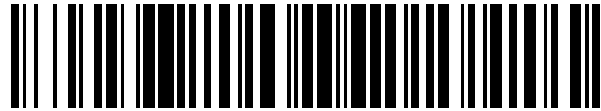


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 609**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/531** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2011 E 11704514 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2534490**

54 Título: **Patrones para inmunoensayo y medición de biomarcadores clínicos usando patrones de calibración intra-ensayo**

30 Prioridad:

**09.02.2010 US 302835 P**

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

**07.03.2016**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**RHYNE, PAUL;  
MAPELLI, CLAUDIO;  
WONG, OITAK;  
BERISHA, FLORA y  
NEELY, ROBERT JOHN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 562 609 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

Patrones para inmunoensayo y medición de biomarcadores clínicos usando patrones de calibración intra-ensayo

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> modificados novedosos que pueden usarse como patrones de referencia y a calibradores para medir biomarcadores clínicos en un inmunoensayo. Esta invención se refiere también a métodos de uso de los péptidos y a kits que comprenden los péptidos.

10

**Antecedentes de la invención**

Los péptidos beta amiloide (A $\beta$ ) se generan a partir de la escisión de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) por medio de complejos enzimáticos de beta secretasa y gamma secretasa (Wolfe, *Biochemistry*, 45:7931-7939 (2006)). La beta secretasa genera los extremos N-terminales de estos péptidos amiloides y la gamma secretasa genera los extremos C-terminales (Wolfe, *Biochemistry*, 45:7931-7939 (2006)). Posteriormente se generan varias especies de péptidos que generalmente varían de 38 a 42 aminoácidos de longitud dependiendo de dónde la gamma secretasa escinda la APP. Los péptidos A $\beta$  tienen un dominio extracelular (aminoácidos 1-28) y una región transmembrana (aminoácidos 29-42) que está embebida en la bicapa lipídica. Se cree que los péptidos amiloides que tienen 42 aminoácidos de longitud (A $\beta$ <sub>42</sub>) son la supuesta especie neurotóxica, ya sea sola o como agregados. Se sospecha que estos agregados contribuyen a la neurodegeneración del cerebro dando como resultado enfermedad de Alzheimer y demencia. La hipótesis de que A $\beta$ <sub>42</sub> contribuye a demencias clínicas es la llamada hipótesis de cascada amiloide como la descrita por Hardy *et al.* (*Science*, 256:184- 185 (1992)).

15

20

25

Una de las características de los péptidos A $\beta$  es la capacidad para auto-ensamblarse en oligómeros a concentraciones fisiológicas (Burdick *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 267:546-554 (1992); Cerf *et al.*, *Biochemical Journal*, 421:415-423 (2009)). La especie A $\beta$ <sub>42</sub> es más propensa a formar oligómeros en comparación con las especies A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>38</sub>. El mecanismo de formación de oligómeros se ha mostrado que se origina a partir de una pequeña región de cinco aminoácidos localizada en los aminoácidos 16 a 20 (KLVFF) que media la unión de péptidos A $\beta$  de una manera antiparalela. Esta pequeña región ha sido, por lo tanto, denominada "dominio de agregación" (Tjernberg *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 271:8545-8548 (1996)). Los agregados de péptidos A $\beta$  se ensamblan rápidamente (es decir, en cuestión de minutos) en determinadas condiciones especialmente a intervalos de pH más bajos, con cinéticas ligeramente más lentas a pH neutro o superior (Burdick *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*; 267:546-554 (1992)). Los agregados son poco solubles en soluciones acuosas, especialmente en presencia de sales. Los extremos C-terminales de los péptidos A $\beta$  se doblan de nuevo sobre el núcleo del dímero por medio de puentes salinos incrementando así su hidrofobicidad y promoviendo la polimerización adicional de los péptidos en filamentos o fibrillas. Los dos restos de extremos C-terminales adicionales en la especie A $\beta$ <sub>42</sub> proporcionan una hidrofobicidad incrementada en comparación con las demás especies de A $\beta$  (Kim *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*; 280:35069-35076 10 (2005)).

30

35

40

Los datos clínicos sugieren que el grado de demencia y deterioro cognitivo tiene una mayor correlación con la concentración de A $\beta$ <sub>42</sub> que con cualquiera de las especies A $\beta$ <sub>40</sub> o A $\beta$ <sub>38</sub>. Esta observación, junto con las propiedades de rápida agregación de A $\beta$ <sub>42</sub>, ha conducido a la hipótesis de que la inhibición de la agregación de A $\beta$ <sub>42</sub> puede tener beneficios clínicos. Ha habido numerosos estudios en los que se muestra que se pueden usar mecanismos diferentes para inhibir la formación de agregados de A $\beta$ <sub>42</sub>. Tjernberg *et al.* (*Journal of Biological Chemistry*; 271: 8545-8548 (1996)) demostraron que los péptidos que comprenden el dominio de agregación se unen bien a péptidos A $\beta$  e inhiben la formación de agregados. También se ha observado que otras moléculas que se unen al dominio de agregación inhiben la agregación de péptidos amiloides (Martharu *et al.*, *Journal of Neurological Sciences*, 280:49-58 (2009); Kim *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303:576-279 (2003)). La sustitución de aminoácidos en el dominio central de agregación o la delección del dominio de agregación completo también evitan la agregación de péptidos A $\beta$  y la formación de fibrillas (Tjernberg *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 274:12619-12625 (1999)). Además, se han diseñado varios fármacos para inhibir la actividad gamma secretasa con el fin de reducir la cantidad de A $\beta$ <sub>42</sub> y de las especies de péptidos relacionadas. La utilidad de estos enfoques en la práctica clínica se está investigando actualmente.

45

50

55

Para evaluar la efectividad de una molécula para inhibir la generación de A $\beta$ <sub>42</sub> o para prevenir su agregación, es necesario medir la cantidad de A $\beta$ <sub>42</sub> forma precisa. Existen varias técnicas que se usan para detectar y cuantificar A $\beta$ <sub>42</sub> en muestras biológicas incluyendo tanto inmunoensayos (Olsson *et al.*, *Clinical Chemistry*, 51:336-345 (2005); Verwey *et al.*, *Journal of Immunological Methods*, 348:57-66 (2009); Sjogren *et al.*, *Journal of Neural Transmission*, 107:563-679 (2000)) como métodos basados en la espectrometría de masas (EM) (Cantone *et al.*, *Journal of Neuroscience Methods*, 180:255-260 (2009); *Journal of Mass Spectrometry*, 40:142-145 (2005)). Los métodos basados en la EM, incluyendo aquellos de MALDI-TOF y SELDI-TOF, junto con la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas, son capaces de detectar muchas de las especies amiloides beta en una muestra biológica, pero actualmente no proporcionan suficientes valores cuantitativos que se requieren para medir A $\beta$ <sub>42</sub> en muestras clínicas.

60

65

Los métodos de inmunoensayo se basan en un inmunoensayo de doble sándwich que comprende un anticuerpo que es específico para el extremo N y un anticuerpo secundario que es altamente específico para el extremo C de A $\beta$ <sub>42</sub> (es decir, no reconoce otras especies de péptidos A $\beta$ ). Existen dos versiones básicas de los inmunoensayos. La primera versión captura péptidos A $\beta$  en muestras biológicas por medio de un anticuerpo específico de la región N-terminal inmovilizado en una superficie sólida. El anticuerpo específico de A $\beta$ <sub>42</sub> que porta un marcador se añade al inmunoensayo para completar el sándwich de anticuerpos. La segunda versión captura péptidos A $\beta$  en muestras biológicas por medio de un anticuerpo específico de la región C-terminal de A $\beta$ <sub>42</sub> inmovilizado sobre una superficie sólida. El anticuerpo específico de la región N-terminal que porta un marcador es añadido al inmunoensayo. En cualquiera de las versiones, el marcador incorporado por medio del segundo anticuerpo hace posible la detección del complejo completo. Estos ensayos se convierten en cuantitativos mediante el uso de patrones de referencia de A $\beta$ <sub>42</sub>, los cuales se añaden en lugar de muestras biológicas. La señal resultante medida a partir de los patrones de referencia se usa para generar una curva patrón que se usa posteriormente para cuantificar la cantidad de A $\beta$ <sub>42</sub> en las muestras biológicas.

Hasta la fecha, el uso de patrones de referencia de A $\beta$ <sub>42</sub> en inmunoensayos se ha basado en péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> sintéticos de longitud completa, los cuales se generan generalmente con mínima dificultad. Sin embargo, estos péptidos tienen fuertes propiedades hidrófobas y, por lo tanto, no son solubles en soluciones acuosas. Además, el almacenamiento y uso de A $\beta$ <sub>42</sub> como patrones de referencia presentan muchos problemas. Como se ha descrito, A $\beta$ <sub>42</sub> forma agregados rápidamente y esta formación se presenta más fácilmente a temperaturas ambiente y pH neutro. El almacenamiento a largo plazo a bajas temperaturas (por debajo de -20 °C) y bajo pH ayuda a minimizar la agregación durante el almacenamiento pero no la evita. La reconstitución de A $\beta$ <sub>42</sub> en tampones utilizables en inmunoensayos también puede ser difícil. Estas soluciones casi siempre son acuosas, están tamponadas a pH neutro, contienen sales y se usan a temperatura ambiente, condiciones todas ellas que aceleran la agregación de A $\beta$ <sub>42</sub>. Los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> que se han agregado no son útiles como patrones de referencia en inmunoensayos debido a los precipitados insolubles y a la no uniformidad tanto en tamaño como en disponibilidad para ser reconocidos ya sea por anticuerpos de detección o captura.

De esta manera, la presente invención satisface una necesidad en la técnica al proporcionar péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> modificados que se pueden usar como patrones de referencia o calibradores en un inmunoensayo o en otro formato para medir la abundancia de péptido A $\beta$ <sub>42</sub> de manera precisa en un fluido o muestra de un extracto de tejido. Específicamente, la presente invención proporciona patrones de referencia de péptidos no agregantes para A $\beta$ <sub>42</sub> para su uso en formatos de inmunoensayo. Los péptidos y métodos descritos en la presente memoria tienen una amplia aplicación a muchos otros péptidos que son difíciles de medir y cuantificar.

Los péptidos sintéticos agregados (PSA) que comprenden una porción de un biomarcador agregado, tal como los agregados A $\beta$  se describen en el documento WO 2007/090126. Las mutaciones que reducen la agregación del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> se describen por Wurth *et al*, J Mol Biol 319: 1279-90, 2002. Un ensayo para la cuantificación simultánea de péptidos A $\beta$  de longitud completa en matrices biológicas se describe en el documento US 2002/0182660. Liao *et al*. (FEBS Letters 581:1161-65, 2007) informa sobre un estudio de la correlación entre la neurotoxicidad, la capacidad de agregación y la estructura secundaria usando péptidos A $\beta$  de secuencia truncada.

#### Breve descripción de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado que comprende el dominio inmunorreactivo N-terminal y el dominio inmunorreactivo C-terminal de A $\beta$ <sub>42</sub>, en el que los aminoácidos del dominio central de agregación 17-20 y varias longitudes del péptido C-terminal adyacente se reemplazan con un enlazador seleccionado de un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos EERP o DREP NR, enlazadores que consisten en un número entero de restos de lisina o un número entero de restos de ácido glutámico o un número entero de restos de alanina, polietilenglicoles (PEG) y dendrímeros y copolímeros ramificados capaces de unir restos de aminoácidos. En otro aspecto, la invención proporciona el uso del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado como un patrón de referencia en un inmunoensayo. En una realización, el inmunoensayo se selecciona del grupo que consiste en un inmunoensayo de tipo sándwich, un ensayo con un único anticuerpo, un inmunoensayo de doble sándwich y un ensayo de competición.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de péptido aislada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para medir la cantidad de un analito péptido A $\beta$  seleccionado de A $\beta$ <sub>42</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>38</sub> en una muestra biológica, comprendiendo el método: fijar un patrón de referencia a por lo menos dos esferas formando de esta manera un primer conjunto de esferas y un segundo conjunto de esferas, en el que el patrón de referencia comprende un epítipo reconocido por un primer anticuerpo de detección y en el que cada conjunto de esferas comprende una concentración diferente del patrón de referencia; fijar un anticuerpo de captura específico para el analito a un tercer conjunto de esferas; mezclar todos los conjuntos de esferas juntos para formar una micromatriz en suspensión; aplicar la muestra biológica a la micromatriz en suspensión con lo cual el analito se une al anticuerpo de captura en el tercer conjunto de esferas; añadir un primer anticuerpo de detección a la micromatriz en suspensión, en el que el primer anticuerpo de detección se une al patrón de referencia y al analito unido al anticuerpo de captura; medir una primera señal proveniente del primer anticuerpo de detección unido al

patrón de referencia en el primer conjunto de esferas; medir una segunda señal proveniente del primer anticuerpo de detección unido al patrón de referencia en el segundo conjunto de esferas; generar una curva patrón basada en la primera y segunda señales y cuantificar la cantidad del analito en el tercer conjunto de esferas midiendo una tercera señal proveniente del primer anticuerpo de detección y comparando la tercera señal con la primera y segunda mediciones de señal en la curva patrón.

En una realización, el patrón de referencia comprende un péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14.

En otra realización, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, células mononucleares de sangre periférica, linfocitos de sangre periférica, tejido, líquido cefalorraquídeo y células.

En otra realización, el método se lleva a cabo en una placa multi-pocillo, filtro de nitrocelulosa, fibra de vidrio o en un portaobjetos de vidrio. En otra realización, la primera señal y la segunda señal es una señal seleccionada del grupo que consiste en ficoeritrina, Alexa 532, estreptavidina-ficoeritrina y estreptavidina-Alexa 532. En otra realización, el patrón de referencia se une covalentemente a la esfera. En otra realización, el anticuerpo de captura se une covalentemente a la esfera. En otra realización, la fijación covalente es un enlace de carbodiimida.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para llevar a cabo un inmunoensayo para detectar el péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, comprendiendo el kit un péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de la presente invención

#### Breve descripción de las tablas

La Tabla 1 muestra las propiedades físicas deseables de los péptidos A $\beta$  y las pruebas usadas para medir esas propiedades.

La Tabla 2 muestra secuencias y descripciones del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> y de péptidos modificados.

La Tabla 3 muestra secuencias y descripciones del péptido tau y de péptidos modificados.

La Tabla 4 muestra la concentración medida del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> en tres muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) humano.

La Tabla 5 muestra una lista de los novedosos péptidos A $\beta$  que fueron caracterizados.

La Tabla 6 muestra un resumen de los datos de dispersión de luz dinámica (DLD).

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un esquema de un patrón soluble de dos lados o de tipo sándwich.

La Figura 2 muestra una curva de calibración de un ejemplo de inmunoensayo de sándwich de A $\beta$ <sub>42</sub>.

La Figura 3 muestra un ejemplo de ensayo sándwich de A $\beta$ <sub>42</sub> usando patrones de péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado.

La Figura 3A muestra una curva de calibración del patrón modificado 2 (SEC ID N.º: 2) y 4 (SEC ID N.º: 4).

La Figura 3B muestra una curva de calibración del patrón modificado 12 (SEC ID N.º: 12) y 13 (SEC ID N.º: 13).

La Figura 3C muestra una curva de calibración del patrón modificado 14 (SEC ID N.º: 14) y 6 (SEC ID N.º: 6).

La Figura 4 muestra un esquema del enfoque de esferas intra-ensayo de A $\beta$ <sub>42</sub>.

La Figura 5A muestra la mediana de intensidad de fluorescencia (MIF) medida de 6 diferentes conjuntos de esferas Luminex acopladas covalentemente con diferentes concentraciones de péptido AP 1-40 (SEC ID NO: 15).

La Figura 5B muestra curvas de calibración generadas por 4-PL de patrones intra-ensayo de A $\beta$ <sub>40</sub> (círculos) o de péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> nativos como un patrón soluble (triángulos), similares a la curva mostrada en la Figura 2.

La Figura 5C muestra los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> medidos en muestras de LCR humano utilizando una curva de calibración generada a partir de péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> solubles o de patrones de A $\beta$ <sub>40</sub> intra-ensayo.

La Figura 6 muestra los niveles de receptor de factor de crecimiento de insulina fosforilado 1 (IGF-1R) en lisados de células mononucleares de sangre periférica humana. Se generó una curva de calibración de 4 parámetros a partir de los valores MIF en los diferentes conjuntos de esferas (Figura 6A) y se usó para determinar los niveles relativos de IGF-1R fosforilado en lisados de CMSP (Figura 6B).

La Figura 7 muestra los datos de DLD.

La Figura 8 muestra un análisis de dicroísmo circular.

La Figura 9 muestra datos de estabilidad de péptidos. Los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa y siete péptidos modificados se sometieron a estudios de estabilidad a diferentes temperaturas durante un período de hasta 40 días.

La Figura 10 muestra una comparación de la curva patrón entre péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa y siete péptidos modificados.

La Figura 11 muestra el análisis de la curva patrón de péptidos de longitud completa frente a modificados.

La Figura 12 muestra un análisis de una muestra de LCF usando péptidos de longitud completa frente a modificados.

La Figura 13 muestra las estructuras de los separadores de polietilenglicol incorporados en los péptidos A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> modificados.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención puede entenderse más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y los ejemplos incluidos en la presente memoria.

5 Esta invención se refiere a péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> modificados que pueden usarse como patrones de referencia y calibradores para medir biomarcadores clínicos en un inmunoensayo. Esta invención se refiere también a métodos de uso de los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> modificados y a kits que comprenden los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> modificados. Específicamente, los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> modificados  
 10 y métodos de la presente invención están destinados a crear patrones de referencia de péptidos no agregantes para A $\beta$ <sub>42</sub> para su uso en formatos de inmunoensayo.

Esta invención se refiere también a kits que comprenden los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> modificados de la invención.

15 **Definiciones**

Según se usa en la presente memoria, el término "A $\beta$ " se refiere a amiloide beta.

20 Según se usa en la presente memoria, el término "A $\beta$ <sub>42</sub>" se refiere a amiloide beta 1-42. "A $\beta$ <sub>42</sub>" se refiere a un péptido de 42 aminoácidos de longitud que tiene una secuencia de aminoácidos como la indicada en la Tabla 2, SEC ID N.º: 1.

25 Según se usa en la presente memoria, el término "A $\beta$ <sub>38</sub>" se refiere a amiloide beta 1-38. "A $\beta$ <sub>38</sub>" se refiere a un péptido de 38 aminoácidos de longitud que tiene la secuencia DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG (SEC ID N.º: 17).

Según se usa en la presente memoria, el término "A $\beta$ <sub>40</sub>" se refiere a amiloide beta 1-40. "A $\beta$ <sub>40</sub>" se refiere a un péptido de 40 aminoácidos de longitud que tiene la secuencia indicada en la Tabla 2, SEC ID N.º: 15.

30 Según se usa en la presente memoria, el término "tau" se refiere a la proteína tau nativa que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en la tabla 3, SEC ID N.º: 20.

35 Según se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio, y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (es decir, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo (es decir, Fab, F(ab').sub.2 y Fv) siempre y cuando muestren actividad de unión o afinidad para un antígeno seleccionado. "Anticuerpo" también se puede referir a un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de los que cuelguen o se fusionen a proteínas/organismos portadores tales como fagos u otros portadores de presentación que tengan las mismas propiedades que los anticuerpos aislados.

40 Según se usa en la presente memoria, el término "aislado", según se usa en la presente memoria con referencia a las proteínas objetivo y complejos de proteínas, se refiere a una preparación de proteínas o complejo de proteínas que está esencialmente libre de proteínas contaminantes que normalmente estarían presentes con la proteína o complejo (es decir, en el medio celular en el cual la proteína o complejo se encuentra endógenamente). Así, un  
 45 complejo de proteínas aislado se aísla a partir de componentes celulares que normalmente "contaminarían" o interferirían con el estudio del complejo por separado, por ejemplo, mientras se hace un cribado para detectar moduladores del mismo. Debe entenderse, sin embargo, que este complejo "aislado" puede incorporar otras proteínas cuya modulación, por la presente proteína o complejo de proteínas, esté siendo investigada.

50 Según se usa en la presente memoria, el término "aislado" como también se usa en la presente memoria con respecto a ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas en una forma que no se presenta en la naturaleza. Además, un "ácido nucleico aislado" pretende incluir fragmentos de ácido nucleico que no se presentan naturalmente como fragmentos y que no se encontrarían en el estado natural.

55 Según se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico" se refiere a un polinucleótido tal como ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando sea adecuado, ácido ribonucleico (ARN). El término también se debe entender que incluye, como equivalentes, análogos ya sea de ARN o ADN hechos a partir de análogos de nucleótidos, y, según sea aplicable a la realización que se esté describiendo, polinucleótidos de una sola cadena (tales como de sentido o antisentido) o doble cadena. "Ácido nucleico" también se puede referir a un ácido nucleico péptido "APN" o  
 60 a un ADN o ARN sintetizado artificialmente.

65 Según se usa en la presente memoria, los términos "péptidos", "proteínas" y "polipéptidos" se usan indistintamente en la presente memoria. La expresión "proteína purificada" se refiere a una preparación de una proteína o proteínas que preferiblemente están en forma aislada, o de otra manera sustancialmente libres de, otras proteínas normalmente asociadas con la(s) proteína(s) en una célula o lisado celular. Según se usa en la presente memoria, el término "péptido modificado" se refiere a un péptido que ha sido modificado con relación a la secuencia nativa de

ese péptido. Por ejemplo, una modificación puede incluir la eliminación de un dominio dañino o la adición de un enlazador dentro de la secuencia de péptidos nativa.

5 Según se usa en la presente memoria, el término “unión” se refiere a una asociación directa entre dos moléculas, debido a, por ejemplo, interacciones covalentes, electrostáticas, hidrófobas, iónicas y/o de enlaces de hidrógeno en condiciones fisiológicas. Asimismo, “formación de complejos”, entre dos o más polipéptidos, se refiere a una asociación directa entre polipéptidos, debido a, por ejemplo, interacciones covalentes, electrostáticas, hidrófobas, iónicas y/o de enlaces de hidrógeno en condiciones fisiológicas.

10 Según se usa en la presente memoria, el término “dominio” se refiere a una región de una proteína que comprende una estructura particular y/o lleva a cabo una función particular (es decir, dominio de agregación, “dominio de fosforilación”). La expresión “dominio de agregación” según se usa en la presente memoria se refiere a una región de cinco aminoácidos localizada en los aminoácidos 16 a 20 (KLVFF (SEC ID N.º: 18)) que media la unión de péptidos A $\beta$  de una manera antiparalela.

15 Según se usa en la presente memoria, la expresión “dominio inmunorreactivo” se refiere a una región de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos particular que puede ser reconocida por un anticuerpo. Esta región incluye secuencias de aminoácidos que contienen modificaciones tales como glicosilación, metilación, fosforilación o cualquier otra modificación post-traduccional conocida por un experto con conocimientos ordinarios en la técnica. Ejemplos de aminoácidos que podrían ser fosforilados son los aminoácidos tirosina, serina o treonina. Un “dominio inmunorreactivo” que incluye aminoácidos que son fosforilados también sería caracterizado como un dominio de fosforilación. Un dominio “inmunorreactivo” también incluiría dos o más regiones de una proteína que estén en cercana proximidad entre sí en el estado doblado nativo de la proteína y que juntas comprenden un sitio de unión a anticuerpo.

25 Según se usa en la presente memoria, el término “inmunoensayo” se usa en la presente memoria para referirse a una prueba bioquímica que utiliza uno o más anticuerpos para medir la presencia o concentración de un analito en una matriz biológica. Este ensayo puede producir una señal mensurable en respuesta a una unión específica de un anticuerpo a un dominio inmunorreactivo de una proteína o péptido específico.

30 Patrones de referencia

35 En un aspecto, esta invención se refiere a composiciones que comprenden un péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado que pueden usarse como patrones de referencia y calibradores para medir biomarcadores clínicos. El péptido modificado puede comprender un enlazador en un dominio no inmunorreactivo. El dominio no inmunorreactivo es un dominio de agregación.

Alteraciones en el dominio de agregación o no inmunorreactivo

40 En un aspecto, la presente invención proporciona péptidos modificados que pueden usarse como patrones de referencia. Se conocen dominios o secuencias de aminoácidos que llevan a la auto-agregación y a interacciones no específicas de péptidos pegajosos tales como A $\beta$ <sub>42</sub> consigo mismos y otras moléculas. De esta forma, es posible construir patrones o calibradores que carezcan de estos dominios deletéreos. Una forma de modificar péptidos con el fin de eliminar los dominios deletéreos es eliminar los dominios deletéreos de la secuencia de aminoácidos, de modo que, en el caso de A $\beta$ <sub>42</sub>, y el dominio inmunorreactivo N-terminal está conectado al dominio inmunorreactivo C-terminal, no existiendo la secuencia central de 17-20 aminoácidos así como varias longitudes del péptido C-terminal adyacente. Ejemplos de péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> con los dominios centrales suprimidos se muestran en la Tabla 2, SEC ID N.º: 2, 3 y 4. De acuerdo con la presente invención, el dominio de agregación central más los aminoácidos adyacentes se reemplazan con un enlazador.

50 En una realización, los aminoácidos que no se agregan se consideran como el enlazador. En una realización, los aminoácidos que se no se agregan están en forma de un separador hidrófilo o enlazador de la secuencia de aminoácidos o forman EERP, mostrado tanto por la secuencia 37-42 C-terminal de A $\beta$ <sub>42</sub> (SEC ID N.º: 5) como por las porciones 32-42 C-terminal de A $\beta$ <sub>42</sub> (SEC ID N.º: 6). En otra realización, el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> incluye un enlazador hidrófilo más largo, por ejemplo la secuencia de aminoácidos DREPNR (SEC ID N.º: 16), tanto con las porción 37-42 C-terminal (SEC ID N.º: 7) como la 32-42 C-terminal (SEC ID N.º: 8) de A $\beta$ <sub>42</sub>.

60 En otra realización más, se usa una serie de restos cargados en forma del enlazador entre los dominios inmunorreactivos N-terminal y C-terminal. En otra realización, se crea un enlazador que consiste en un número entero  $m$  de restos de lisina (SEC ID N.º: 9) o un número entero  $n$  de restos de ácido glutámico (SEC ID N.º: 10). En otra realización, una cadena de restos neutros se usa como un enlazador. En otra realización, se contempla una construcción que consiste en un número entero  $p$  de restos de alanina (SEC ID N.º: 11).

65 En otra realización de la presente invención, se usan varias formas de polietilenglicol (PEG) como un enlazador. En una realización preferida, se usan PEG-6 átomos y PEG-20 átomos con varias porciones C-terminales (SEC ID N.º: 12-14). En otra realización, se usa como enlazador un dendrímero o copolímero ramificado con estructura química

capaz de acoplarse a restos de aminoácido. Estos polímeros de topología ramificada conocida simulan la inmunorreactividad de oligómeros de A $\beta$ <sub>42</sub> y otras moléculas pegajosas o autoagregantes similares.

5 En una realización, la construcción no produce auto-agregación ni absorción no específica a plásticos de laboratorio, en particular polipropileno, poliestireno, policarbono y otras resinas plásticas de laboratorio presentes en puntas de pipeta, tubos, placas y otros recipientes que contienen fluidos en los cuales se puede medir el analito de interés.

10 Los novedosos patrones o calibradores para inmunoensayo de A $\beta$ <sub>42</sub> o calibradores requieren la presencia del epítipo N-terminal que es reconocido por el anticuerpo específico del extremo N-terminal. Existen muchos anticuerpos de unión de extremos N-terminales a A $\beta$ <sub>42</sub> que se conocen en la técnica. Por ejemplo, se sabe que 6E10 reconoce el epítipo A $\beta$ <sub>38</sub> mientras que se sabe que 3D6 reconoce el epítipo N-terminal de A $\beta$ . Puede diseñarse un epítipo de superposición para permitir una selección de varios anticuerpos específicos de extremos N-terminales a utilizar, dependiendo de los requisitos del inmunoensayo y del sistema de detección.

15 Además, los novedosos patrones o calibradores para inmunoensayo de A $\beta$ <sub>42</sub> requieren la presencia del epítipo C-terminal que es reconocido por el anticuerpo específico de A $\beta$ <sub>42</sub> C-terminal. Ejemplos de anticuerpos de neo-epítopos de A $\beta$ <sub>42</sub> C-terminales bien caracterizados incluyen G2-11 (de la Universidad Heidelberg), 21F12 (de Athena Diagnostics), 4D7A3 (de Innogenetics) y 12F4 (de Covance, anteriormente Signet). Puede diseñarse un epítipo C-terminal superpuesto que permita una selección de varios anticuerpos específicos de A $\beta$ <sub>42</sub> C-terminales a utilizar, dependiendo de los requisitos del inmunoensayo y del sistema de detección.

25 En la presente memoria se describen también métodos para generar una construcción de péptidos o proteínas y composiciones de las mismas que se pueden usar como un patrón de referencia o calibrador en un inmunoensayo para medir la abundancia de un péptido de manera precisa en un fluido o muestra de extracto de tejido. Un inmunoensayo requiere comúnmente reactivos de captura biológicamente específicos, tales como anticuerpos, para capturar los analitos o los biomarcadores de interés. Los anticuerpos pueden producirse mediante métodos bien conocidos en la técnica, es decir, al inmunizar animales con los biomarcadores como antígenos. Los biomarcadores pueden ser aislados de muestras en función de sus características de unión. Como alternativa, si la secuencia de aminoácidos de un biomarcador de polipéptidos se conoce, el polipéptido puede ser sintetizado y usado para generar anticuerpos mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los biomarcadores son péptidos A $\beta$ .

30 Esta invención contempla inmunoensayos tradicionales que incluyen, por ejemplo, inmunoensayos sándwich como ELISA o inmunoensayos basados en fluorescencia, así como otros inmunoensayos enzimáticos. En el inmunoensayo basado en SELDI, un reactivo de captura biespecífico para el biomarcador es fijado a la superficie de una sonda de espectrometría de masas (EM), tal como una micromatriz PROTEINCHIP® pre-activada. El biomarcador se captura a continuación específicamente en el biochip a través de este reactivo y el biomarcador capturado se detecta por espectrometría de masas.

40 Así, en un aspecto, la invención se refiere a métodos para medir los marcadores clínicos con los patrones de referencia de la invención. En una realización, el patrón de referencia se mide mediante inmunoensayo. En otra realización, el inmunoensayo es un inmunoensayo de sándwich. En otra realización, el inmunoensayo es un inmunoensayo de un solo anticuerpo, realizado comúnmente en un modo competitivo o de "competencia" para sitios de unión inmunorreactivos. En otra realización más, el inmunoensayo es un inmunoensayo de sándwich doble o un ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas (ELISA).

45 En una realización preferida, el método para medir los marcadores clínicos es mediante el uso de un inmunoensayo que comprende las etapas de fijar un patrón de referencia a por lo menos dos esferas formando así un primer conjunto de esferas y un segundo conjunto de esferas, en el que el patrón de referencia comprende un epítipo reconocido por un primer anticuerpo de detección y en el que cada conjunto de esferas comprende una concentración diferente del patrón de referencia; fijar un anticuerpo de captura específico para el analito péptido A $\beta$  a un tercer conjunto de esferas; mezclar todos los conjuntos de esferas juntos para formar una micromatriz en suspensión; aplicar la muestra biológica a la micromatriz en suspensión con lo cual el analito se une al anticuerpo de captura en el tercer conjunto de esferas; añadir un primer anticuerpo de detección a la micromatriz en suspensión, en el que el primer anticuerpo de detección se une al patrón de referencia y al analito unido al anticuerpo de captura; medir una primera señal proveniente del primer anticuerpo de detección unido al patrón de referencia en un primer conjunto de esferas; medir una segunda señal proveniente del primer anticuerpo de detección unido al patrón de referencia en el segundo conjunto de esferas; generar una curva patrón basada en la primera y segunda señales; y cuantificar la cantidad del analito en el tercer conjunto de esferas mediante la medición de una tercera señal proveniente del primer anticuerpo de detección y comparar la tercera señal con la primera y segunda mediciones de señal en la curva patrón. Se entiende sin limitación de la presente invención que un conjunto de esferas podría ser reemplazado por cualquier otra fase sólida en la cual se pueda medir información multiplexada independientemente en una tecnología o instrumento de detección particular.

65 El patrón de referencia comprende un péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado descrito en la presente memoria. En otra realización, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, células mononucleares de sangre periférica, linfocitos de sangre periférica, tejido, líquido cefalorraquídeo y células. El analito péptido A $\beta$  es

A $\beta$ <sub>42</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub> o A $\beta$ <sub>38</sub>.

El analito y/o patrón de referencia puede unirse a varias superficies. Una superficie podría ser cualquier superficie de fase sólida a la cual un anticuerpo o patrón de referencia pueda ser inmovilizado mediante enlace covalente, absorbancia pasiva, biotina-estreptavidina o cualquier otro enlace conocido por experto con conocimientos ordinarios en la técnica. Por ejemplo, la superficie puede ser una esfera, placa, portaobjetos, fibra, sensores de resonancia de plasmones superficiales o cualquier superficie sólida.

En otra realización, el método se lleva a cabo en una placa multi-pocillos, filtro de nitrocelulosa o sobre un portaobjetos de vidrio. En otra realización, la primera y segunda señales son detectadas por fluorescencia. Por ejemplo, la primera señal y segunda señal puede ser una señal seleccionada del grupo que consiste en ficoeritrina, Alexa 532, estreptavidina-ficoeritrina y estreptavidina-Alexa 532. En otra realización, la señal se detecta por actividad enzimática (es decir, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina), quimioluminiscencia, radioactividad, emisión infrarroja, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o cualquier otro método conocido por cualquier experto con conocimientos ordinarios en la técnica.

En otro aspecto, la invención comprende un kit para llevar a cabo un inmunoensayo para detectar un péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, comprendiendo el kit un patrón de referencia de la invención.

Comparación del rendimiento del patrón o calibrador del inmunoensayo novedoso frente a A $\beta$ <sub>42</sub> nativo

El rendimiento de los patrones o calibradores para inmunoensayo novedosos debe ser comparable al del A $\beta$ <sub>42</sub> nativo en un inmunoensayo. Los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa nativos pueden ser sintetizados usando técnicas en fase sólida patrones o pueden ser adquiridos comercialmente de diferentes proveedores como un artículo de catálogo (Anaspec Inc., American Peptide Company, o Invitrogen, Inc.). Se pueden usar métodos estándar para verificar la abundancia de la construcción de longitud completa a partir de especies truncadas usando técnicas de espectrometría de masas, tales como análisis de aminoácidos que se conocen bien en la técnica (Kanu *et al.*, Journal of Mass Spectrometry, 43:1-22 (2008); Bernstein *et al.*, Journal of American Chemical Society 127:2075-2084 (2005); Li *et al.*, Encyclopedia of Analytical Chemistry, Meyers, R.A., ed., John Wiley & Sons Ltd. (2009)).

A modo de ejemplo, la Tabla 1 enumera las propiedades físicas deseables de péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> y los diferentes métodos usados para analizar estas propiedades. Estos métodos pueden emplearse para determinar si las propiedades del patrón de referencia son comparables con las del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> nativo.

Tabla 1

Propiedad	Prueba	Rango objetivo	Referencia
Solubilidad	SDS-PAGE	Más de 90 % de forma monomérica	Analy. Biochem., 316:223-231 (2003)
	Dispersión dinámica de la luz	Menos de 5 % de péptidos agregados	Meth. Enzymology, 309:429-459 (1999); J. Biol. Chem., 274:25945-25952 (1999)
Adsorción no específica	Recuperación selectiva en LCR o inmunoensayo de A $\beta$ <sub>42</sub> con tampón	Recuperación de entre 80 y 120 %	A $\beta$ Immunoassay Olsson <i>et al.</i> , Clinical Chemistry, 51:336-345 (2005)
Agregación	SDS-PAGE Transferencia Western	Más de 90 % de forma monomérica	PNAS, 100:330-335 (2003); Analy. Biochem., 316:223-231(2003)
	Ensayo de tioflavina T	Más de 90 % de forma monomérica	Meth. Enzymology, 309:274-284 (1999)
Formación de fibrillas	Microscopía (microscopía de transmisión de electrones, microscopía óptica (óptica, fuerza atómica)	Niveles mínimos de oligómeros o fibrillas observables	Protein Pep. Letters, 13:261-270 (2006); J. Am. Chem. Soc., 125:15359-15365 (2003)



Estabilidad a 25 °C, -20 °C y -80 °C	Menos de 20 % de CV en señal en comparación con Aβ <sub>42</sub> recién preparado por medio de inmunoensayo de Aβ <sub>42</sub>	2 horas 25 °C 3 meses -20 °C, 6 meses -80 °C	Olsson <i>et al.</i> , Clinical Chemistry, 51:336-345 (2005); Verwey <i>et al.</i> , Journal of Immunological Methods, 348:57-66 (2009)
--------------------------------------	---	--	---

Uso de patrones de referencia o calibradores modificados en inmunoensayos basados en anticuerpos

5 En otro aspecto de la presente invención, el patrón de referencia modificado se usa en un ensayo basado en un solo anticuerpo. En una realización, los inmunoensayos que contienen un solo anticuerpo pueden usarse para medir Aβ<sub>42</sub> en una muestra biológica mediante un ensayo de competencia. Un solo anticuerpo específico para Aβ<sub>42</sub> es inmovilizado en una superficie sólida tal como el pocillo de una placa de microtitulación, una esfera u otra superficie relevante para inmunoensayos. El anticuerpo puede enlazarse covalentemente por medio de muchos métodos diferentes tales como el enlace mediado por EDC de grupos carboxilo y amina, o por medio de absorbanza pasiva o a través de una interfaz de proteína A o proteína G. A continuación se genera un competidor Aβ<sub>42</sub> a partir de un patrón o calibrador Aβ<sub>42</sub> que contiene el péptido Aβ<sub>42</sub> de longitud completa o una versión modificada que conserva el epitopo del anticuerpo de captura. El competidor de Aβ<sub>42</sub> se usa para generar competencia entre el Aβ<sub>42</sub> nativo en la muestra biológica y el sitio de unión (parátipo) en el anticuerpo inmovilizado. Un parátipo es un término usado para describir la región de unión en el anticuerpo que reconoce el epitopo o dominio inmunorreactivo en el analito. El competidor de Aβ<sub>42</sub> se marca a efectos de detección. En una realización, el marcador es una enzima tal como peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. En otra realización, el marcador es una fluoresceína tal como ficoeritrina. En otra realización más, el marcador es otro marcador tal como biotina o rutenio. En otra realización adicional, el marcador es un ácido nucleico tal como ADN, ARN o APN, donde por detección del anticuerpo se cuantifica usando tecnología sensible para detectar el marcador de ácido nucleico, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se usa una sola concentración del competidor de Aβ<sub>42</sub> en el ensayo y se determinaría en función de la capacidad para competir con los niveles naturales de Aβ<sub>42</sub> encontrados en muestras biológicas.

25 En otra realización, el ensayo se hace cuantitativo mediante el establecimiento de una curva de calibración. En otra realización, la cuantificación se lleva a cabo con un conjunto de patrones o calibradores de Aβ<sub>42</sub> que son el péptido Aβ<sub>42</sub> de longitud completa o una versión modificada que conserva el epitopo del anticuerpo de captura. Estos patrones o calibradores no marcados se preparan en tampón o en una matriz biológica que no contenga Aβ<sub>42</sub>. En una realización, la curva de calibración se establece mezclando una de las concentraciones de los patrones o calibradores no marcados con el competidor de Aβ<sub>42</sub> marcado con el anticuerpo inmovilizado. El valor de la señal resultante de cada concentración probada de patrón o calibrador no marcado se usa para generar una curva patrón, representando gráficamente la concentración de los patrones o calibradores de Aβ<sub>42</sub> no marcados frente a los valores de señal resultantes. Una vez que se establece una curva cuantitativa patrón, se usa un ensayo para determinar los niveles de Aβ<sub>42</sub> nativo en muestras biológicas mezclando el competidor de Aβ<sub>42</sub> marcado a la misma concentración fija con la muestra biológica. El valor de señal resultante se representa gráficamente en la curva patrón para determinar el nivel de Aβ<sub>42</sub> en la muestra biológica.

35 En otro aspecto de la presente invención, el patrón de referencia modificado se usa en un inmunoensayo de sándwich.

40 Uso de patrones o calibradores modificados en inmunoensayos a base de patrones de referencia intra-ensayo.

45 En otro aspecto de la presente invención, los péptidos Aβ<sub>42</sub> se incorporan en un sistema de calibración intra-ensayo. En este enfoque, podría usarse un formato de inmunoensayo multiplexado tal como el sistema a base de esferas Luminex o el sistema a base de placa Meso-Scale Discovery ECL. Se generan péptidos que contienen restos de aminoácido que abarcan el epitopo de unión a anticuerpo del anticuerpo de detección. En una realización, estos péptidos incluyen modificaciones que les permite acoplarse covalentemente a una fase sólida o modificaciones que incrementan su solubilidad y uso en inmunoensayos acuosos. Estos péptidos son inmovilizados a concentraciones diferentes en la correspondiente fase sólida como se define por sistemas de inmunoensayo multiplexados con el fin de generar un conjunto de patrones bien definidos a partir de los cuales se cree una curva patrón.

50 La medición de los biomarcadores solubles en muestras médicas comúnmente se hace usando ensayos sándwich de anticuerpo dobles. Estos ensayos requieren dos anticuerpos que son específicos para el biomarcador y una tecnología en la cual se detecte el biomarcador capturado usando el segundo anticuerpo "reportero" o "de detección". Se requieren patrones de referencia de proteínas para poder hacer al ensayo cuantitativo. Estos patrones comúnmente están en forma de proteínas recombinantes; sin embargo, también se pueden obtener a partir de muestras biológicas. Los formatos de ensayo tradicionales para estos ensayos incluyen técnicas ELISA que proporcionan la cuantificación adecuada para el análisis de muestras clínicas. Sin embargo, comúnmente se limitan

a un ensayo de biomarcador por pocillo. Se han desarrollado tecnologías más nuevas que permiten analizar varios biomarcadores en un solo pocillo o recipiente de reacción. Algunas de las tecnologías multiplexadas utilizan anticuerpos transferidos sobre una superficie sólida tal como portaobjetos de vidrio o placas de microtitulación especializadas. Otro enfoque es mediante micromatrices en suspensión en donde los anticuerpos son unidos a esferas de látex las cuales se mezclan entre sí en solución para formar la micromatriz.

En una realización, se usa la tecnología de micromatrices en suspensión. En otra realización, la tecnología de micromatrices en suspensión es la tecnología Luminex xMAP. La tecnología Luminex xMAP usa esferas de látex que contienen una relación de dos colorantes fluorescentes. Se crean diferentes 'conjuntos' de esferas alterando la relación entre estos dos colorantes. Las esferas se mezclan entre sí para formar una micromatriz en suspensión. La mezcla de esferas se analiza mediante un instrumento que identifica cada esfera por la relación de fluorescencia mientras pasa enfrente de un láser. Estos conjuntos de esferas tienen diferentes modificaciones sobre su superficie que se usan para la fijación covalente de moléculas tales como proteínas, péptidos, anticuerpos, etc. Esto permite que el ensayo se lleve a cabo sobre la superficie de estas esferas. Los ensayos son cuantificados a través de la incorporación de un tercer marcador fluorescente tal como ficoeritrina a un anticuerpo reportero dirigido a los analitos de interés. Un segundo láser en el instrumento mide la fluorescencia de este marcador reportero a medida que las esferas se mueven a través del instrumento.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 – Ensayo sándwich que se puede usar para medir Aβ<sub>42</sub>

En la Figura 1 se muestra un esquema de un patrón soluble de dos lados o sándwich. Brevemente, se inmovilizaron anticuerpos de captura específicos para el extremo C de Aβ<sub>42</sub> sobre una superficie sólida. Se añadió una muestra biológica, lo que permitió que Aβ<sub>42</sub> fuera capturado por el anticuerpo inmovilizado. Se añadió un segundo anticuerpo de detección marcado que era específico para el extremo N del Aβ<sub>42</sub>. La señal medida generada por el anticuerpo de detección marcado se usó para cuantificación.

En la Figura 2 se muestra un ejemplo de un ensayo sándwich que se puede usar para medir Aβ<sub>42</sub>. Brevemente, un anticuerpo anti-C terminal de Aβ<sub>42</sub> marcado con biotina (565) se inmovilizó en una placa recubierta con estreptavidina Meso-Scale Discovery de 96 pocillos (MesoScale Discovery Inc., Gaithersburg, Maryland ((MSD)). Se añadieron a diferentes pocillos péptidos Aβ<sub>42</sub> como patrones de referencia (longitud completa con secuencia nativa). Los péptidos Aβ<sub>42</sub> fueron capturados por medio del anticuerpo de captura inmovilizado. Se añadió un segundo anticuerpo marcado con rutenio (Ru) al extremo N de Aβ<sub>42</sub> (26D6), completando el sándwich. El complejo se detectó usando un instrumento MSD sector 6000 usando ECL. Las unidades de fluorescencia brutas (RFU) medidas por el instrumento se ajustaron a un modelo logístico de 4 parámetros para crear una curva patrón. En otro ejemplo, se usan varios péptidos Aβ<sub>42</sub> modificados como un patrón de referencia (tabla 2, SEC ID N.º: 2, 4,12, 13 y 14). Las curvas patrones generadas por estos calibradores modificados se muestran en la Figura 3.

TABLA 2: Secuencias y descripciones de péptidos Aβ<sub>42</sub> y péptidos modificados

Secuencia del péptido/péptido modificado	Descripción de la secuencia del péptido/péptido modificado
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEC ID N.º: 1)	secuencia de Aβ <sub>42</sub> nativo
DAEFRHDSGYEVHMGVVIA (SEC ID N.º: 2)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-14)(35-42) sin espaciador en medio
DAEFRHDSGYEVHHQKGGVVIA (SEC ID N.º: 3)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)(37-42) sin espaciador en medio
DAEFRHDSGYEVHHQKIGLMVGGVVIA (SEC ID N.º: 4)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)(32-42) sin espaciador en medio
DAEFRHDSGYEVHHQKEERP <sup>GG</sup> VIA (SEC ID N.º: 5)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)-EERP-aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (37-42)
DAEFRHDSGYEVHHQKEERP <sup>IG</sup> LMVGGVIA (SEC ID N.º: 6)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)-EERP-aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (32-42)
DAEFRHDSGYEVHHQKDREERP <sup>GG</sup> VIA (SEC ID N.º: 7)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)-enlazador hidrófilo DREERP-aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (37-42)
DAEFRHDSGYEVHHQKDREP <sup>NR</sup> IGLMVGGVVIA (SEC ID N.º: 8)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)-enlazador hidrófilo DREP <sup>NR</sup> -aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (32-42)

(1-16)-( <u>Lys</u> ) <i>m</i> -(37-42) (SEC ID N.º: 9)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)- hasta 20 restos de lisina- aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (37-42)
(1-16)-( <u>Glu</u> ) <i>n</i> -(37-42) (SEC ID N.º: 10)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)- hasta 20 restos de ácido glutámico- aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (37-42)
(1-16)-( <u>Ala</u> ) <i>p</i> -(37-42) (SEC ID N.º: 11)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)- hasta 20 restos de alanina- aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (37-42)
<b>DAEFRHDSGYEVVHHQK-<u>PEG(20-ATOMS)3-</u> GGVVIA</b> (SEC ID N.º: 12)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)- enlazador (PEG_20)3-aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (37-42)
<b>DAEFRHDSGYEVVHHQK-<u>PEG(9-ATOMS)6-</u> MVGGVVIA</b> (SEC ID N.º: 13)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)- enlazador (PEG_9)6-aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (35-42)
<b>DAEFRHDSGYEVVHHQK-<u>PEG(9-ATOMS)5-</u> IGLMVGGVVIA</b> (SEC ID N.º: 14)	aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (1-16)- enlazador (PEG_9)5-aminoácidos de Aβ <sub>42</sub> nativo (32-42)
(X-Y)-Espaciador-(Z-42)	Genérico: X, Y, Z, espaciador a especificar
<b>DAEFRHDSGYEVVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI GLMVGGVV</b> (SEC ID N.º 15)	Secuencia de Aβ <sub>42</sub> nativo

También se puede usar un inmunoensayo para medir tau. Ejemplos de secuencias de péptidos tau modificados que se pueden usar como patrones de referencia de la presente invención se ilustran a continuación en la Tabla 3.

5

TABLA 3: Secuencias y construcciones del péptido tau

Secuencia del péptido/péptido modificado	Descripción de la secuencia del péptido/péptido modificado
MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQ EGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAE DVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTIPEGTTAEEAGIGDT PSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADG KTKIATPRGAAPPQKQGANATRIPAKTPPAPKTPSSG EPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRRTPLPTPTREPCKV AVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTE NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVP GGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHPGGGQVE VKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKL TFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSVDTSRHLNSVSST GSIDMVDSPLATLADDEVASLAKQGL (SEC ID N.º :20)	secuencia de tau nativo
EVMEDHAGTYGL-enlazador genérico-GAAPPQKQGAN (SEC ID N.º: 21)	aminoácidos de tau nativo (9-20) -enlazador genérico-aminoácidos de tau nativo (156-167)
EVMEDHAGTYGL-enlazador genérico-SGDRSGYSSP (SEC ID N.º: 22)	aminoácidos de tau nativo (9-20)-enlazador genérico-aminoácidos de tau nativo (191-200)
GAAPPQKQGAN-enlazador genérico- IPAKTPPAPKT <sub>(PO4)</sub> PPSSGEPK (SEC ID N.º: 23)	aminoácidos de tau nativo (156-167)-enlazador genérico-aminoácidos de tau nativo (171-190); el aminoácido T <sup>180</sup> está fosforilado

GAAPPGQKGQAN-enlazador genérico-REPKKVAVVRT <sub>(P04)</sub> PPKSPSSAK (SEC ID N.º: 24)	aminoácidos de tau nativo (156-167)-enlazador genérico-aminoácidos de tau nativo (221-240); el aminoácido T <sup>231</sup> está fosforilado
GAAPPGQKGQAN-enlazador genérico-SGDRSGYSSP (SEC ID N.º: 25)	aminoácidos de tau nativo (156-167)-enlazador genérico-aminoácidos de tau nativo (191-200)
IPAKTPPAPKT <sub>(P04)</sub> PPSSGEPPK-enlazador genérico-SGDRSGYSSP (SEC ID N.º: 26)	aminoácidos de tau nativo (171-190)-enlazador genérico-aminoácidos de tau nativo (191-200); el aminoácido T <sup>180</sup> está fosforilado
SGDRSGYSSP-enlazador genérico-REPKKVAVVRT <sub>(P04)</sub> PPKSPSSAK (SEC ID N.º: 27)	aminoácidos de tau nativo (191-200)-enlazador genérico-aminoácidos de tau nativo (221-240); el aminoácido T <sup>231</sup> está fosforilado

**Ejemplo 2 – Ensayo sándwich de Aβ<sub>42</sub> que mide Aβ<sub>42</sub> en muestras biológicas**

5 Un ejemplo de un ensayo de Aβ<sub>42</sub> sándwich que mide Aβ<sub>42</sub> en muestras biológicas se muestra en la Tabla 3. El anticuerpo anti-C terminal de Aβ<sub>42</sub> marcado con biotina (565) se inmovilizó en una placa recubierta con estreptavidina MSD de 96 pocillos. Se añadieron a diferentes pocillos péptidos Aβ<sub>42</sub> como patrones de referencia (longitud completa con secuencia nativa) o un patrón de referencia de Aβ<sub>42</sub> modificado (SEC ID N.º: 2). Se colocaron en diferentes pocillos muestras de LCR humano a diferentes diluciones. La placa se incubó 2 horas a temperatura ambiente para permitir que los péptidos Aβ<sub>42</sub> fueran capturados por el anticuerpo de captura inmovilizado. Se añadió un segundo anticuerpo marcado con rutenio (Ru) al extremo N de Aβ<sub>42</sub> (26D6), completando el sándwich. El complejo se detectó usando un instrumento MSD sector 6000 sector usando ECL. Las unidades de fluorescencia en bruto (RFU) medidas por el instrumento se ajustaron a un modelo logístico de 4 parámetros para crear una curva patrón. Las concentraciones medidas de Aβ<sub>42</sub> en muestras de LCR humano se muestran en la Tabla 3.

15 TABLA 4 – Concentración de péptido Aβ<sub>42</sub> medida en tres muestras de líquido ceforraquídeo (LCR) humano

Muestra de LCR	Dilución de LCR	Concentración de Aβ <sub>42</sub> (pg/ml)	
		Péptido Aβ <sub>42</sub> 1-42 de longitud completa	Péptido Aβ xx-42 modificado
LCR-1	dil 1:2	Por debajo del límite de detección	Por debajo del límite de detección
LCR-1	dil 1:4	Por debajo del límite de detección	Por debajo del límite de detección
LCR-2	dil 1:2	26,2	27,8
LCR-2	dil 1:4	54,0	56,8
LCR-3	dil 1:2	88,4	80,4
LCR-3	dil 1:4	134,4	126,4

**Ejemplo 3 – Ensayo Luminex intra-ensayo basado en el péptido Aβ**

20 La Figura 4 muestra un esquema del enfoque de esferas intra-ensayo de Aβ<sub>42</sub>. Se combinan conjuntos de esferas acoplados con diferentes concentraciones de péptidos patrón de Aβ<sub>42</sub> (u otros péptidos Aβ nativos o modificados) con un conjunto de esferas acoplado con un anticuerpo de captura específico anti-C terminal de Aβ<sub>42</sub> para formar una micromatriz en suspensión. La micromatriz se incubó con una muestra biológica, en donde el péptido Aβ<sub>42</sub> en la muestra biológica es capturado por la esfera acoplada con anticuerpo de captura anti-Aβ<sub>42</sub>. Un anticuerpo de detección marcado específico para el extremo N del péptido Aβ<sub>42</sub> se añade a la micromatriz en suspensión, uniéndose de esta manera el péptido Aβ<sub>42</sub> capturado y también las esferas que tienen péptidos Aβ<sub>42</sub> acoplados a su superficie. Los valores MIF obtenidos de las esferas con péptidos Aβ<sub>42</sub> acoplados a su superficie se usan para generar una curva de calibración intra-ensayo. La cantidad de Aβ<sub>42</sub> en la muestra biológica se determina a partir de la cantidad de Aβ<sub>42</sub> capturado en la esfera acoplada con el anticuerpo de captura anti-Aβ<sub>42</sub> usando la curva patrón intra-ensayo.

30 Anticuerpos y patrones de referencia

Los péptidos Aβ<sub>42</sub> de longitud completa nativo y Aβ<sub>40</sub> de longitud completa (SEC ID N.º: 1 y 15, respectivamente) se obtuvieron de American Peptide Company. El anticuerpo anti-C terminal de Aβ<sub>42</sub> humano de ratón 116B565.1 y el anticuerpo anti-N terminal de Aβ<sub>42</sub> humano de ratón 26D6-B2-B3 se obtuvieron por medio de purificación con proteína G de sobrenadantes de cultivo producidos por las líneas de células de hibridoma propiedad de BMS relevantes.

40 El conjugado de ficoeritrina-estreptavidina se obtuvo de Jackson Immunoresearch (West Grove, PA). El Tween-20, el clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), la azida de sodio, la seroalbúmina bovina libre de IgG (BSA) y el fosfato de sodio se adquirieron en Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO). La solución salina tamponada con fosfato (PBS) se obtuvo de Mediatech Incorporated (Herndon, VA). Las esferas Luminex carboxiladas se obtuvieron de Bio-Rad Incorporated (Hercules, CA). El anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra marcado con ficoeritrina se obtuvo de Jackson Immunoresearch (West Grove, PA). Acoplamiento covalente del anticuerpo de captura anti-Aβ<sub>42</sub> a esferas Luminex

El anticuerpo anti-C terminal de A $\beta$ <sub>42</sub> humano de ratón 116B565.1 se acopló covalentemente a la superficie de esferas carboxiladas usando un procedimiento de carbodiimida de dos etapas. Las esferas se lavaron mediante centrifugación de 1,25 x 10<sup>7</sup> esferas durante 5 minutos a 14.000 x g 4 °C en una centrifuga Eppendorf 5415D (Westbury, NY). El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se colocaron otras 1,25 x 10<sup>7</sup> esferas y se centrifugaron durante 5 minutos a 14.000 x g 4 °C. El sobrenadante se retiró de nuevo cuidadosamente y se resuspendió en 800  $\mu$ l de tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 4,8 (tampón de activación). Las esferas fueron después sometidas a agitación en vórtex durante 15 segundos y se sonicaron durante 15 segundos usando un SPER SCIENTIFIC® LTD 5 Ultrasonic Cleaner (Scottsdale, AZ). Las esferas se lavaron 2 veces adicionales con tampón de activación y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de EDC 5 mg/ml recién preparada en tampón de activación. Las esferas fueron incubadas en un rotador durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Al final de la etapa de EDC, las esferas fueron lavadas y resuspendidas en 1000  $\mu$ l de anticuerpo de captura 250  $\mu$ g/ml preparado en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un rotador protegido de la luz. Las esferas se lavaron e incubaron con 1 ml de tampón de bloqueo (PBS, 1 % (p/v) de BSA, 0,02 % (p/v) de Tween-20) en un rotador durante 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz. Finalmente, las esferas se contaron con un hemacitómetro, se resuspendieron en tampón de bloqueo a 2 x 10<sup>6</sup> esferas/ml y se almacenaron protegidas de la luz a 4 °C hasta estar listas para su uso.

Pruebas en superficie de la eficiencia del acoplamiento covalente de anticuerpos de captura A $\beta$ <sub>42</sub> a esferas Luminex

La presencia de anticuerpo de captura en la superficie de esferas se confirmó usando pruebas en superficie. Se añadieron 50  $\mu$ l de tampón de ensayo (PBS, BSA 1 % (p/v), Tween-20 0,05 % (p/v), azida 0,05 % (p/v)) que contenía 2.500 esferas a pocillos de una placa de fondo de filtro Millipore (Bedford, MA). Las esferas fueron lavadas colocando la placa sobre un colector de vacío Millipore (Bedford, MA) para retirar el líquido y luego se resuspendieron en 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de lavado PBST. Finalmente, el tampón de lavado se retiró de los pocillos mediante vacío y las esferas se incubaron con 100  $\mu$ l/pocillo de IgG anti-ratón de cabra-PE diluido 1/100 en tampón de ensayo. La placa se incubó en un agitador de placa de 96 pocillos (Lab Line Instruments, Melrose Park, IL) a 300 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Las esferas se lavaron posteriormente 3 veces mediante filtración al vacío usando 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de lavado y se resuspendieron en 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de ensayo. Se midió la MIF de al menos 50 esferas/pocillo usando un instrumento Luminex<sup>100</sup> obtenido de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA) ejecutando el software Bioplex manager 4.1.1. Se usó un valor de MIF de al menos 20.000 para confirmar la presencia de cantidades utilizables de anticuerpo sobre la superficie de las esferas.

Acoplamiento covalente de péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> intra- ensayo a esferas Luminex

Se prepararon péptidos de longitud completa nativos A $\beta$ <sub>40</sub> (SEC ID N.º: 15) reconstituyendo el péptido liofilizado en 2,5 ml de PBS para dar una concentración final de 10 mg/ml. Para este ensayo se seleccionaron péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> en lugar de péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> debido a que aún expresaban los epítomos de A $\beta$ <sub>42</sub> N-terminales necesarios para la unión de anticuerpos 26D6 y porque los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> eran más estables en tampones acuosos necesarios para conjugación. Los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> se diluyeron a diferentes concentraciones (mostradas en la Figura 5A) usando tampón diluyente (PBS, BSA 1 % (p/v), Tween-20 0,02 % (p/v)). Cada preparación de péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> se acopló covalentemente a la superficie de un conjunto de esferas seleccionado (diferente conjunto de esferas para cada concentración) usando un procedimiento de carbodiimida de dos etapas. Cada conjunto de esferas se lavó mediante centrifugación de 1,25 x 10<sup>7</sup> esferas durante 5 minutos a 14.000 x g 4 °C en una centrifuga Eppendorf 5415D 20 (Westbury, NY). El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se añadieron 800  $\mu$ l de tampón fosfato de sodio 0,1M, pH 4,8 (tampón de activación). Las esferas fueron a continuación agitadas en vórtex durante 15 segundos y se sonicaron durante 15 segundos usando un SPER SCIENTIFIC® LTD Ultrasonic Cleaner (Scottsdale, AZ). Las esferas fueron lavadas una vez más con tampón de activación y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de EDC 5 mg/ml recién preparada la cual fue preparada en tampón de activación. Las esferas se incubaron en un rotador durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Al final de la etapa de EDC, cada conjunto de esferas se lavó y se resuspendió con las concentraciones predeterminadas de péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en un rotador protegido de la luz. Los conjuntos de esferas se lavaron e incubaron con 1 ml de tampón de bloqueo (PBS, BSA 1 % (p/v), Tween-20, 0,02 % (p/v) en un rotador durante 1 hora a temperatura ambiente protegidos de la luz. Finalmente, la concentración de cada preparación de conjuntos de esferas se evaluó contando las esferas con un hemacitómetro. Cada conjunto de esferas se resuspendió a continuación en tampón de bloqueo a 2 x 10<sup>6</sup> esferas/ml y se almacenó protegido de la luz a 4 °C hasta estar listas para su uso.

Prueba de esferas Luminex acopladas a péptidos A $\beta$ <sub>40</sub>

La presencia de péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> que contienen epítomos N-terminales para los anticuerpos específicos del N terminal de A $\beta$ <sub>42</sub> sobre la superficie de esferas se confirmó usando pruebas en superficie. Se añadieron 50  $\mu$ l de tampón de ensayo (PBS, BSA 1 % (p/v), Tween-20 0,05 % (p/v), azida 0,05 % (p/v)) que contenía 2.500 esferas a pocillos de placa de fondo de filtro Millipore (Bedford, MA). Las esferas fueron lavadas colocando la placa sobre un colector de vacío Millipore (Bedford, MA) para eliminar el líquido y las esferas se resuspendieron en 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de lavado PBST. Finalmente, el tampón de lavado se retiró de los pocillos mediante vacío y las esferas se incubaron

con 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo 26D6-B2-B3 marcado con biotina diluido en tampón de ensayo. La placa se incubó en un agitador de placa de 96 pocillos (Lab Line Instruments, Melrose Park, IL) a 300 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Después de la etapa de incubación, las esferas se lavaron 4 veces, se resuspendieron en 50  $\mu$ l/pocillo de conjugado de ficoeritrina-estreptavidina 1  $\mu$ g/ml y se incubaron en un agitador de placa durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Las esferas se lavaron posteriormente tres veces mediante filtración al vacío usando 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de lavado y se resuspendieron en 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de ensayo. La MIF de al menos 50 esferas/pocillo se midió usando un instrumento Luminex<sup>100</sup> obtenido de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA) ejecutando el software Bioplex manager 4.1.1. El valor de MIF medido en cada uno de los conjuntos de esferas se muestra en la Figura 5A.

#### 10 Análisis intra-ensayo de A $\beta$ <sub>42</sub> de muestras biológicas

El análisis de muestras usando el ensayo a base de Luminex intra-ensayo se llevó a cabo mezclando primero conjuntos de esferas que fueron acoplados con anticuerpos de captura anti-A $\beta$ <sub>42</sub> específicos de C terminal 565 y conjuntos de esferas que fueron acoplados con diferentes concentraciones de péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> (mostrados en la Figura 5A). Se añadieron 50  $\mu$ l/pocillo de la mezcla combinada de todos los conjuntos de esferas a 50.000 esferas/ml de suspensión preparada en tampón de ensayo a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo de filtro prehumedecida. Las esferas fueron lavadas con 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de ensayo mediante filtración al vacío.

Las esferas capturadas se resuspendieron en 50  $\mu$ l de muestras de LCR humano diluidas, muestras de control de calidad (CC), diferentes concentraciones de péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> nativos de longitud completa como patrones de referencia o diferentes concentraciones de patrones de péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado en pocillos duplicados y se incubaron en un agitador de placa durante 1 hora a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se añadieron 1,0  $\mu$ g/ml de anticuerpo reportero 26D6 anti-A $\beta$ <sub>42</sub> marcado con biotina, y después se incubó en un agitador de placa durante 0,5 horas a temperatura ambiente protegido de la luz. Después de la etapa de incubación, las esferas se lavaron 4 veces, se resuspendieron en 50  $\mu$ l/pocillo de 1  $\mu$ g/ml de conjugado de ficoeritrina-estreptavidina y se incubaron en un agitador de placa durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Finalmente, las esferas se lavaron 4 veces y se resuspendieron en 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de ensayo. La MIF de al menos 50 esferas por pocillo se midió usando un instrumento Luminex Bioplex ejecutando el software Bioplex manager 5.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las curvas patrones fueron generadas a partir de los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> solubles o a partir de las señales generadas de los conjuntos de esferas recubiertos con diferentes concentraciones de péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> (intra-patrón) usando un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (Figura 5B). La concentración de péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> en las muestras de LCR o CC se calcularon a partir de la curva patrón relevante, y se muestran en la Figura 5C.

#### 35 Ejemplo de referencia 4 - Intra-ensayo a base de péptidos para IGF1R con esferas Luminex

A continuación se da otro ejemplo de un ensayo a base de intra-ensayo de péptidos para la detección de restos de tirosina fosforilados, 1162 y 1163, en receptores de IGF-1R humanos. Las regiones fosforiladas de Tau también pueden usarse de la misma manera.

#### 40 Anticuerpos y patrones de referencia

Un péptido IGF1R [PYPY<sup>1162/1163</sup>] hecho a la medida fue obtenido de Cambridge Research Biochemicals Ltd (RU). El anticuerpo de captura anti-IGF1R de ratón se obtuvo de Calbiochem (San Diego, CA) y el anticuerpo reportero anti-fosfo-tirosina (1162/1163)-IGF1R de conejo se adquirió en Millipore (Billerica, MA). El anticuerpo anti-conejo de cabra marcado con ficoeritrina se obtuvo de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). El Tween-20, el clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), la azida de sodio, la seroalbúmina bovina (BSA) libre de IgG y el fosfato de sodio se compraron de Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO). La solución salina tamponada con fosfato (PBS) se obtuvo de Mediatech Incorporated (Herndon, VA). Las esferas Luminex carboxiladas fueron adquiridas de Bio-Rad Incorporated (Hercules, CA). Las muestras de CMSP sanas normales se obtuvieron de donadores internos (BMS, NJ). Las muestras de CMSP se trataron con PBS o 100 ng/ml de IGF1 humano purificado (Genetex Inc., TX) durante 10 minutos a 37 °C para inducir la fosforilación del IGF1R presente en las células. Las células se lavaron, se lisaron con un tampón RIPA modificado y se almacenaron a -80 °C.

#### 55 Acoplamiento covalente del anticuerpo de captura anti-IGF-1R a esferas Luminex

El anticuerpo de captura anti-IGF1R humano de ratón se acopló covalentemente a la superficie de esferas carboxiladas usando un procedimiento de carbodiimida de dos etapas. Las esferas se lavaron centrifugando  $1,25 \times 10^7$  esferas durante 5 minutos a  $14.000 \times g$  4 °C en una centrifuga Eppendorf 5415D (Westbury, NY). El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se colocaron otras  $1,25 \times 10^7$  esferas y se centrifugaron durante 5 minutos a  $14.000 \times g$  4 °C. El sobrenadante se retiró cuidadosamente de nuevo y se resuspendió en 800  $\mu$ l de tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 4.8 (tampón de activación). Las esferas fueron después agitadas con vórtex durante 15 segundos y se sonicaron durante 15 segundos usando un SPER SCIENTIFIC® LTD Ultrasonic Cleaner (Scottsdale, AZ). Las esferas se lavaron 2 veces más con tampón de activación y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de EDC 5 mg/ml recién preparada la cual se preparó en tampón de activación. Las esferas fueron incubadas en un rotador durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Al final de la etapa de EDC, las esferas fueron lavadas y resuspendidas en 1000  $\mu$ l de 250  $\mu$ g/ml de anticuerpo de captura preparado en PBS y se incubaron durante 1 hora a

temperatura ambiente en un rotador protegido de la luz. Las esferas se lavaron e incubaron con 1 ml de tampón de bloqueo (PBS, BSA 1 % (p/v), Tween-20 0,02 % (p/v)) en un rotador durante 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz. Finalmente, las esferas se contaron con un hemacitómetro, se resuspendieron en tampón de bloqueo a  $2 \times 10^6$  esferas/ml y se almacenaron protegidas de la luz a 4 °C hasta estar listas para usar.

5

Pruebas de anticuerpos de captura IGF-1R acoplados covalentemente a esferas Luminex

La presencia de anticuerpos de captura en la superficie de las esferas se confirmó usando pruebas de superficie. Se añadieron 50 µl de tampón de ensayo (PBS, BSA 1 % (p/v), Tween-20 0,05 % (p/v), azida 0,05 % (p/v) que contenía 2.500 esferas a pocillos de placa de fondo de filtro Millipore (Bedford, MA). Las esferas se lavaron colocando la placa sobre un colector de vacío Millipore (Bedford, MA) para retirar el líquido y las esferas se resuspendieron en 100 µl/pocillo de tampón de lavado PBST. Finalmente, el tampón de lavado se retiró de los pocillos mediante vacío y las esferas fueron incubadas en 100 µl/pocillo de PE-GAM diluido 1/100 en tampón de ensayo. La placa se incubó en un agitador de placa de 96 pocillos (Lab Line Instruments, Melrose Park, IL) a 300 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Las esferas se lavaron posteriormente 3 veces mediante filtración al vacío usando 100 µl/pocillo de tampón de lavado y se resuspendieron en 100 µl/pocillo de tampón de ensayo. La MIF de por lo menos 50 esferas/pocillo se midió usando un instrumento Luminex<sup>100</sup> obtenido de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA) ejecutando el software Bioplex manager 4.1.1. Se usó un valor de MIF de al menos 20.000 para confirmar la presencia de cantidades utilizables de anticuerpo sobre la superficie de las esferas.

10

15

20

Acoplamiento covalente de patrones de péptido IGF-1R intra-ensayo a esferas Luminex

Se prepararon péptidos patrones de referencia de IGF1R [PYPY1162/1163] reconstituyendo el péptido liofilizado en 2,5 ml de PBS para dar una concentración final de 10 mg/ml. Se preparó una dilución de 10 veces inicial y posteriormente de 10 veces usando tampón diluyente (PBS, BSA 1 % (p/v), Tween-20 0,02 % (p/v)). El péptido fosfo-IGF1R se acopló covalentemente a la superficie de cuatro conjuntos diferentes de esferas carboxiladas a cuatro concentraciones diferentes usando un procedimiento de carbodiimida de dos etapas. Los conjuntos de esferas se lavaron centrifugando  $1,25 \times 10^7$  esferas durante 5 minutos a  $14.000 \times g$  4 °C en una centrífuga Eppendorf 5415D (Westbury, NY). El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se añadieron 800 µl de tampón fosfato de sodio 0,1M, pH 4,8 (tampón de activación). Las esferas se sometieron a agitación en vórtex durante 15 segundos y se sonicaron durante 15 segundos usando un SPER SCIENTIFIC® LTD Ultrasonic Cleaner (Scottsdale, AZ). Las esferas se lavaron una vez más con tampón de activación y se resuspendieron en 200 µl de EDC 5 mg/ml recién preparada, la cual se preparó en tampón de activación. Las esferas se incubaron en un rotador durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Al final de la etapa de EDC, cada esfera fue lavada y resuspendida con concentraciones individuales de 1.000, 100, 10 y 1 ng/ml de péptido fosfo-IGF1R preparado a partir de diluciones en serie de 10 veces de 10 mg/ml preparadas en PBS. Las esferas se incubaron después durante 1 hora a temperatura ambiente en un rotador protegido de la luz. Las esferas se lavaron y se incubaron con 1 ml de tampón de bloqueo (PBS, BSA 1 % (p/v), Tween-20 0,02 % (p/v)) en un rotador durante 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz. Finalmente, las esferas se contaron con un hemacitómetro, se resuspendieron en tampón de bloqueo a  $2 \times 10^6$  esferas/ml y se almacenaron protegidas de la luz a 4 °C hasta estar listas para usar.

25

30

35

40

Pruebas de esferas Luminex acopladas a péptido IGF-1R

La presencia de péptido fosfo-IGF1R sobre la superficie de esferas se confirmó usando pruebas en superficie. Se añadieron 50 µl de tampón de ensayo (PBS, BSA 1 % (p/v), Tween-20 0,05 % (p/v), azida 0,05 % (p/v) que contenía 2.500 esferas a pocillos de placa de fondo de filtro Millipore (Bedford, MA). Las esferas fueron lavadas colocando la placa sobre un colector de vacío Millipore (Bedford, MA) para retirar el líquido y las esferas se resuspendieron en 100 µl/pocillo de tampón de lavado PBST. Finalmente, el tampón de lavado se retiró de los pocillos mediante vacío y las esferas se incubaron con 100 µl/pocillo de anticuerpo anti-fosfo-IGF-1R de conejo diluido en tampón de ensayo. La placa se incubó en un agitador de placa de 96 pocillos (Lab Line Instruments, Melrose Park, IL) a 300 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Después de la etapa de incubación, las esferas se lavaron cuatro veces, se resuspendieron en 50 µl/pocillo de 1 pg/ml de conjugado anti-IgG de conejo de cabra marcado con ficoeritrina y se incubaron en un agitador de placa durante 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Las esferas se lavaron posteriormente tres veces mediante filtración al vacío usando 100 µl/pocillo de tampón de lavado y se resuspendieron en 100 µl/pocillo de tampón de ensayo. La MIF de al menos 50 esferas/pocillo se midió usando un instrumento Luminex<sup>100</sup> obtenido de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA) ejecutando el software Bioplex manager 4.1.1 péptido fosfo-IGF1R.

45

50

55

Análisis intra-ensayo de IGF-1R de muestras biológicas

El análisis de la muestra usando el ensayo a base de Luminex se llevó a cabo añadiendo 50 µl de una suspensión de 50.000 esferas/ml de anticuerpo de captura preparada en tampón de ensayo a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo con filtro pre-humedecido. Las esferas se lavaron con 100 µl/pocillo de tampón de ensayo mediante filtración al vacío. Las esferas de captura se resuspendieron en 50 µl de muestras diluidas, o muestras de control de calidad (CC) en pocillos duplicados y se incubaron en un agitador de placa durante 1 hora a temperatura ambiente protegida de la luz. Las esferas se lavaron cuatro veces, se resuspendieron en 50 µl de un conjunto de

60

65

50.000 esferas/ml de los cuatro conjuntos de esferas diferentes de péptido mencionados en la sección 2.2.3. Las esferas se filtraron, se resuspendieron en 50 µl/pocillo de 1,0 µg/ml de anticuerpo reportero anti-fosfo IGF1R y se incubaron en un agitador de placa durante 0,5 horas a temperatura ambiente protegidas de la luz. Después de la etapa de incubación, las esferas se lavaron 4 veces, se resuspendieron en 50 µl/pocillo de 1 µg/ml de IgG anti-conejo de cabra- PE y se incubaron en un agitador de placa durante 20 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Finalmente, las esferas se lavaron cuatro veces y se resuspendieron en 100 µl/pocillo de tampón de ensayo. La MIF de al menos 50 esferas por pocillo se midió usando un instrumento Bioplex Luminex ejecutando el software Bioplex manager 4.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La curva patrón generada a partir de la curva intra-patrón de fosfo-IGF-1R se muestra en la Figura 6A. La concentración de fosfo-IGF-1R en cada una de las muestras de lisados de SMCP usando el ajuste de curva logística de 4 parámetros intra-ensayo se muestra en la Figura 6B.

### Ejemplo 5 – Caracterización de péptidos Aβ

#### 15 Péptidos

Todos los péptidos fueron recibidos como polvo liofilizado. Los péptidos modificados se obtuvieron de GenScript (GS) y Anaspec (AN). Estos péptidos fueron sintetizados usando métodos en fase sólida conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Barany, G. *et al.*, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology - Special Methods in Peptide Synthesis*, Parte A, vol. 2, págs. 3-284, Gross, E. *et al.*, eds., Academic Press, Nueva York, publ. (1980); y en Stewart, J.M. *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, 2ª edición, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, publ. (1984)).

Los péptidos GS1-6 y AN7 fueron recibidos y reconstituidos en ddH2O hasta una concentración de 1 mg/ml. Estos se distribuyeron a continuación en alícuotas de 100 µl en los tubos blanco de 1,4 ml PP, matriz redonda (Thermo Scientific, cat#4249, lote 1030509). El péptido Aβ<sub>42</sub> de longitud completa se adquirió a MSD (lote # T03080X1). Este péptido se diluyó en DMSO para preparar una solución de 0,1 mg/ml. Después se hicieron alícuotas de 100 µl en los tubos blanco de 1,4 ml. Estos péptidos se mantuvieron congelados a -70 °C durante su almacenamiento. La Figura 13 muestra las estructuras de los separadores de polietilenglicol incorporados en los péptidos Aβ<sub>(1-42)</sub> modificados.

30

TABLA 5: Lista de péptidos Aβ

GS#	Secuencia del péptido	% de pureza (HPLC)	PM
GS 1	DAEFRHDSGYEVHHQK- {PEG(20-átomos)} 3- GGVVIA (SEC ID N.º:12)	95	3406,71
GS 2	DAEFRHDSGYEVHHQK- {PEG(9-átomos)} 6- MVGGVVIA (SEC ID N.º:13)	95	3553,02
GS 3	DAEFRHDSGYEVHHQK-PEG(9-ÁTOMOS)5- IGLMVGGVVIA (SEC ID N.º:14)	95	3691,15
GS 4	DAEFRHDSGYEVHHQKEERPIGLMVGGVVIA (SEC ID N.º: 6)	96	3476,91
GS 5	DAEFRHDSGYEVHHQKDREPNRIGLMVGGVVIA (SEC ID N.º: 8)	97	3733,17
GS 6	DAEFRHDSGYEVHHQKIGLMVGGVVIA (SEC ID N.º: 4)	98	2965,37
AN 7	DAEFRHDSGYEVHMGVVVIA (SEC ID N.º: 2)	90	2288,49
FL	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL MVGGVVIADAEFRHDSGYEVHMGVVVIA (SEC ID N.º:19)		

#### Dispersión de luz dinámica

Los péptidos novedosos (GenScript) se recibieron como polvos secos y se prepararon dos conjuntos de muestras de trabajo pesando pequeñas cantidades (~0,5 mg cada una) en tubos de polipropileno de 1,8 ml y disolviendo en un tampón fosfato simple (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7,4, Na Cl 10 mM, preparado en 99,9 % de D<sub>2</sub>O; filtrado a través de un

35



filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ ). Un conjunto se preparó a una concentración de 1,0 mg/ml, el segundo conjunto se preparó a 0,10 mg/ml y se almacenó a temperatura ambiente. Los péptidos se disolvieron mediante agitación en vórtice durante 1 minuto y se centrifugaron en una microcentrífuga durante 5 minutos a 14.000 rpm, a temperatura ambiente. Para las muestras de A $\beta$ <sub>42</sub> (MSD), los viales que contenían 0,1 mg de péptidos se suspendieron en 1,0 ml de tampón y se trataron como antes. Un volumen (200  $\mu\text{l}$ ) de cada solución de trabajo de 1,0 mg/ml centrifugada se transfirió a un tubo de polipropileno de 0,5 ml y se proporcionó para el análisis RMN.

Los espectros de absorbancia de todas las muestras fueron registrados (220-750 nm) usando un instrumento NANODROP® ND-1000 y se comparó el blanco contra el tampón. El análisis de dispersión de luz dinámica se llevó a cabo en los péptidos en una placa de poliestireno de 384 pocillos (CORNING®, tipo 3540) con un lector de placa Wyatt DLS DynaPro. La recolección y análisis de los datos se completaron usando el software del fabricante (DYNAMICS, versiones 7.0.0.94 y 7.0.1.12). Cada péptido se evaluó por triplicado cargando 30  $\mu\text{l}$  por pocillo y se cubrió con 5  $\mu\text{l}$  de aceite mineral, para minimizar la evaporación. Los blancos de tampón también se incluyeron en el análisis para comparación. Después de cargar la placa, se aplicó una cubierta de cinta selladora adhesiva transparente a la placa y la placa se centrifugó durante 2 minutos a 1.000 rpm. Cada muestra de la placa se leyó 30 veces, 5 segundos por adquisición, manteniendo una temperatura de 25 °C. Se recogieron conjuntos de datos tanto en las muestras de 1,0 mg/ml como de 0,10 mg/ml durante el transcurso de 27 días. La cubierta adhesiva se retiró para leer las muestras en el lector de placa y se usó para cubrir la placa entre lecturas durante el transcurso de 27 días.

Las Figuras 7A a 7F muestran datos de dispersión de luz dinámica. En la Figura 7, el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa se sometió a análisis DLD y se comparó con cuatro péptidos modificados representativos. Se observó que el péptido de longitud completa aparecía agregado, donde los resultados calculados mostraron que el radio de las diferentes especies de agregados estaba entre 82 y 231 nm de longitud. Esto se suma a agregados de gran peso molecular en la solución. Sin embargo, los péptidos modificados permanecen monoméricos como se determina por ambos pesos moleculares así como por el radio. GS#3 se contrastó con los demás péptidos porque mantenía cierta agregación (Figura 7E). Estos resultados demuestran que los péptidos modificados que carecen de un dominio de agregación, de hecho permanecen monoméricos en solución. La Figura 7A representa los datos en bruto acumulados para los cinco péptidos. Se muestra la auto-correlación de intensidad frente al tiempo. Cuanto más alto sea el número de auto-correlación de intensidad, más grandes son los diámetros de los péptidos en solución. Las Figuras 7b-7f ilustran la masa porcentual frente al radio de los péptidos. Los péptidos monoméricos podrían representarse por una masa porcentual más grande con el tamaño de radio más pequeño. Los péptidos agregados más grandes tienen menores masas porcentuales con un tamaño de radio mayor.

TABLA 6: Resumen de los datos de DLD

	Artículo	Radio (nm)	% Pd	Pm-R (kDa)	% Intensidad	% Masa
GS#1	Pico1	1,2	4,6	5,0	6,3	99,9
	Pico 2	48,4	3,9	29512,0	93,7	0,1
GS#2	Pico 1	0,9	4,3	3,0	1,6	98,0
	Pico 2	4,6	1,9	117,0	3,4	1,8
	Pico 3	36,9	3,8	15580,0	76,1	0,1
	Pico 4	172,0	4,5	572266,0	18,9	0,1
GS#3	Pico 1	4,5	0,0	119,0	0,4	57,9
	Pico 2	15,7	4,5	2101,0	4,8	19,7
	Pico 3	61,6	4,5	51794,0	94,8	22,4
GS#4	Pico 1	1,3	3,2	6,0	3,8	97,7
	Pico 2	6,0	0,0	225,0	0,6	0,2
	Pico 3	27,0	4,5	7527,0	5,2	0,0
	Pico 4	127,0	4,3	283287,0	25,1	0,2
FLA $\beta$ <sub>1-42</sub>	Pico 1	82,9	4,4	103812,0	50,4	26,1
	Pico 2	231,0	3,2	1149570,0	49,6	73,9

#### Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se recogieron usando un espectrómetro de dicroísmo circular Aviv modelo 202. Las muestras fueron pipeteadas en cubetas de cuarzo de longitud de trayectoria de 1 mm y se escanearon de 260 a 185 nm. Los parámetros para la recogida de datos incluyen ancho de banda espectral de 1,0 nm, un tamaño de etapa de 1,0 nm, un tiempo de promediado de 20 segundos por punto y ajuste de temperatura a 25 °C. Las muestras se almacenaron en las cubetas de cuarzo a temperatura ambiente y se escanearon durante un período de tiempo de 23 días. Los datos en bruto se corrigieron para las contribuciones del tampón blanco y se presentan en el formato de mdeg frente a la longitud de onda.

La Figura 8 muestra el análisis de dicroísmo circular. El análisis de dicroísmo circular se llevó a cabo en el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa y en cuatro péptidos representativos para determinar el orden y las estructuras

secundarias de estos péptidos. Como se muestra en la Figura 8, el péptido de longitud completa muestra una estructura más ordenada que la de los demás péptidos. Los cuatro péptidos representativos contienen un espectro de DC desordenado cuando se comparan con el péptido de longitud completa. Estos datos sugieren que los péptidos modificados no se agregan ni forman ninguna estructura de orden superior a diferencia del péptido de longitud completa.

#### ELISA MSD

El anticuerpo anti-A $\beta$ <sub>42</sub> C terminal marcado con biotina (565-20  $\mu$ g/ml) se inmovilizó en una placa recubierta con estreptavidina MSD de 96 pocillos añadiendo 30  $\mu$ l/pocillo. La placa se cubrió después y se incubó durante la noche a 25 °C, agitando a 500 rpm. Las placas se lavaron después 3x con 300  $\mu$ l/pocillo de tampón de lavado (R & D system cat # WA126). Después del lavado, se añadieron 225  $\mu$ l/pocillo de tampón de bloqueo (BSA 1 % + Tween-20 0,1 % en PBS) a la placa y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, agitando a 500 rpm. Una vez que se llevó a cabo la etapa de bloqueo, las placas se lavaron como se describió previamente. Se añadieron a los pocillos los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> como patrones de referencia (péptidos de longitud completa o péptidos modificados). Los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> fueron capturados por el anticuerpo de captura inmovilizado. Se añadió un segundo anticuerpo marcado con rutenio (RU) al extremo N de A $\beta$ <sub>42</sub> (26D6) completando de esta manera el sándwich. El complejo se detectó usando un instrumento MSD sector 6000 usando ECL. Las unidades de fluorescencia en bruto (RFU) medidas por el instrumento se ajustaron a un modelo logístico de 4 parámetros para crear una curva patrón.

La Figura 9 muestra los datos de estabilidad de los péptidos. El A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa y siete péptidos modificados fueron sometidos a estudios de estabilidad a diferentes temperaturas durante un período de hasta 40 días (Figuras 9A-9F). Estos péptidos se mantuvieron a 4 °C, 25 °C y 37 °C durante la duración de tiempo especificada y después se congelaron hasta el momento de llevar a cabo el ensayo. Los péptidos fueron a continuación recogidos y analizados en un formato de ELISA MSD. Los resultados se muestran como un porcentaje de la señal de la basal para cada péptido medido en el tiempo cero. De hecho, la incubación a corto plazo a 37 °C ha sido usada para estimar la estabilidad a largo plazo de moléculas a 4 °C y temperatura ambiente (Anderson *et al.*, Clinical Chemistry, 37 (3):398-402 (1991)). Por lo tanto, la incubación de los péptidos a 37 °C para el análisis a corto plazo puede usarse para evaluar la estabilidad a largo plazo de los péptidos. Como se muestra en la Figura 9, la señal del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa cae drásticamente a partir de las 16 horas de incubación a 37 °C. Por el contrario, los péptidos modificados permanecen estables a todas las temperaturas medidas. Estos datos sugerirían que estos péptidos modificados son más estables que el A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa.

Las Figuras 10A-10I muestran el A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa y siete péptidos modificados que fueron sometidos a estudios de estabilidad a diferentes temperaturas durante un período de hasta 60 días. Estos péptidos se mantuvieron a 25 °C y 37 °C durante la duración de tiempo especificada y posteriormente se congelaron hasta llevar a cabo el ensayo. Los péptidos se recogieron después y se analizaron en un formato de ELISA MSD. Los resultados se muestran como una curva patrón, donde se representa gráficamente la señal frente a la concentración de péptido. Como se muestra en la Figuras 10, el péptido de longitud completa dio curvas patrones decrecientes a 25 °C y 37 °C. En comparación, los siete péptidos analizados dieron curvas similares en todos los puntos de tiempo e intervalos de temperaturas (solo se muestra 37 °C). Los resultados sugieren que los péptidos modificados darán una señal más homogénea que el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa cuando se usa como un patrón para la reproducibilidad de ensayos.

La Figura 11 muestra el análisis de la curva patrón de péptidos de longitud completa frente a los modificados. El A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa y siete péptidos modificados fueron diluidos para una curva de calibración de ocho puntos y se analizaron en el formato de ELISA MSD. Como se muestra en la Figura 11, todos los péptidos produjeron curvas patrones casi idénticas. Este resultado sugiere que los péptidos modificados pueden usarse en lugar del péptido de longitud completa para el cálculo de A $\beta$ <sub>42</sub> en matrices de muestra.

La Figura 12 muestra un análisis de una muestra de LCR usando péptidos de longitud completa frente a modificados. El A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa y siete péptidos modificados fueron diluidos para una curva de calibración de ocho puntos y se analizaron en el formato de ELISA MSD con 13 muestras de LCR. La concentración de A $\beta$  en cada muestra de LCR se calculó basándose en la curva patrón para cada péptido. Como se muestra en la Figura 12, las concentraciones de A $\beta$  calculadas de nuevo en las muestras de LCR fueron equivalentes e independientes del péptido A $\beta$  usado para la curva patrón. Esto sugiere que estos péptidos modificados pueden usarse en lugar del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> de longitud completa en estos ensayos sin afectar los cálculos de las concentraciones de A $\beta$ .

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company  
Rhyne, Paul

<120> PATRONES PARA INMUNOENSAYO Y MEDICIÓN DE BIOMARCADORES CLÍNICOS USANDO PATRONES DE CALIBRACIÓN INTRA-ENSAYO

<130> 11513 PCT  
 <150> 61/302835  
 <151> 09-02-2010  
 5 <160> 27  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 10 <210> 1  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Péptido  
 <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  
 20 35 40  
  
 <210> 2  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido Modificado  
 30 <400> 2  
  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Met Val Gly  
 1 5 10 15  
  
 Gly Val Val Ile Ala  
 20  
  
 <210> 3  
 35 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> Péptido Modificado  
 <400> 3

ES 2 562 609 T3

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

Gly Gly Val Val Ile Ala  
 20

5 <210> 4  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Modificado  
 <400> 4

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

Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
 20 25

15 <210> 5  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Modificado  
 <400> 5

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

Glu Glu Arg Pro Gly Gly Val Val Ile Ala  
 20 25

25 <210> 6  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido Modificado  
 <400> 6

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

Glu Glu Arg Pro Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
 20 25 30

40 <210> 7  
 <211> 28  
 <212> PRT

ES 2 562 609 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Modificado

5

<400> 7

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

Asp Arg Glu Glu Arg Pro Gly Gly Val Val Ile Ala  
20 25

10

<210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Péptido Modificado

<400> 8

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

Asp Arg Glu Pro Asn Arg Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile  
20 25 30

20

Ala

<210> 9

<211> 23

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Modificado

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (17)..(36)

<223> Xaa representa hasta 20 restos de Lys localizados entre Lys en la posición 16 y Gly en la posición 18

35

<400> 9

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

Xaa Gly Gly Val Val Ile Ala  
20

40

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>



<210> 13  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido Modificado  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (17)..(34)  
 <223> La secuencia comprende un enlazador PEG(9-ÁTOMOS)6 localizado entre Lys en la posición 16 y Met en la posición 17  
  
 15 <400> 13  
  

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

<b>Met</b>	<b>Val</b>	<b>Gly</b>	<b>Gly</b>	<b>Val</b>	<b>Val</b>	<b>Ile</b>	<b>Ala</b>
						20	

  
 20 <210> 14  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Péptido Modificado  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <222> (17)..(31)  
 <223> La secuencia comprende un enlazador PEG(9-ÁTOMOS)5 localizado entre Lys en la posición 16 y Ile en la posición 17  
  
 <400> 14  
  
 35 <210> 14  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  

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

<b>Ile</b>	<b>Gly</b>	<b>Leu</b>	<b>Met</b>	<b>Val</b>	<b>Gly</b>	<b>Gly</b>	<b>Val</b>	<b>Val</b>	<b>Ile</b>	<b>Ala</b>
			20					25		

  
 40 <210> 15  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido Modificado  
  
 45 <400> 15

ES 2 562 609 T3

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  
 35 40

5 <210> 16  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Modificado  
 <400> 16

Asp Arg Glu Pro Asn Arg  
 1 5

15 <210> 17  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido Modificado  
 <400> 17

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  
 35

25  
 30 <210> 18  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido Modificado  
 35 <400> 18

Lys Leu Val Phe Phe  
 1 5

40 <210> 19  
 <211> 63  
 <212> PRT



ES 2 562 609 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Modificado

5

<400> 19

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 Asp Ala Glu Phe Arg His  
35 40 45

Asp Ser Gly Tyr Glu Val His Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
50 55 60

10 <210> 20

<211> 441

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Péptido Modificado

<400> 20

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His  
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu  
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser  
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val  
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu  
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro  
100 105 110

20

ES 2 562 609 T3

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val  
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly  
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro  
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly  
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser  
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys  
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys  
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val  
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly  
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln  
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly  
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser  
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln  
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser  
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn  
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala

ES 2 562 609 T3

370

375

380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser  
405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val  
420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
435 440

<210> 21

<211> 24

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Péptido Modificado

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(13)

15 <223> La secuencia comprende un enlazador genérico localizado entre Leu en la posición 12 y Gly en la posición 13

<400> 21

Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Ala Ala Pro  
1 5 10 15

Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn  
20

20 <210> 22

<211> 22

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido Modificado

<220>

30 <221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(13)

<223> La secuencia comprende un enlazador genérico localizado entre Leu en la posición 12 y Ser en la posición 13

35 <400> 22

Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Ser Gly Asp Arg  
1 5 10 15

ES 2 562 609 T3

Ser Gly Tyr Ser Ser Pro  
20

5 <210> 23  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido Modificado

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(13)  
 <223> La secuencia comprende un enlazador genérico localizado entre Asn en la posición 12 y Ile en la posición 13

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (23)..(23)  
 <223> La secuencia comprende un fosfato en Thr en la posición 23

<400> 23

Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ile Pro Ala Lys  
 1 5 10 15

Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys  
 20 25 30

25 <210> 24  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Péptido Modificado

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(13)  
 <223> La secuencia comprende un enlazador genérico localizado entre Asn en la posición 12 y Arg en la posición 13

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (23)..(23)  
 <223> Un fosfato en Thr en la posición 23

45 <400> 24

Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Arg Glu Pro Lys  
 1 5 10 15

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys  
 20 25 30

50 <210> 25  
 <211> 22

ES 2 562 609 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Péptido Modificado

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(13)  
 10 <223> La secuencia comprende un enlazador genérico localizado entre Asn en la posición 12 y Ser en la posición 13

<400> 25

Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ser Gly Asp Arg  
 1 5 10 15

Ser Gly Tyr Ser Ser Pro  
 20

15

<210> 26  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido Modificado

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(13)  
 <223> Un fosfato en Thr en la posición 11

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(22)  
 <223> La secuencia comprende un enlazador genérico localizados entre Lys en la posición 21 y Ser en la posición 22

35 <400> 26

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro  
 20 25 30

40 <210> 27  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido modificado

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(11)  
 50 <223> La secuencia comprende un enlazador genérico entre Pro en la posición 10 y Arg en la posición 11

<220>

ES 2 562 609 T3

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (21)..(22)  
<223> Un fosfato en Thr en la posición 21

5 <400> 27

Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Arg Glu Pro Lys Lys Val  
1 5 10 15

Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys  
20 25 30

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado que comprende el dominio inmunorreactivo N-terminal y el dominio inmunorreactivo C-terminal de A $\beta$ <sub>42</sub>, en el que los aminoácidos del dominio de agregación central 17-20 y diversas longitudes del péptido C-terminal adyacente están reemplazados con un enlazador seleccionado de:
- un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos EERP o DREPNR,
  - enlazadores que consisten en un número entero de restos de lisina o un número entero de restos de ácido glutámico o un número entero de restos de alanina,
  - polietilenglicoles (PEG) y
  - dendrímeros y copolímeros ramificados capaces de acoplar restos de aminoácidos.
2. El péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de la reivindicación 1, en el que el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos EERP o DREPNR.
3. El péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de la reivindicación 2 que tiene una secuencia como se establece en una cualquiera de las SEC ID N.º: 5-8.
4. El péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de la reivindicación 1, en el que el enlazador consiste en un número entero de restos de lisina o un número entero de restos de ácido glutámico o un número entero de restos de alanina.
5. El péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de la reivindicación 4 que tiene una secuencia como se establece en una cualquiera de las SEC ID N.º: 9-11.
6. El péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de la reivindicación 1, en el que el enlazador es un polietilenglicol (PEG).
7. El péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de la reivindicación 6 que tiene una secuencia como se establece en cualquiera de las SEC ID N.º: 12-14.
8. El péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de la reivindicación 6 que tiene una secuencia como se establece en la SEC ID N.º: 14.
9. El péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de la reivindicación 1, en el que el enlazador se selecciona de dendrímeros y copolímeros ramificados capaces de acoplar restos de aminoácidos.
10. El péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende el epítipo reconocido por un anticuerpo específico del extremo N-terminal de A $\beta$ <sub>42</sub>.
11. El péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que comprende el epítipo reconocido por un anticuerpo específico del extremo C-terminal de A $\beta$ <sub>42</sub>.
12. Uso de un péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 como un patrón de referencia en un inmunoensayo.
13. El uso de la reivindicación 12, en el que el inmunoensayo se selecciona del grupo que consiste en un inmunoensayo de sándwich, un ensayo de un solo anticuerpo, un inmunoensayo de sándwich doble y un ensayo de competición.
14. Un método para medir la cantidad de un analito péptido beta amiloide (A $\beta$ ) seleccionado entre A $\beta$ <sub>42</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>38</sub> en una muestra biológica, comprendiendo el método:
- (a) fijar un patrón de referencia a por lo menos dos esferas formando de esta manera un primer conjunto de esferas y un segundo conjunto de esferas, en donde el patrón de referencia comprende un epítipo reconocido por un primer anticuerpo de detección y en donde cada conjunto de esferas comprende una concentración diferente del patrón de referencia;
  - (b) fijar un anticuerpo de captura específico para el analito a un tercer conjunto de esferas;
  - (c) mezclar todos los conjuntos de esferas juntos para formar una micromatriz en suspensión;
  - (d) aplicar la muestra biológica a la micromatriz en suspensión con lo cual el analito se une al anticuerpo de captura en el tercer conjunto de esferas;
  - (e) añadir un primer anticuerpo de detección a la micromatriz en suspensión, en donde el primer anticuerpo de detección se une al patrón de referencia y al analito unido al anticuerpo de captura;
  - (f) medir una primera señal proveniente del primer anticuerpo de detección unido al patrón de referencia en el primer conjunto de esferas;
  - (g) medir una segunda señal proveniente del primer anticuerpo de detección unido al patrón de referencia en el segundo conjunto de esferas;
  - (h) generar una curva patrón basada en la primera y la segunda señales y
  - (i) cuantificar la cantidad del analito en el tercer conjunto de esferas midiendo una tercera señal proveniente

del primer anticuerpo de detección y comparando la tercera señal con la primera y la segunda mediciones de señal en la curva patrón,

5 en el que el patrón de referencia comprende el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

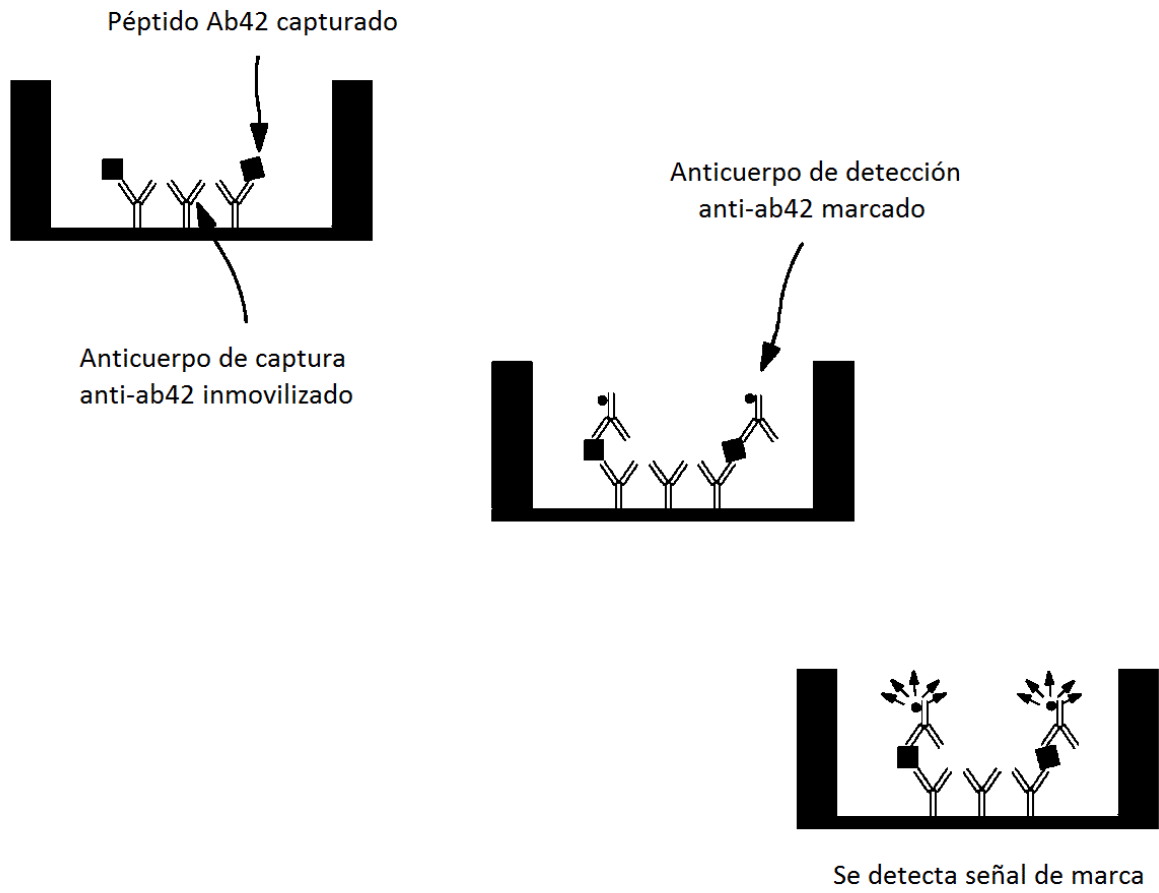
10 15. El método de la reivindicación 14, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, células mononucleares de sangre periférica, linfocitos de sangre periférica, tejido, líquido cefalorraquídeo y células.

10 16. El método de la reivindicación 14, en donde el método se realiza en una placa multi-pocillo, un filtro de nitrocelulosa, una fibra de vidrio o en un portaobjetos de vidrio.

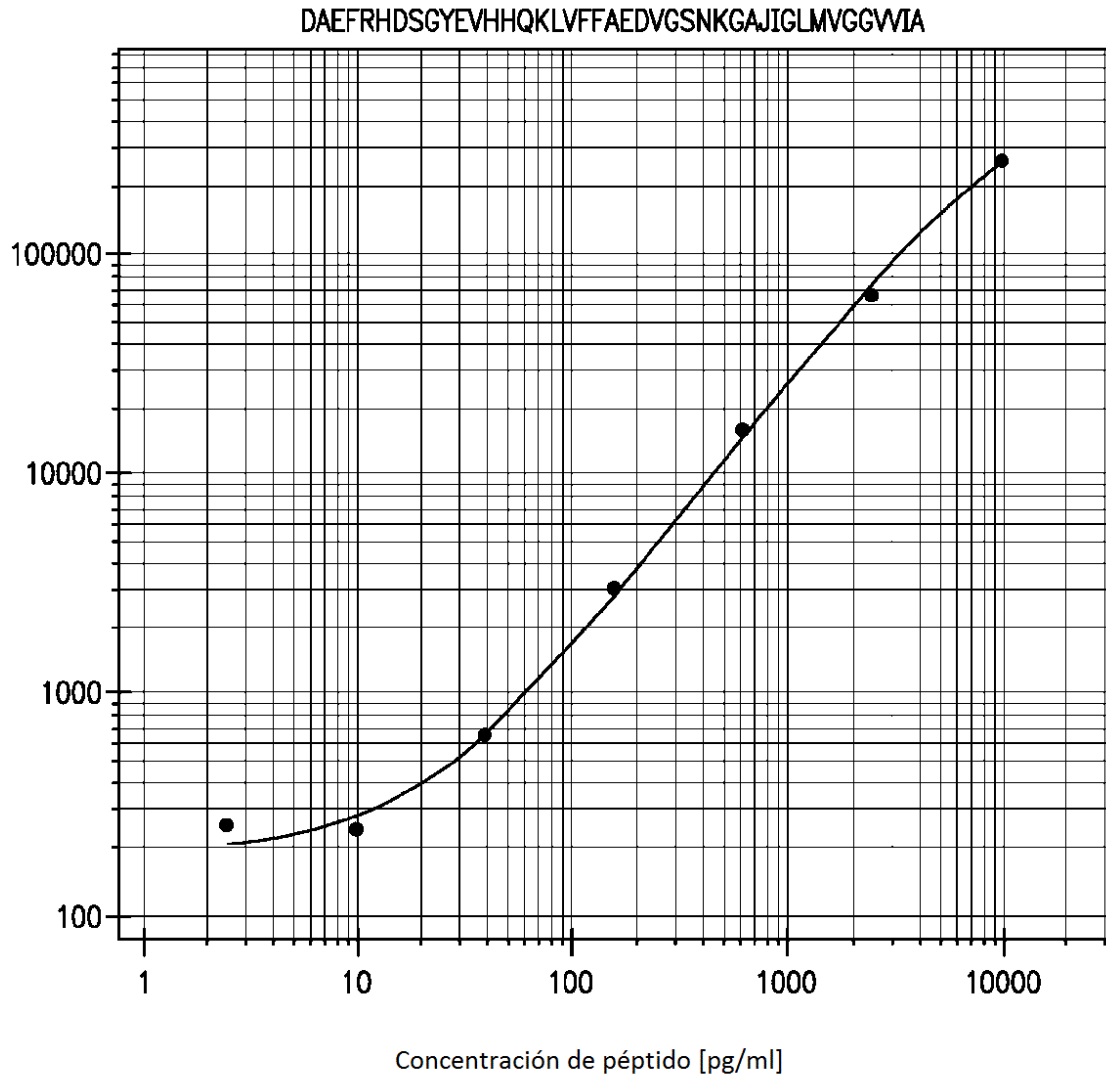
15 17. El método de la reivindicación 14, en el que la primera señal y la segunda señal son una señal seleccionada del grupo que consiste en ficoeritrina, Alexa 532, estreptavidina-ficoeritrina y estreptavidina-Alexa 532.

18. Un kit para la realización de un inmunoensayo para detectar el péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, comprendiendo el kit el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.





**FIG. 1**



**FIG. 2**

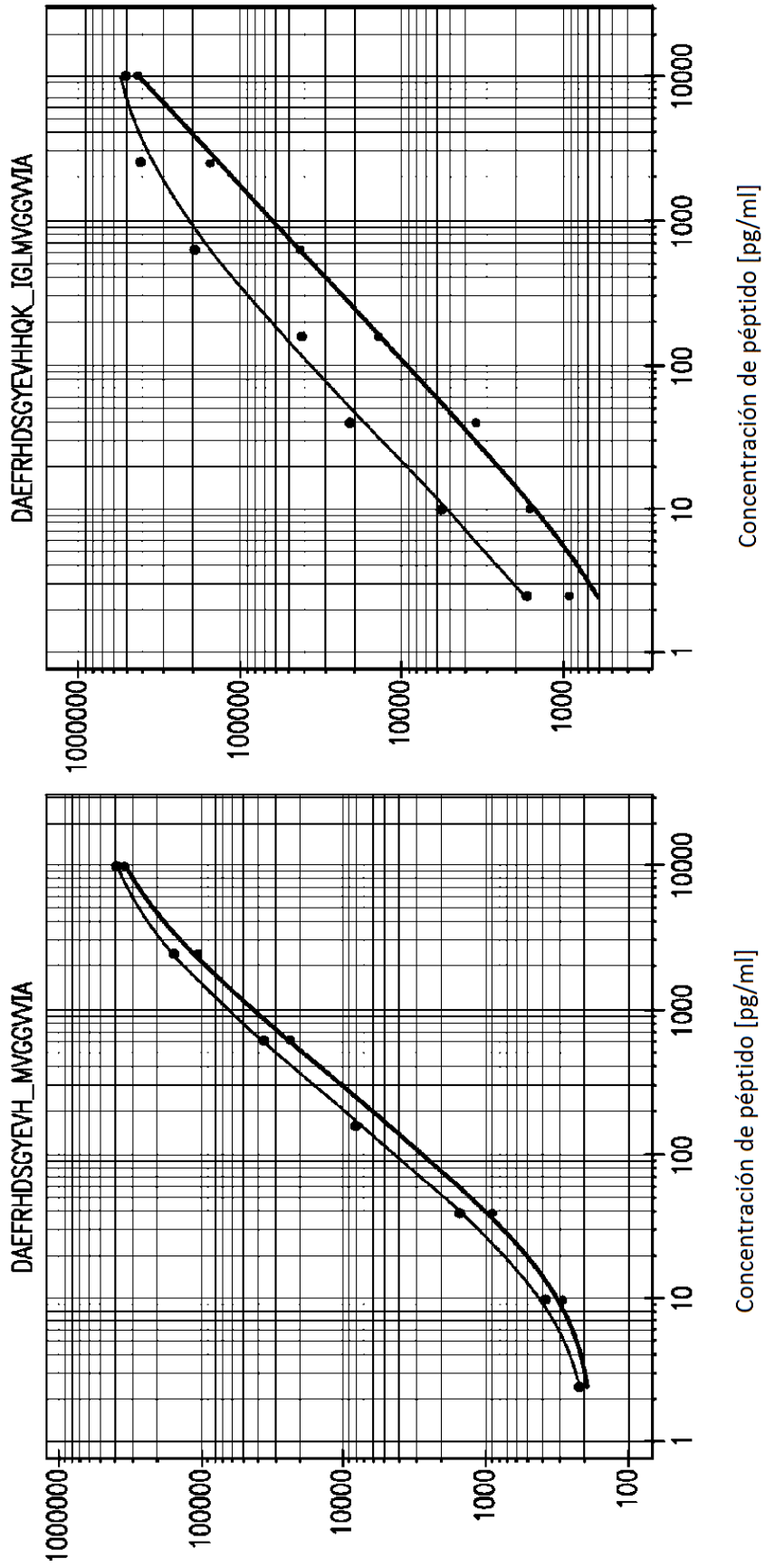
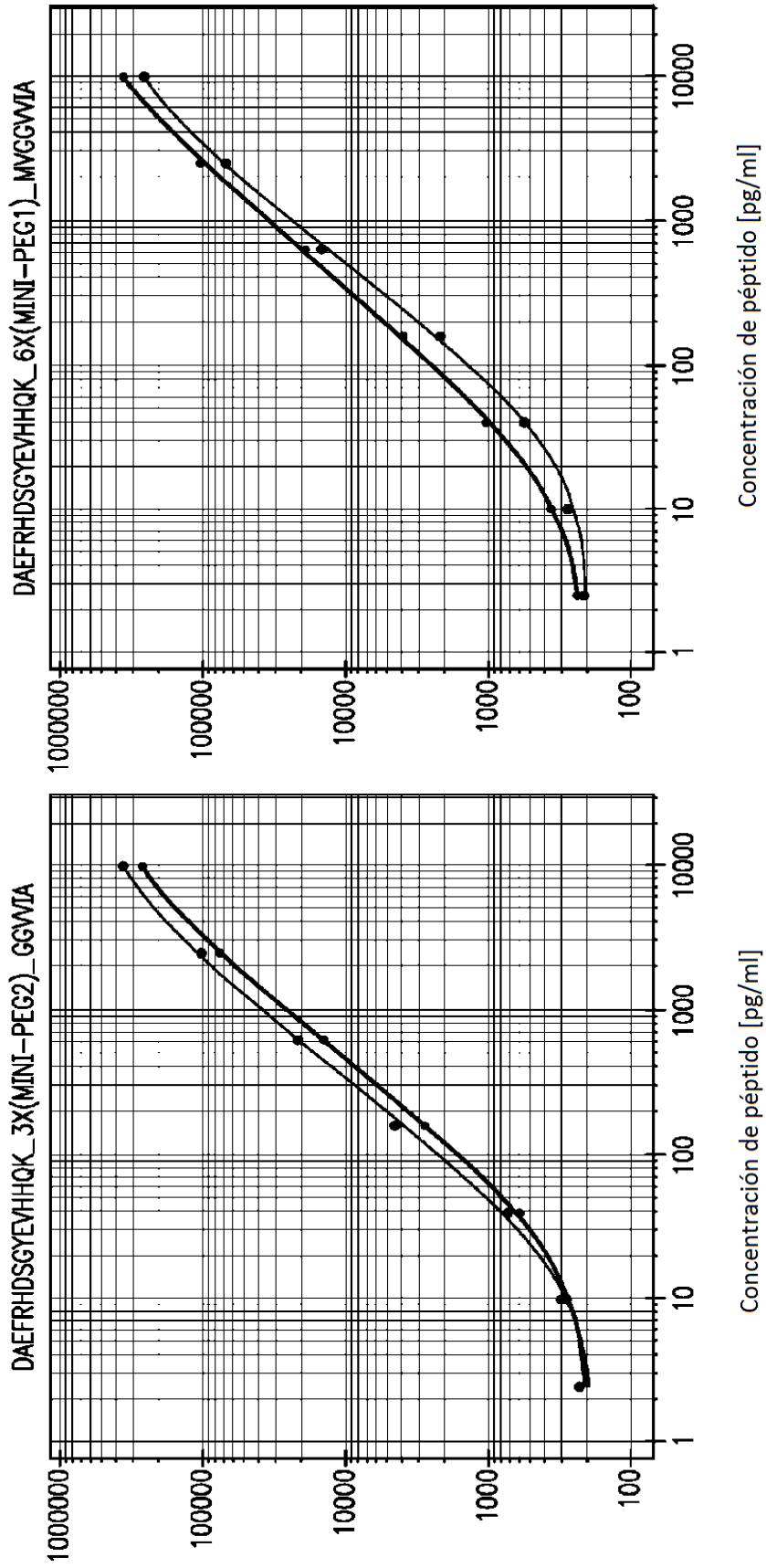


FIG. 3A



**FIG. 3B**

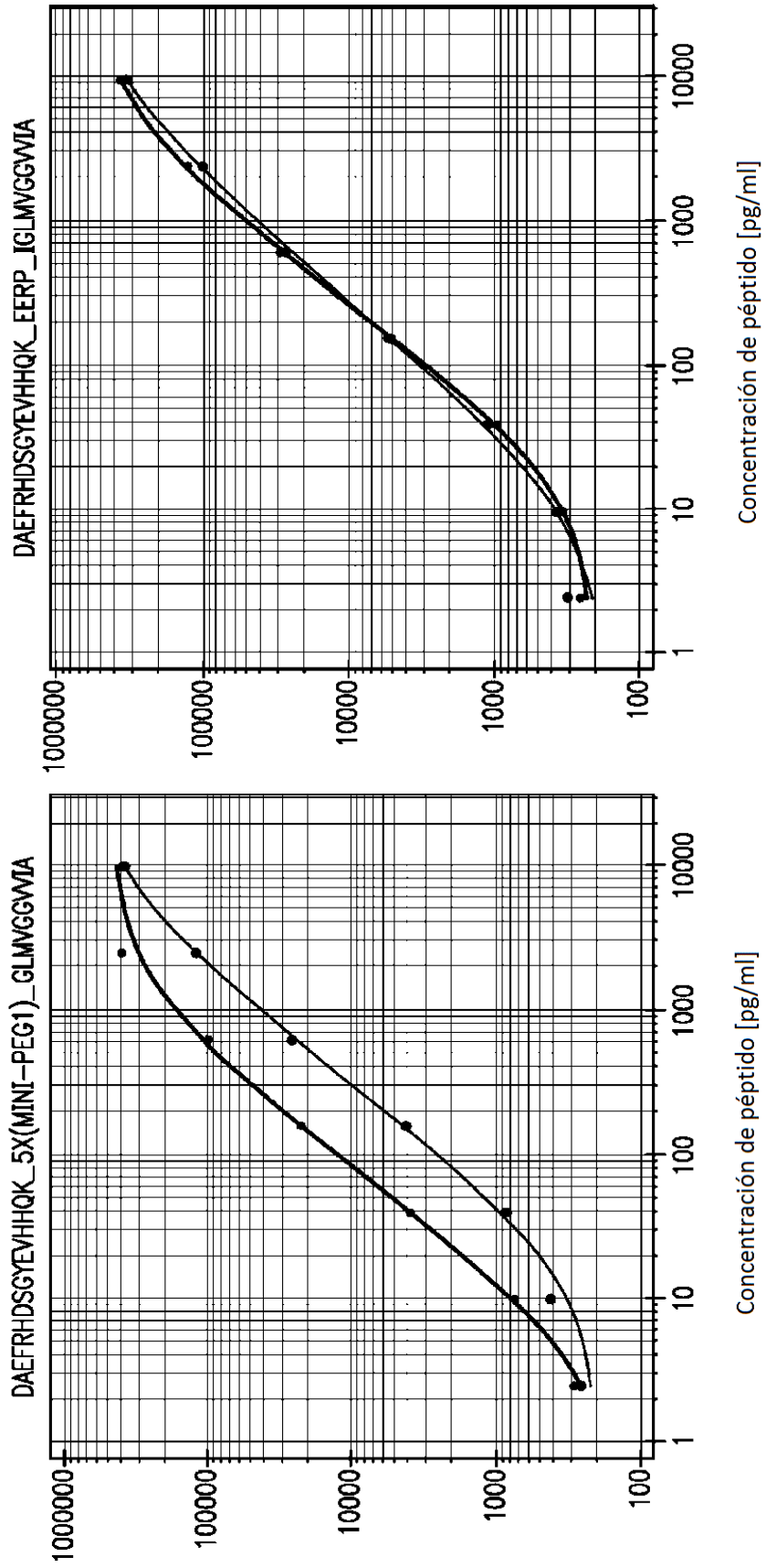
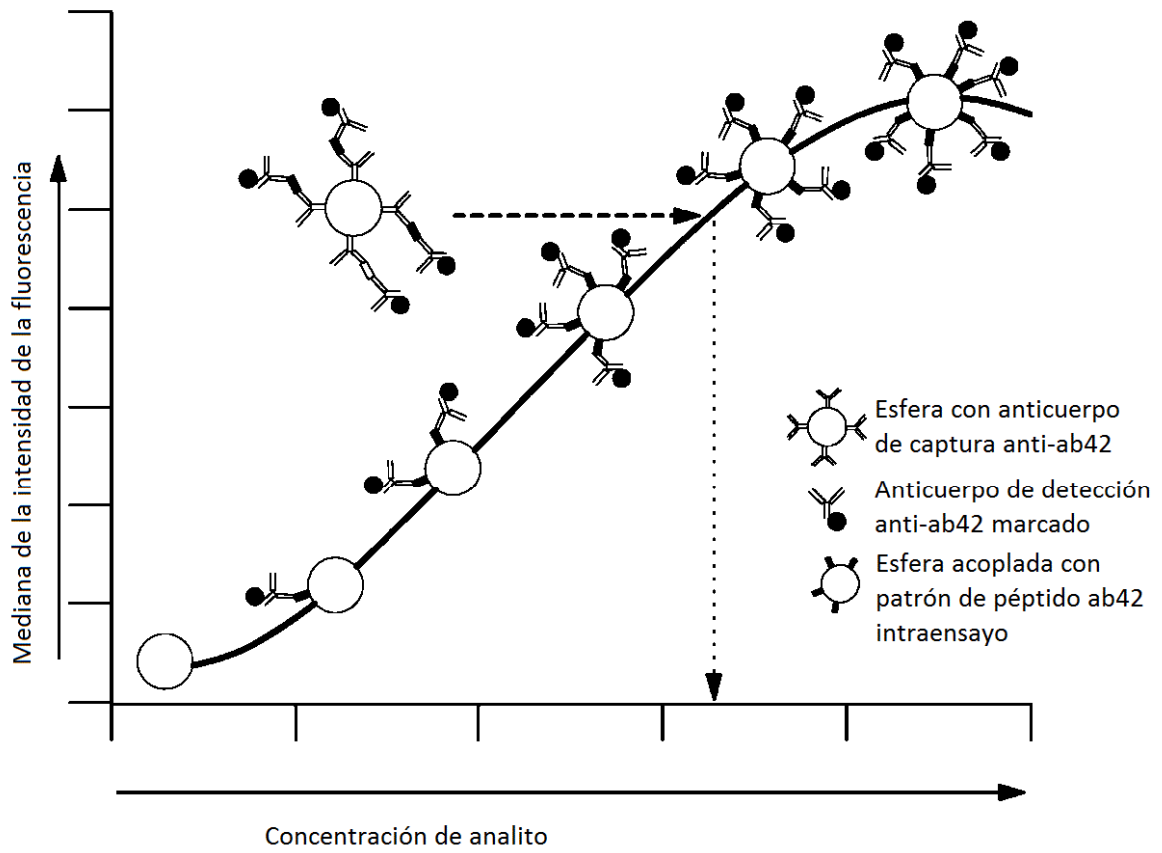


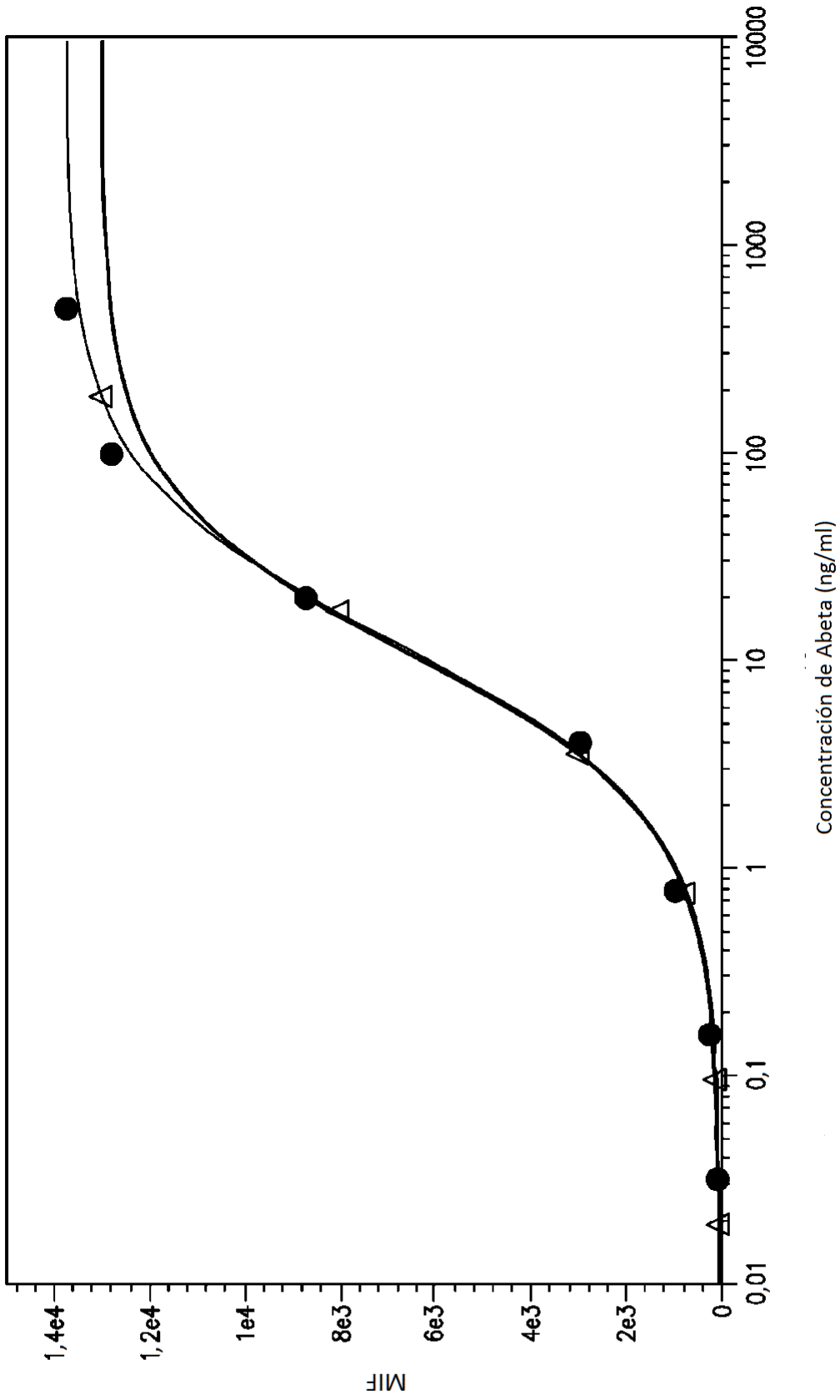
FIG. 3C



**FIG. 4**

Conjunto de esfera seleccionada #	Concentración de acoplamiento del péptido A $\beta$ <sub>40</sub> [ $\mu$ g/35ml]	Mediana de la intensidad de la fluorescencia (MIF)
5	0	14
10	1	28
20	10	151
40	100	782
70	500	1944
90	5000	7869

**FIG. 5A**

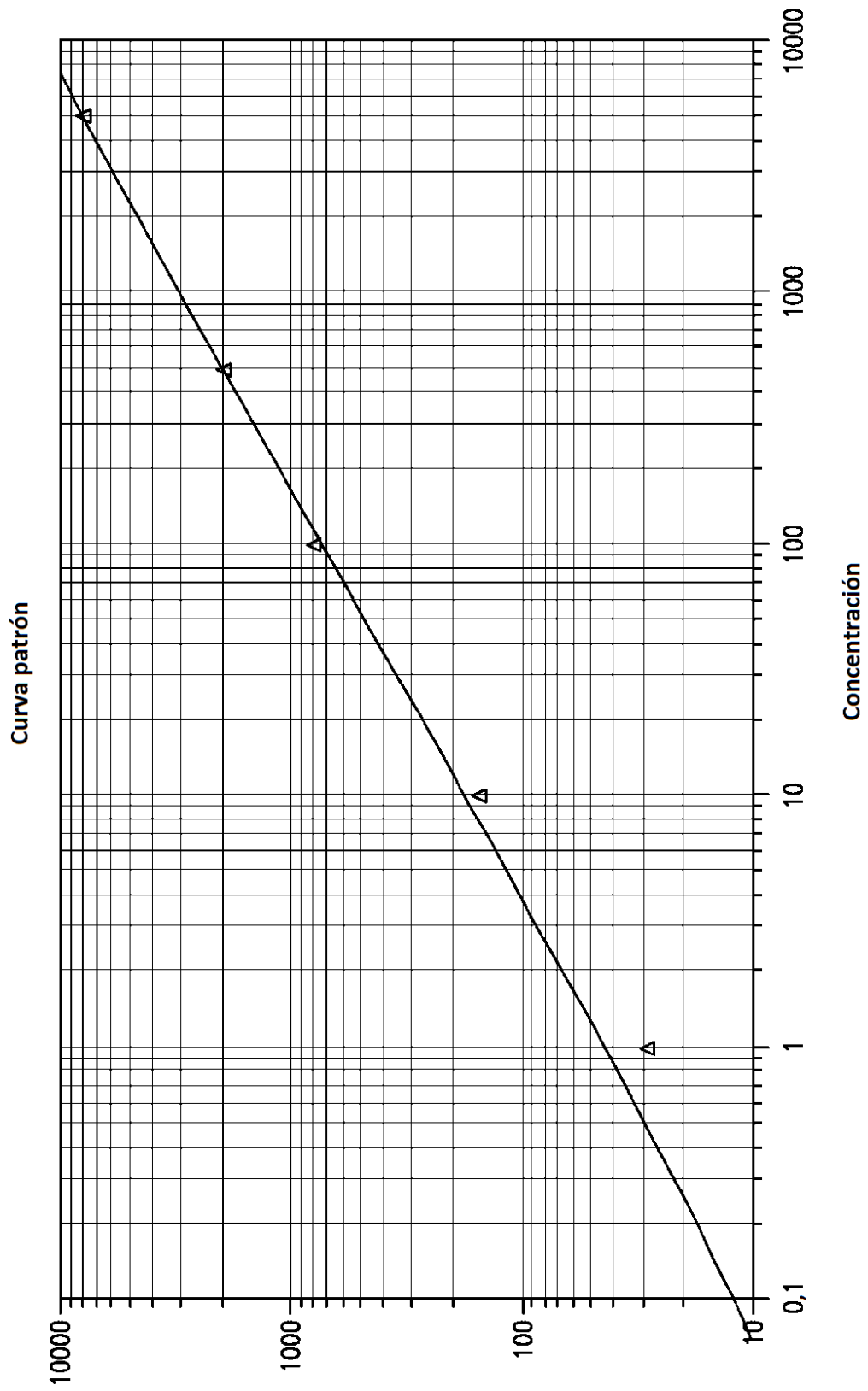


**FIG. 5B**

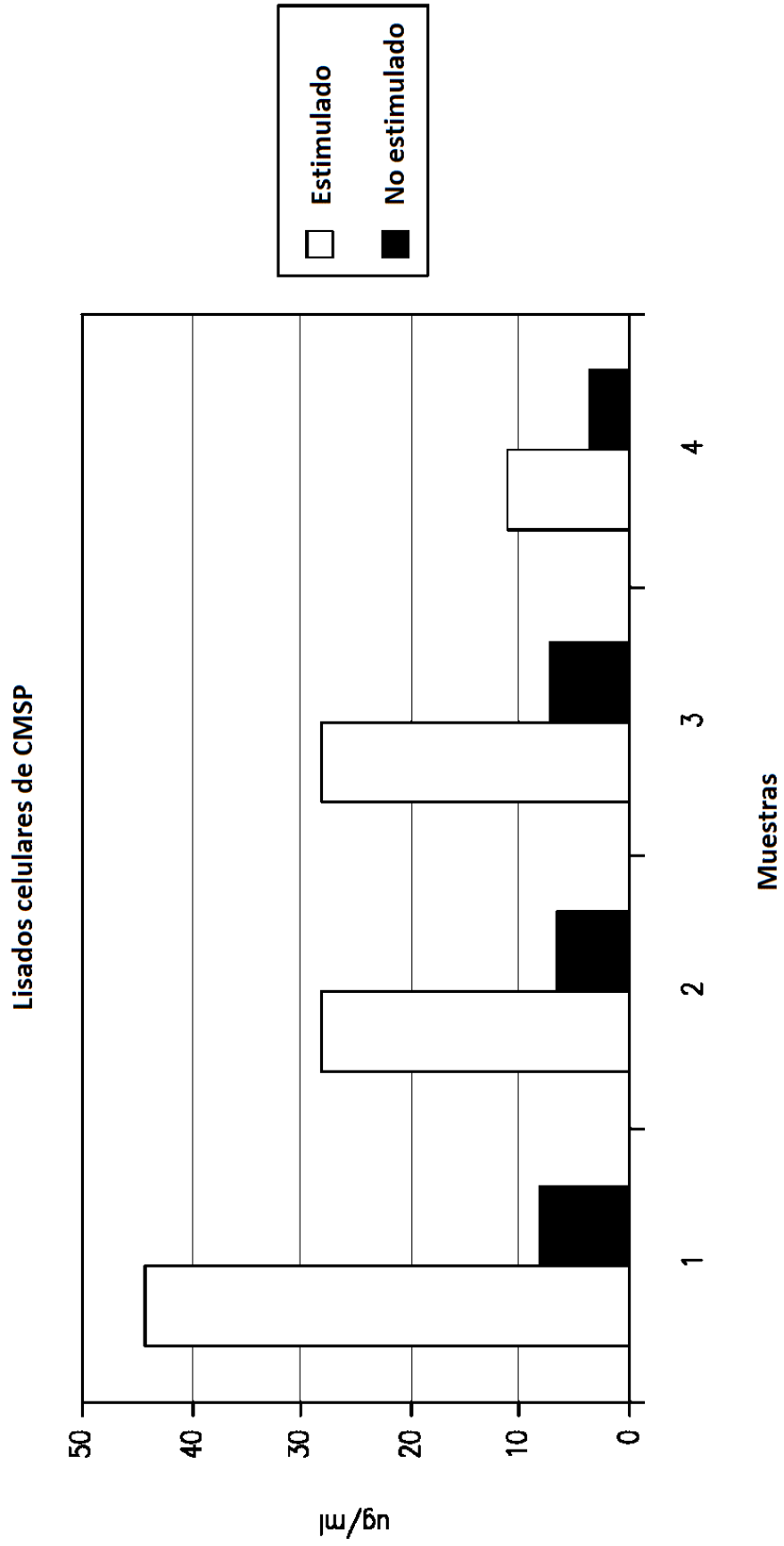


Muestra	Resultados generados de curvas patrón de $A\beta_{40}$ intra-ensayo (círculos)	Resultados generados de curvas patrón de $A\beta_{40}$ soluble (triángulos)
LCR-1	781 pg/ml	781 pg/ml
LCR-2	213 pg/ml	212 pg/ml
LCR-3	152 pg/ml	150 pg/ml
LCR-4	224 pg/ml	223 pg/ml

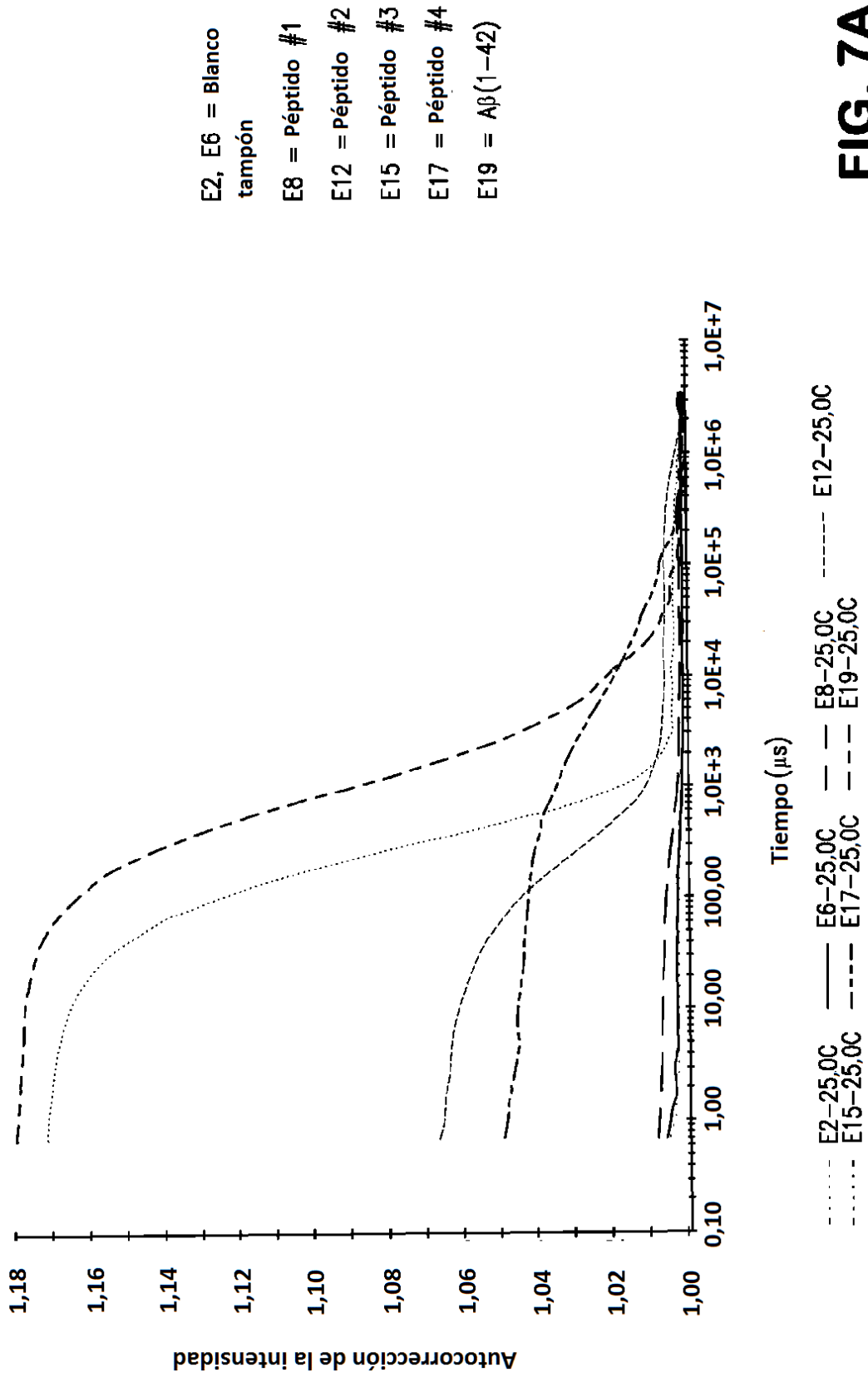
**FIG. 5C**



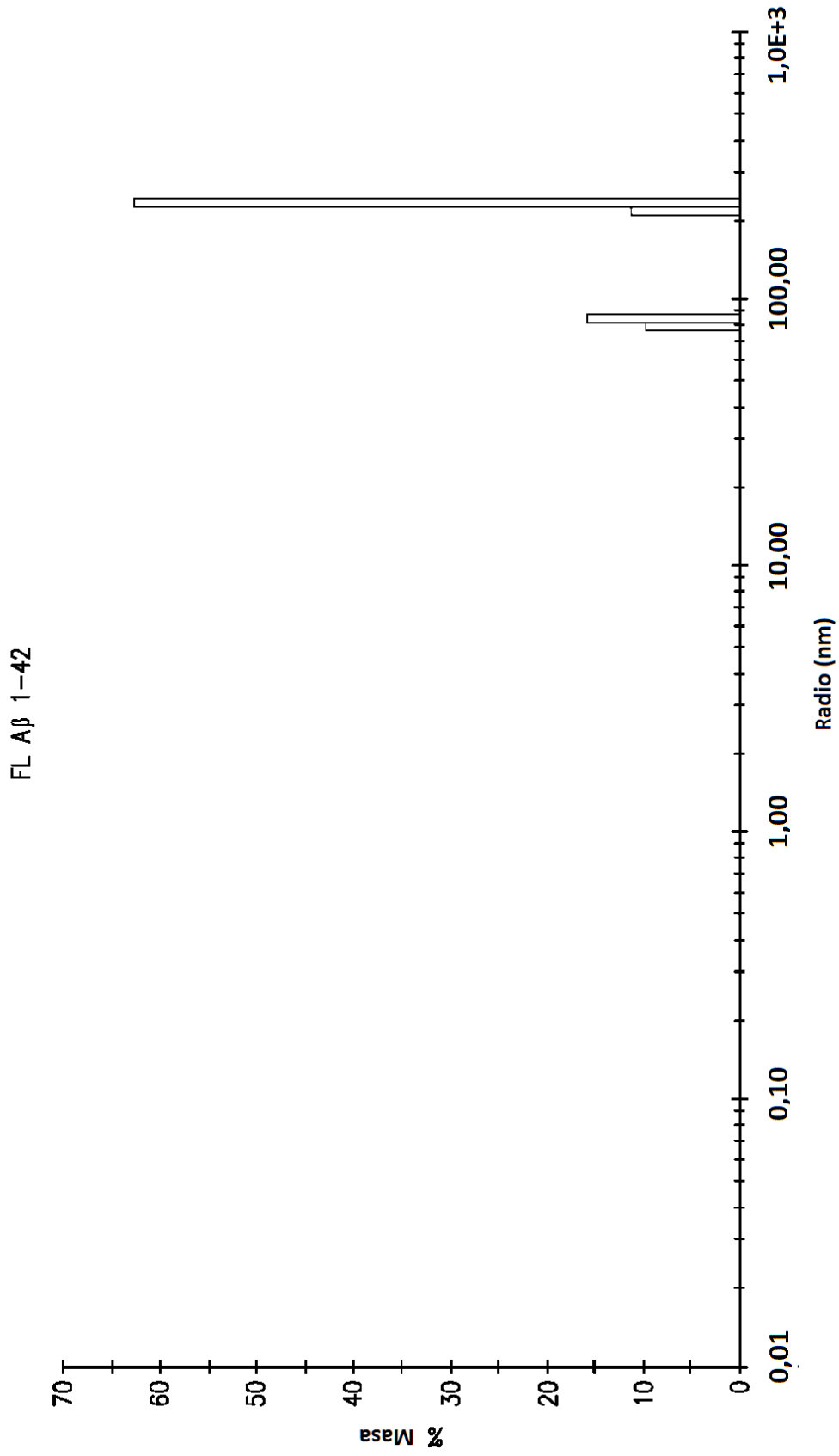
**FIG. 6A**



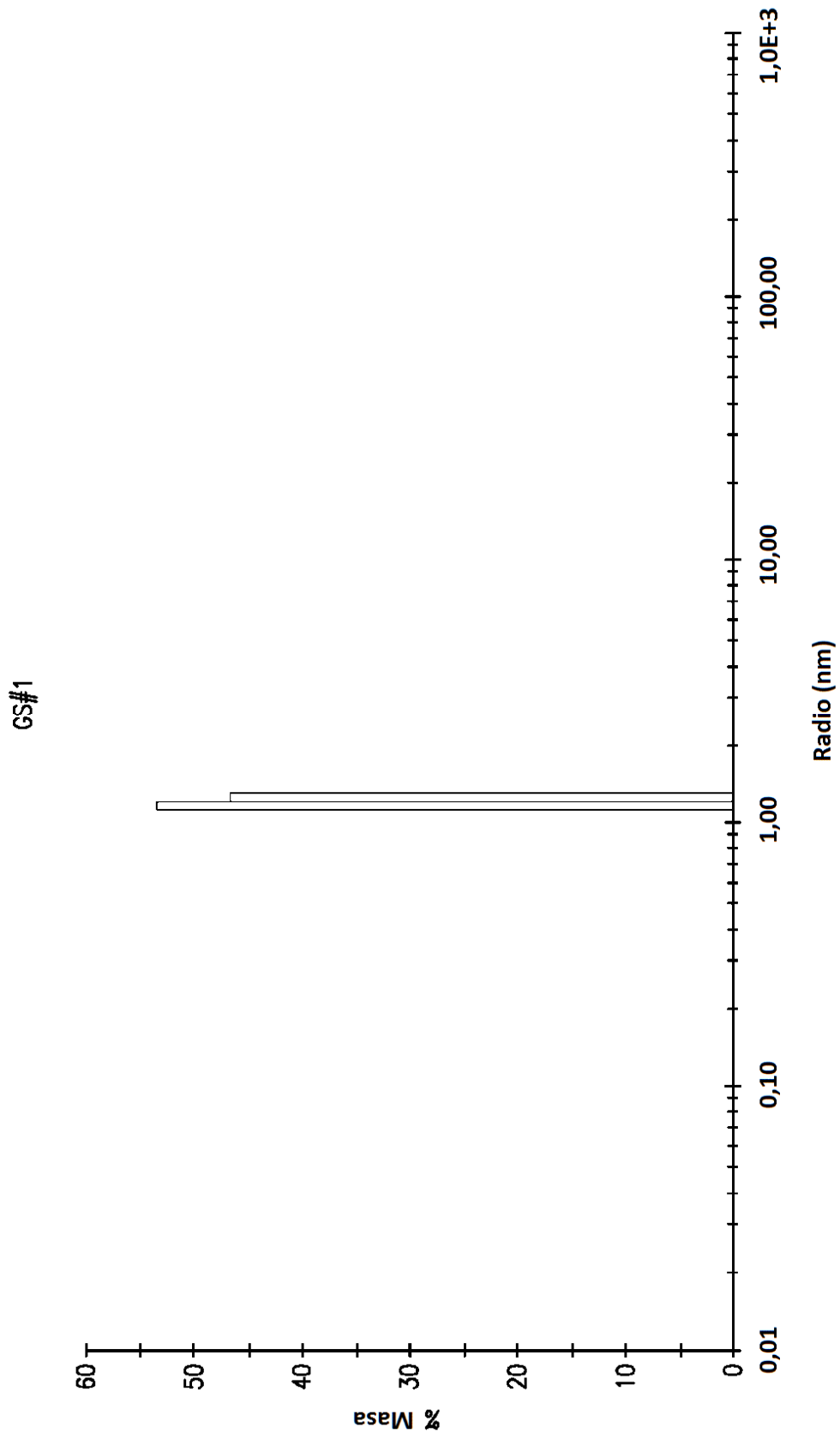
**FIG. 6B**



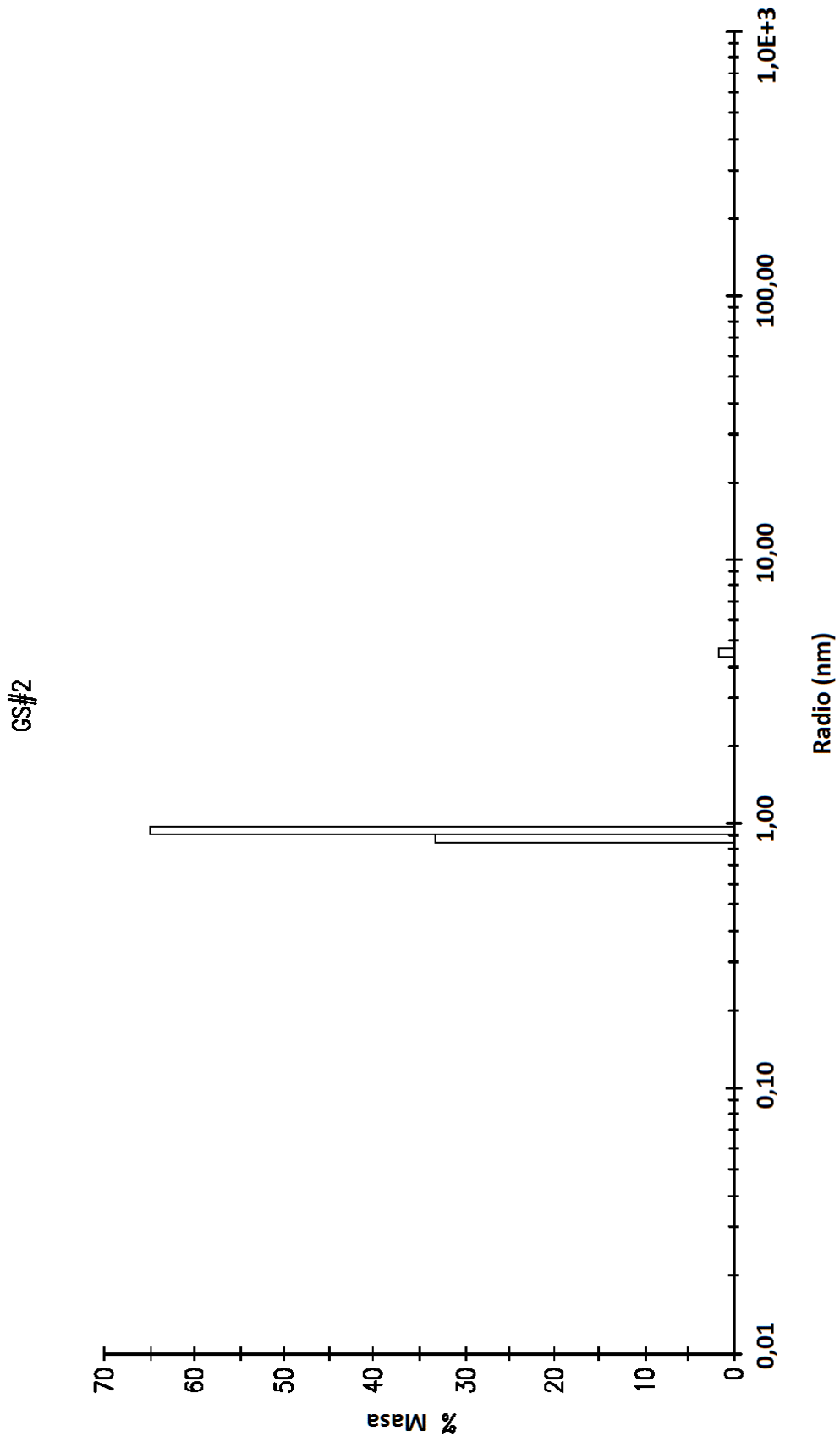
**FIG. 7A**



**FIG. 7B**

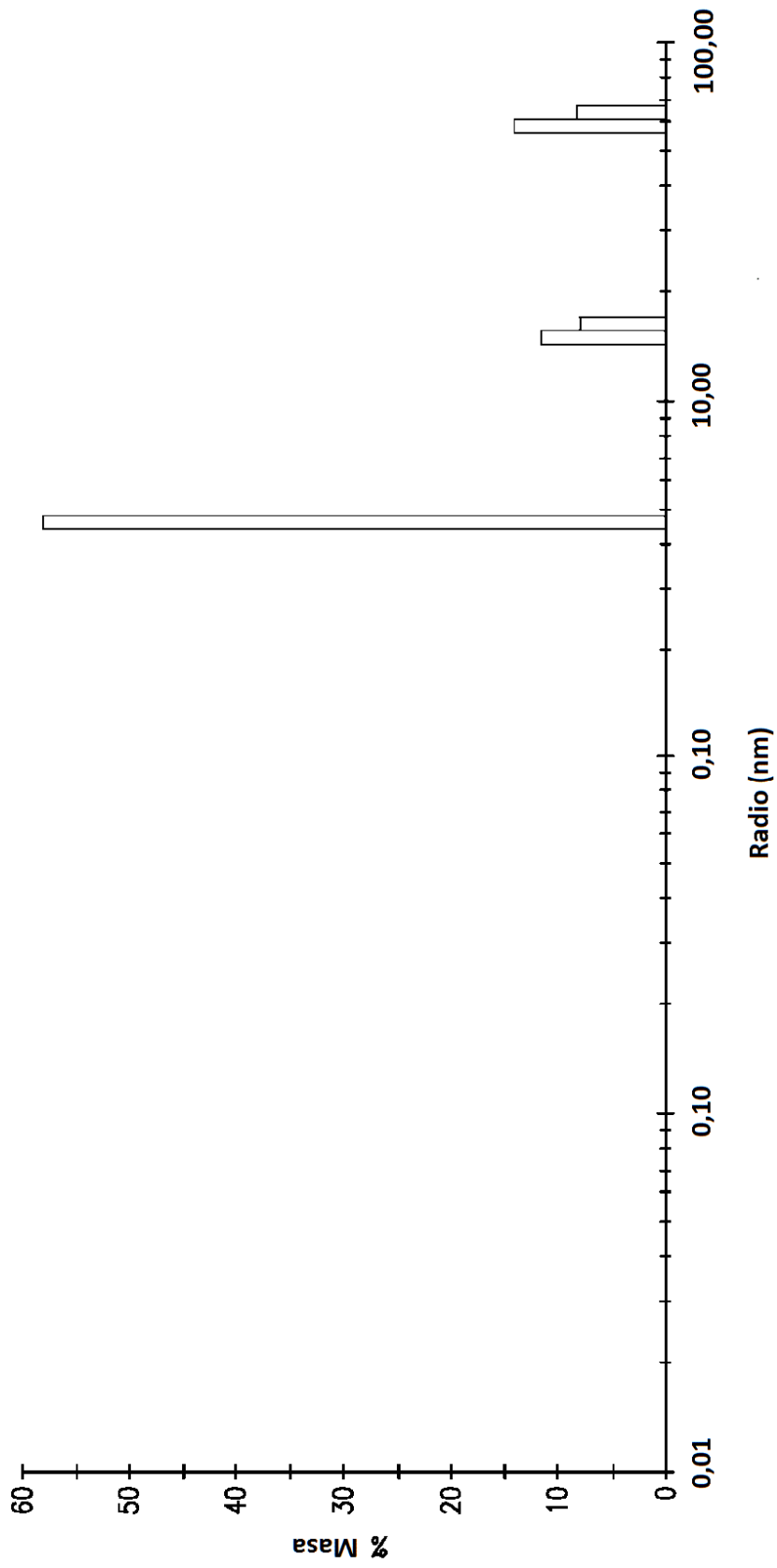


**FIG. 7C**



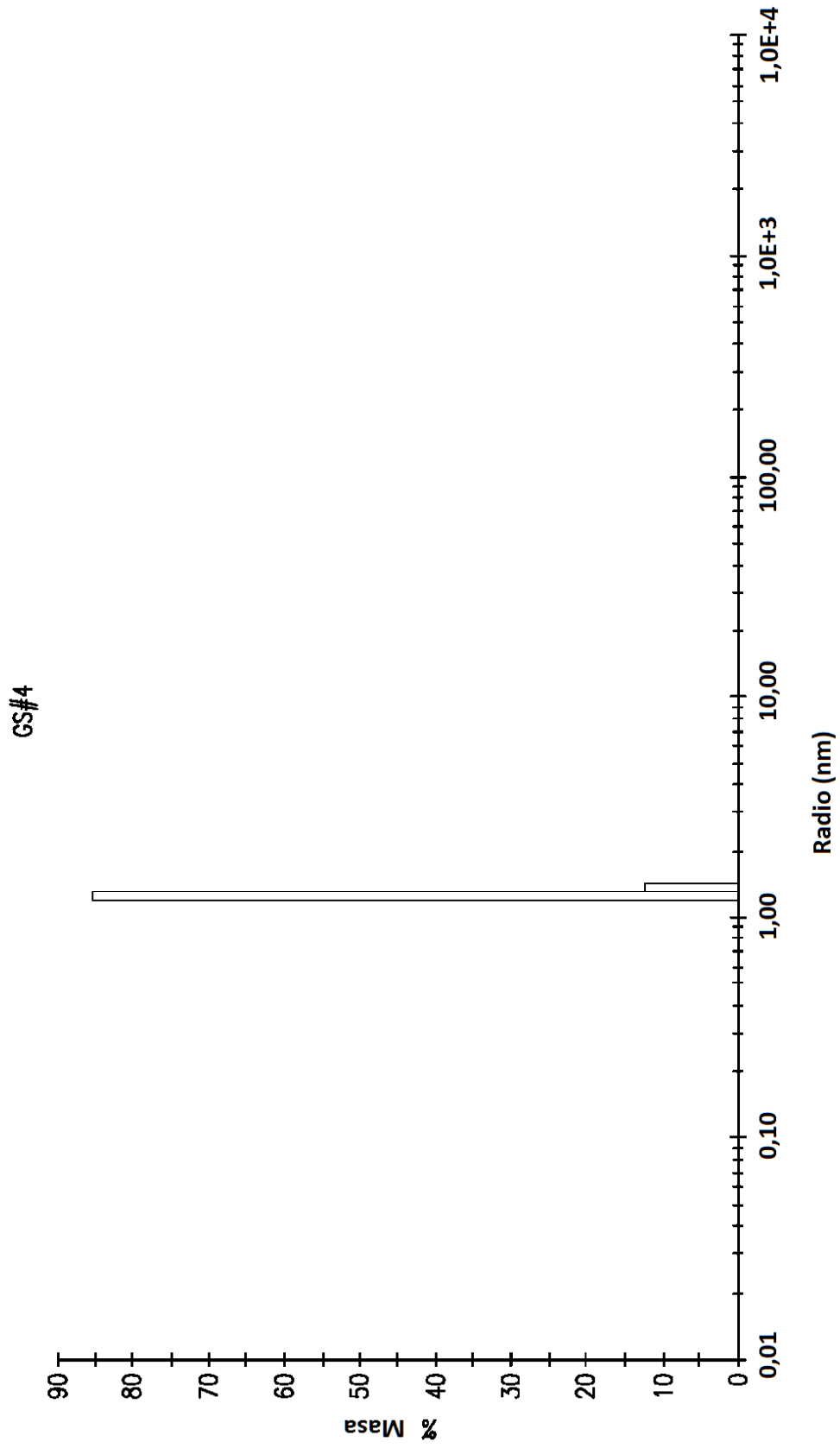
**FIG. 7D**

GS#3



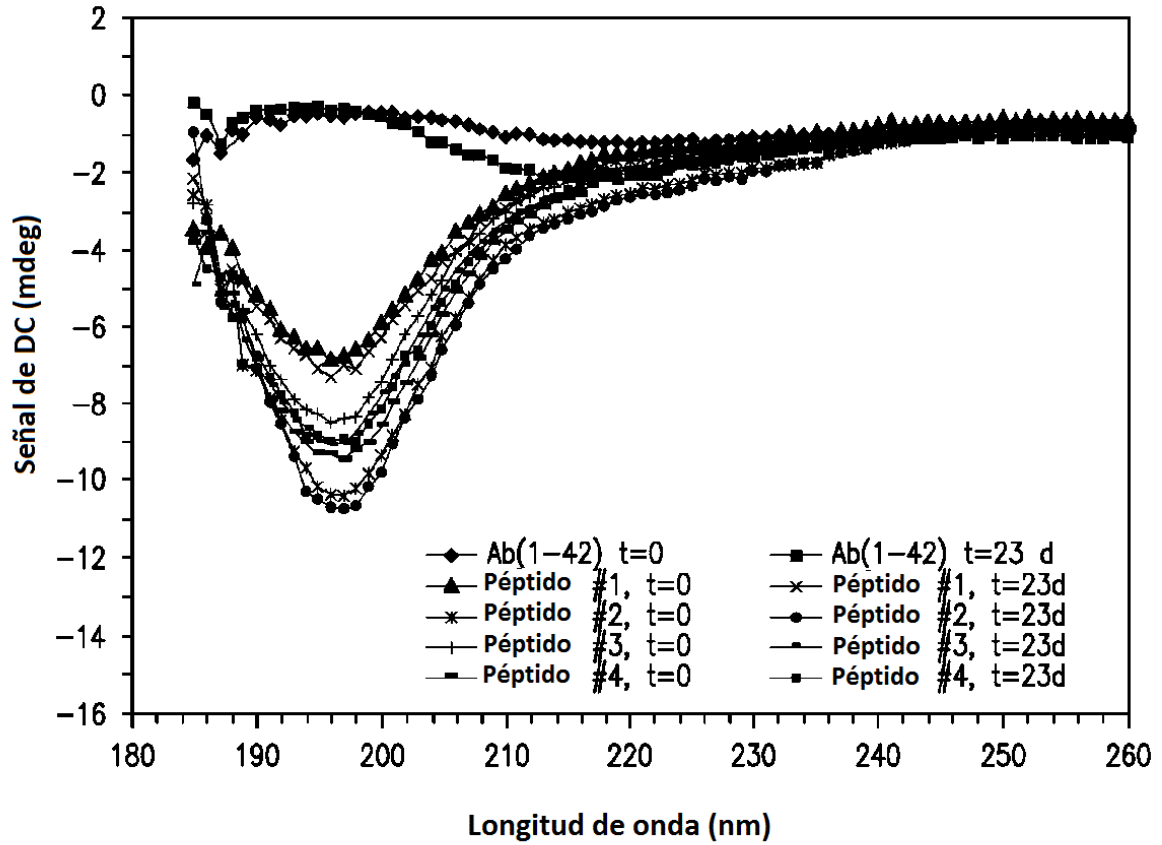
**FIG. 7E**





**FIG. 7F**

Datos brutos de DC en  $A\beta(1-42)$  y 4 péptidos relacionados  
a 0,1 mg/ml en Pi 10 mM, NaCl 10 mM, pH 7,4



**FIG. 8**

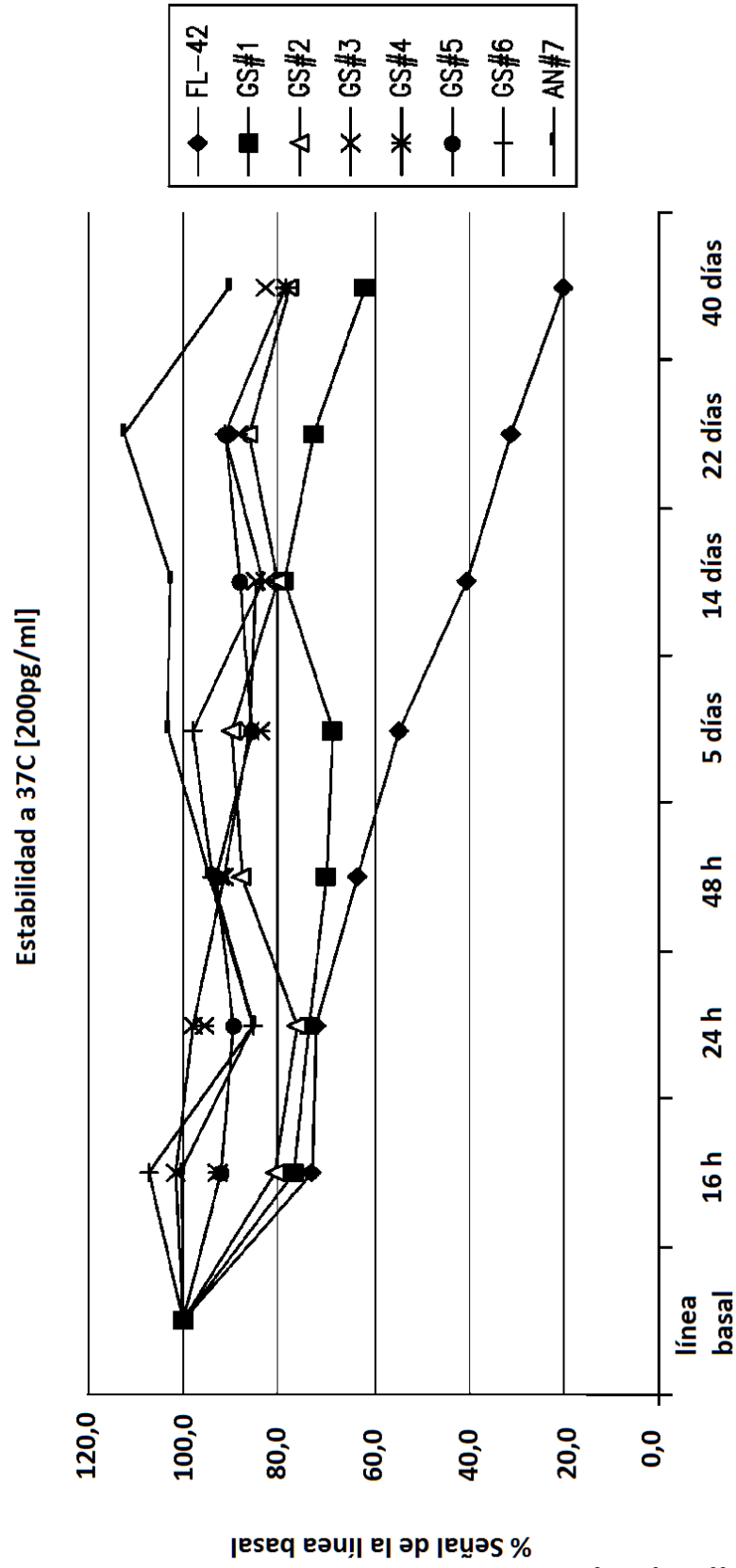


FIG. 9A

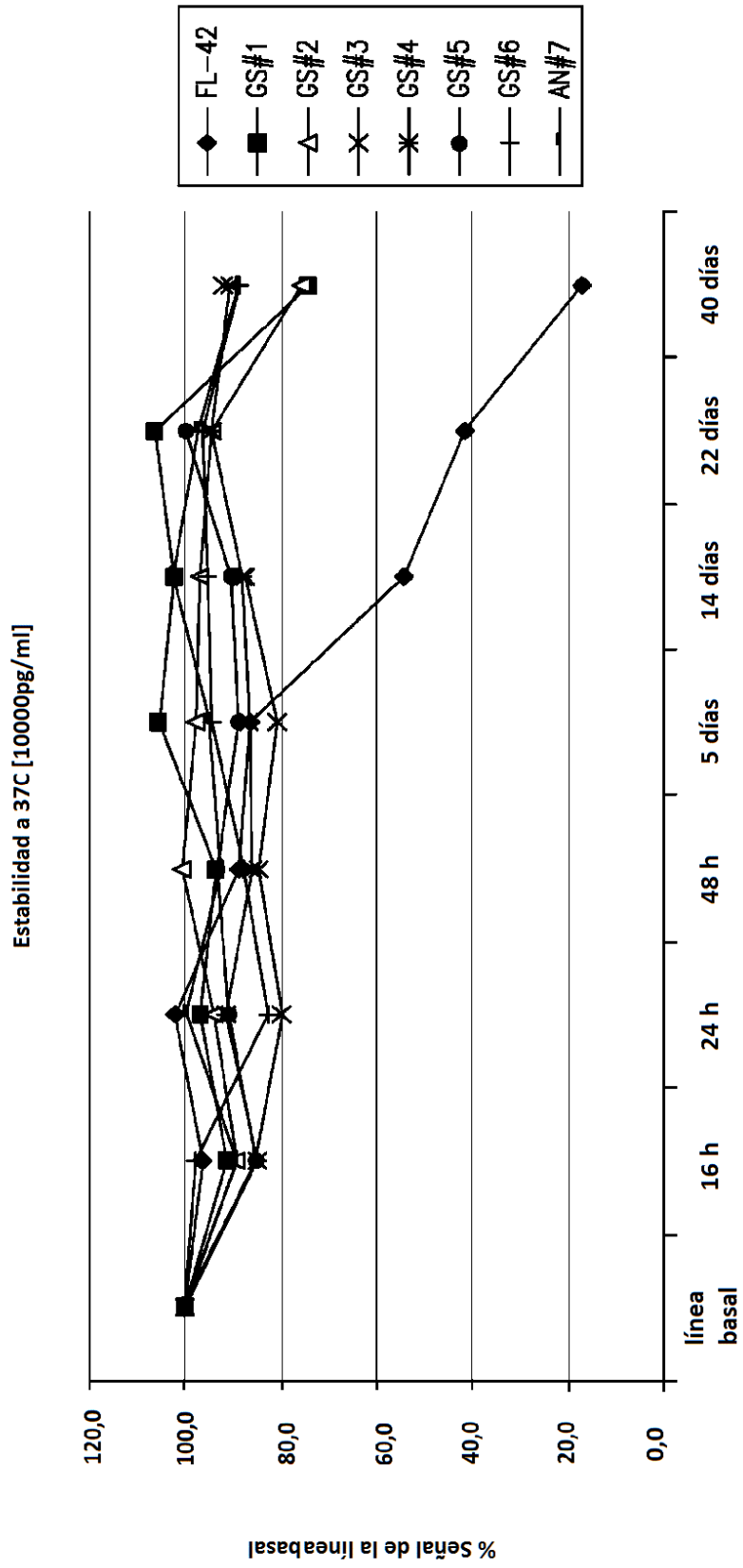
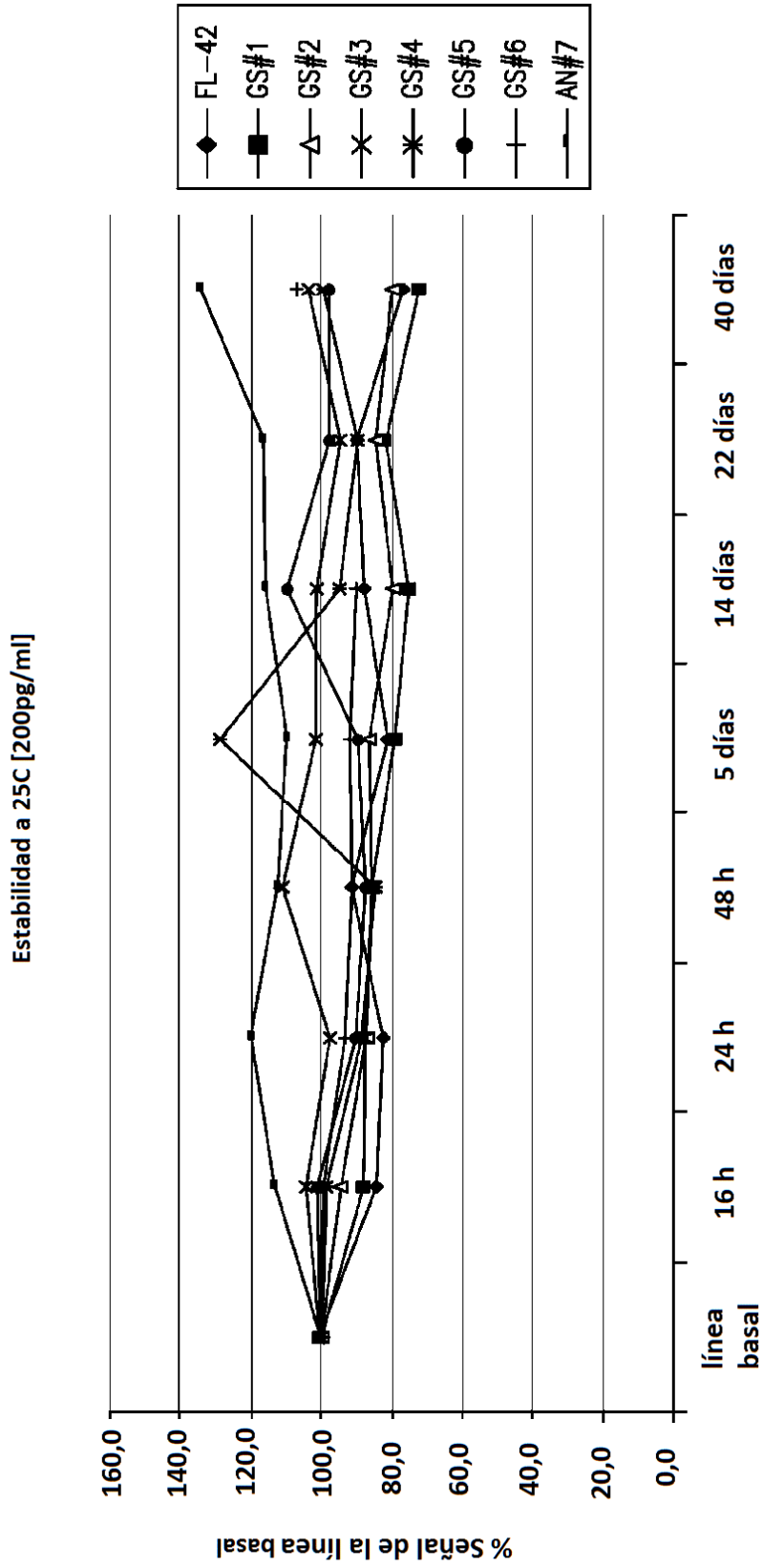


FIG. 9B



**FIG. 9C**

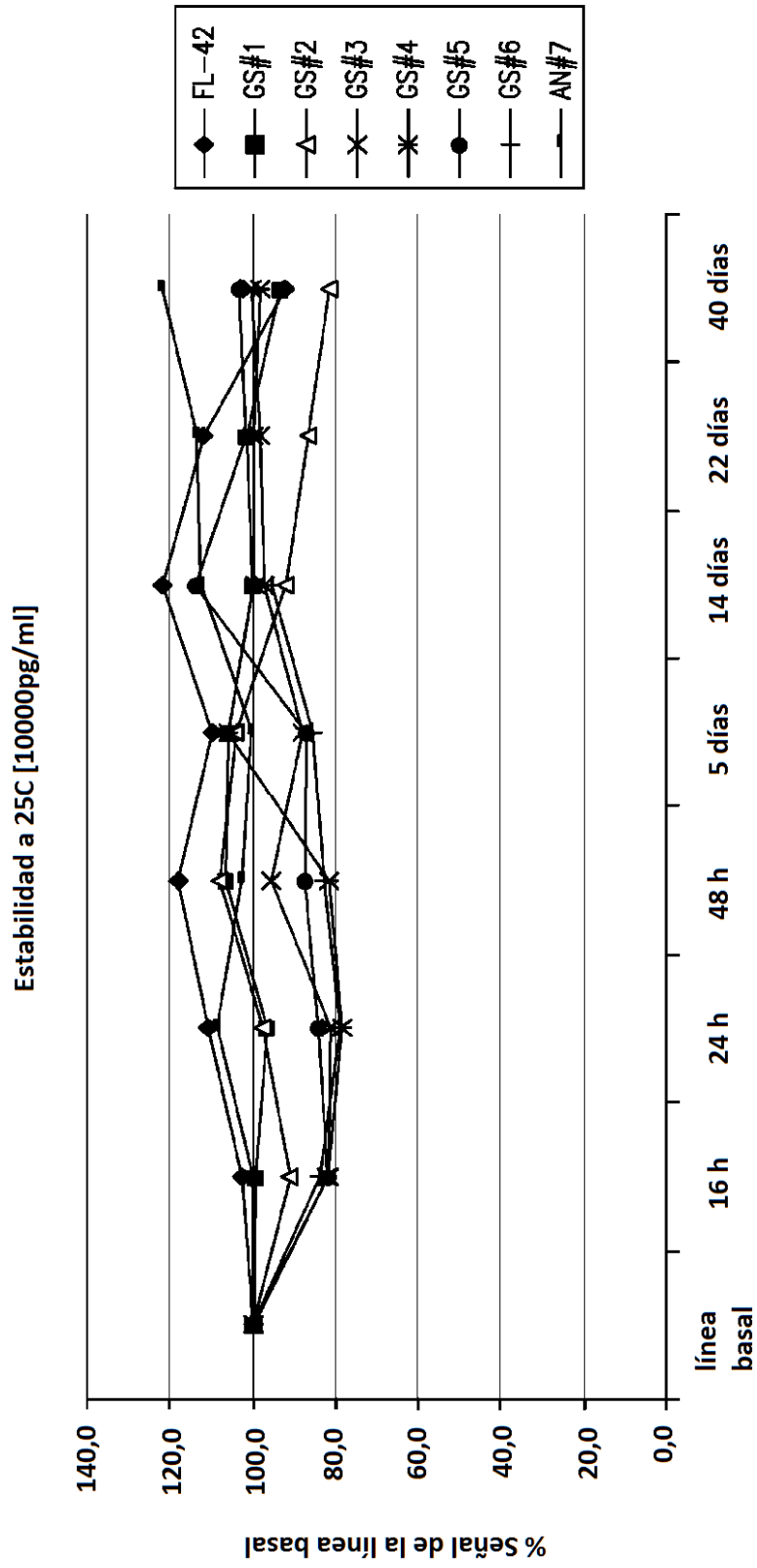


FIG. 9D

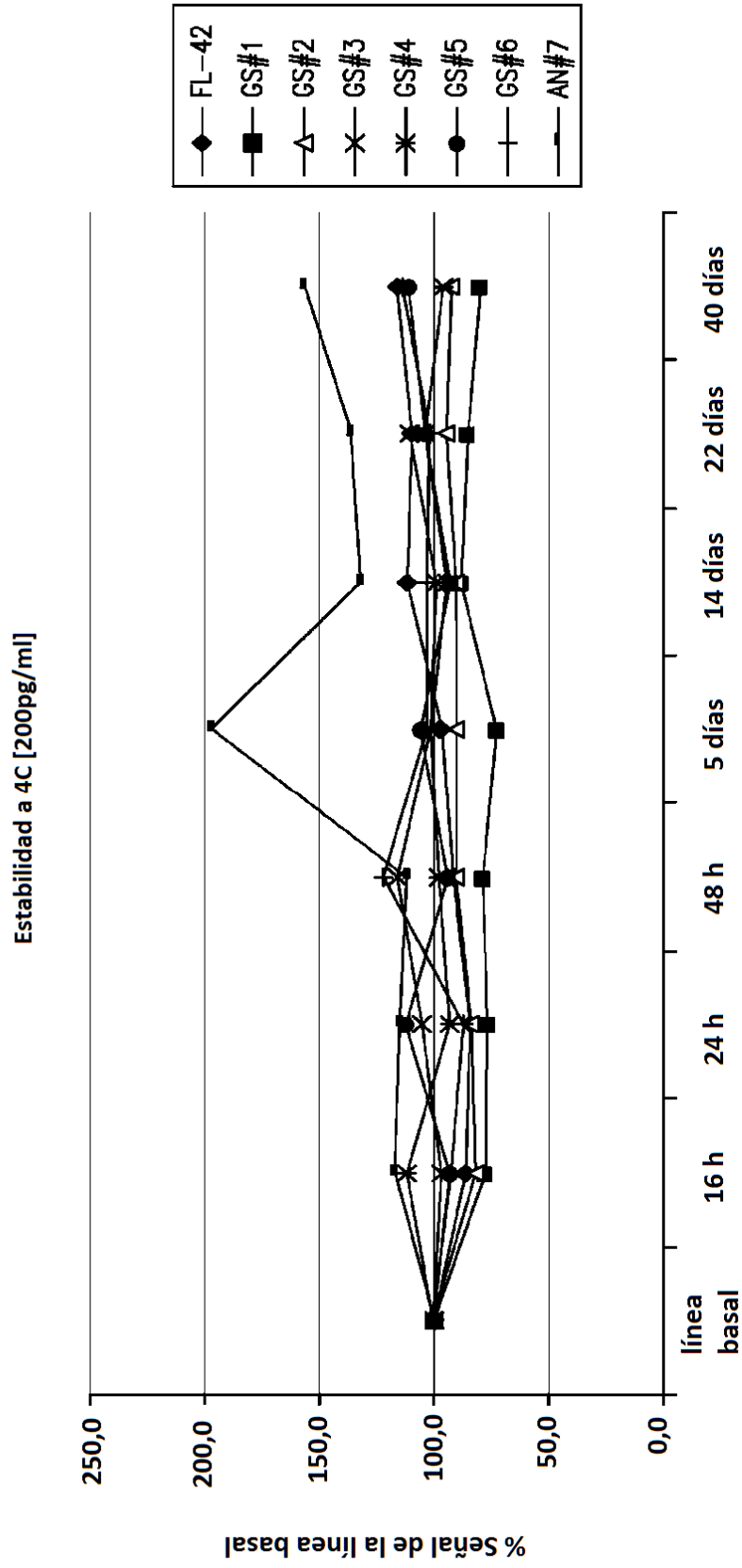


FIG. 9E

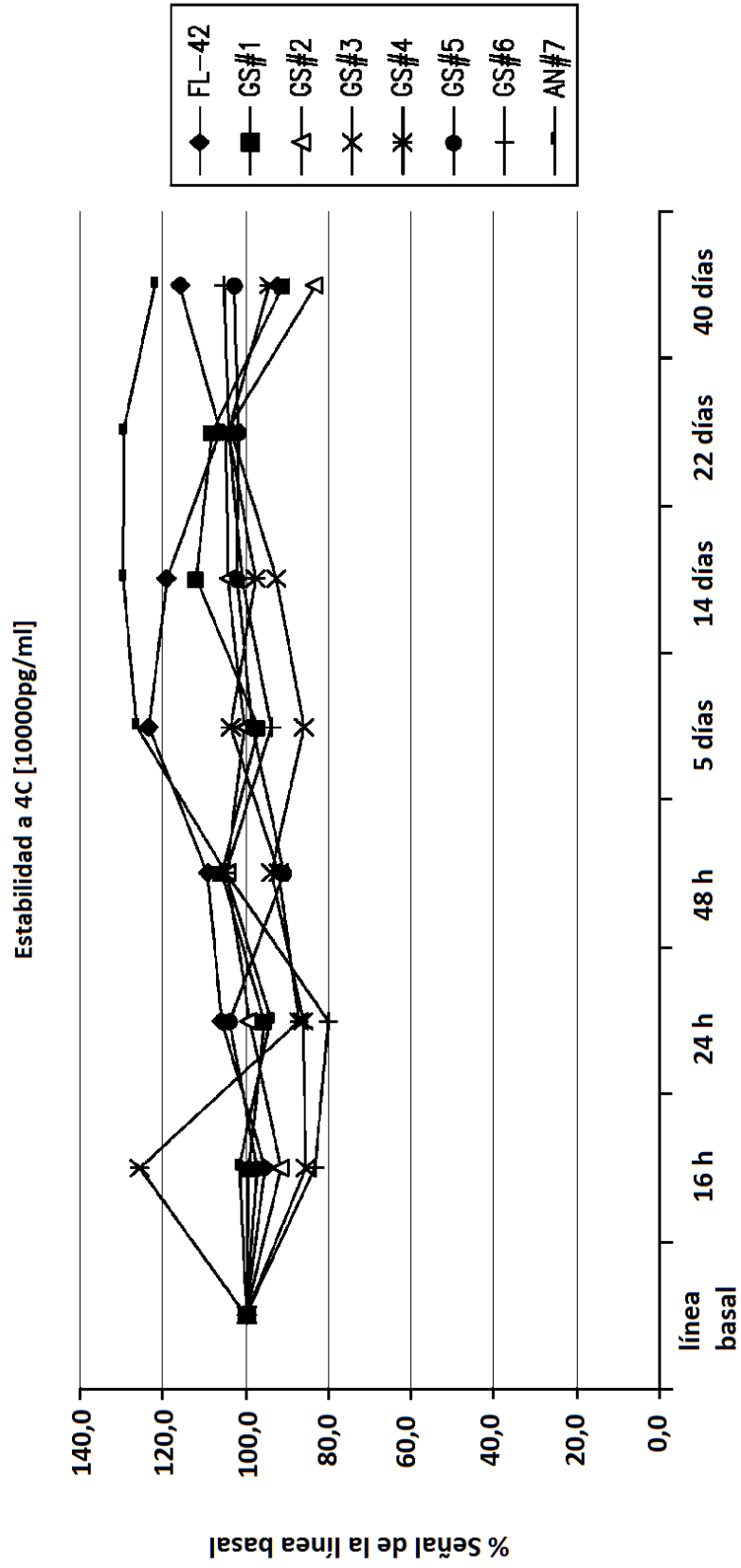


FIG. 9F



FLAb 1-42 a 25 C

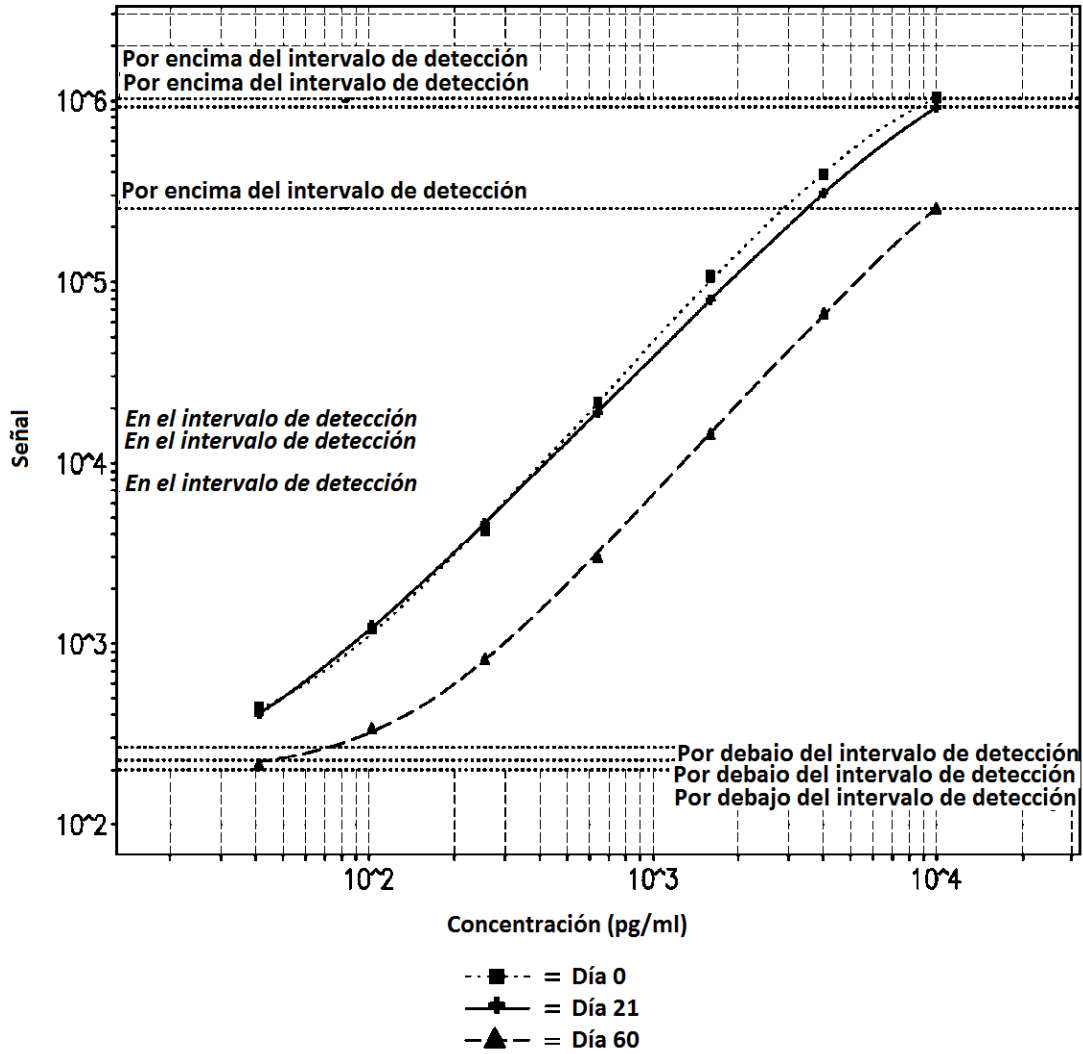
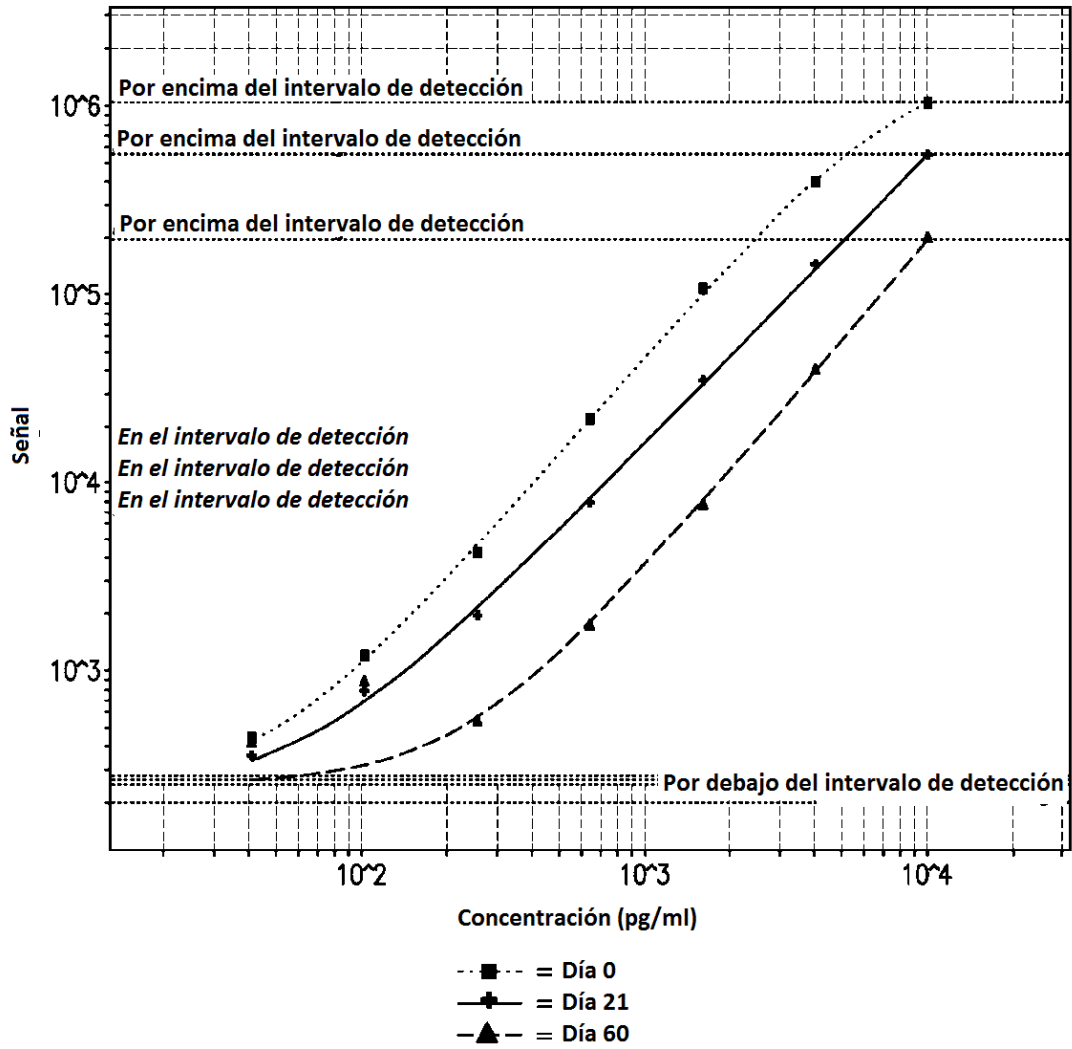


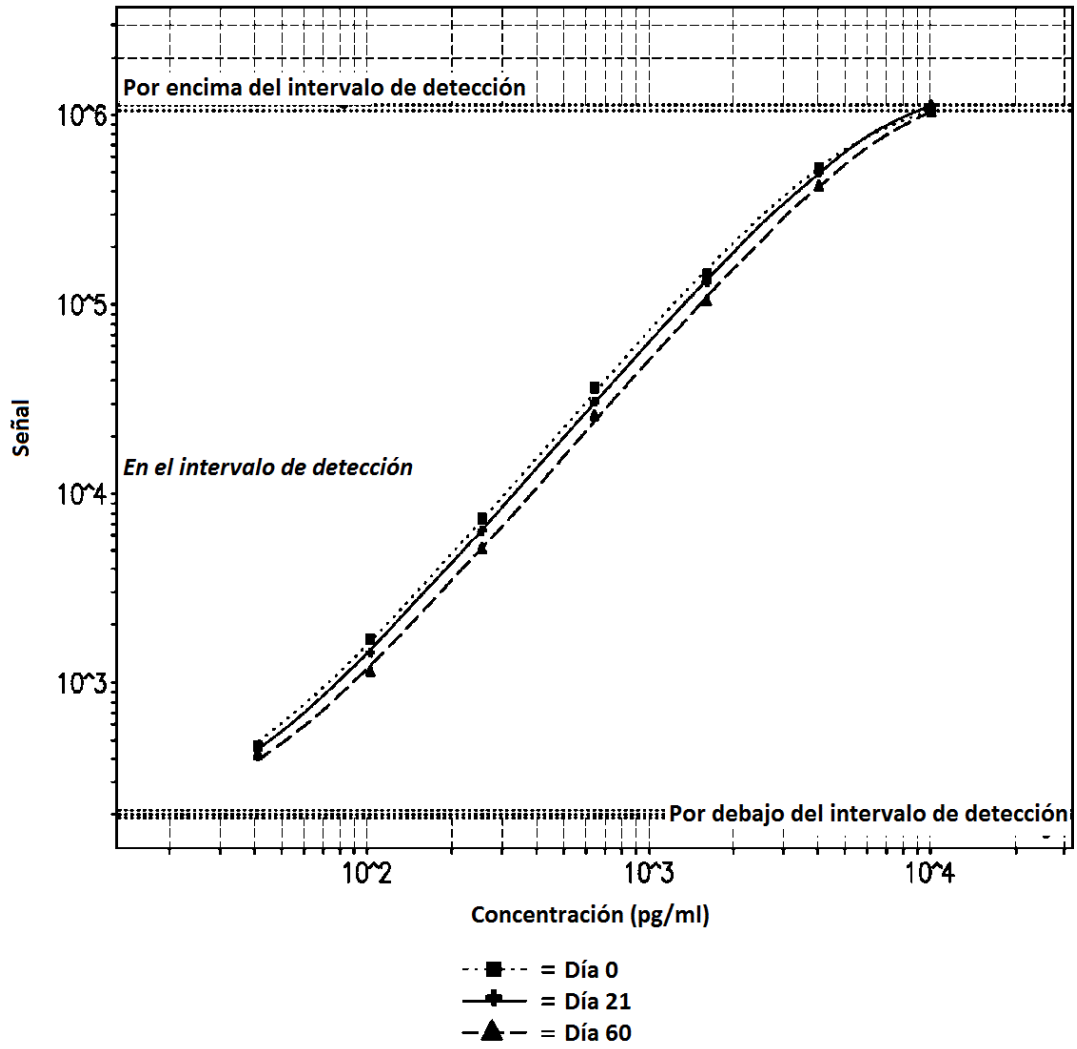
FIG. 10A

FLAb 1-42 a 37 C



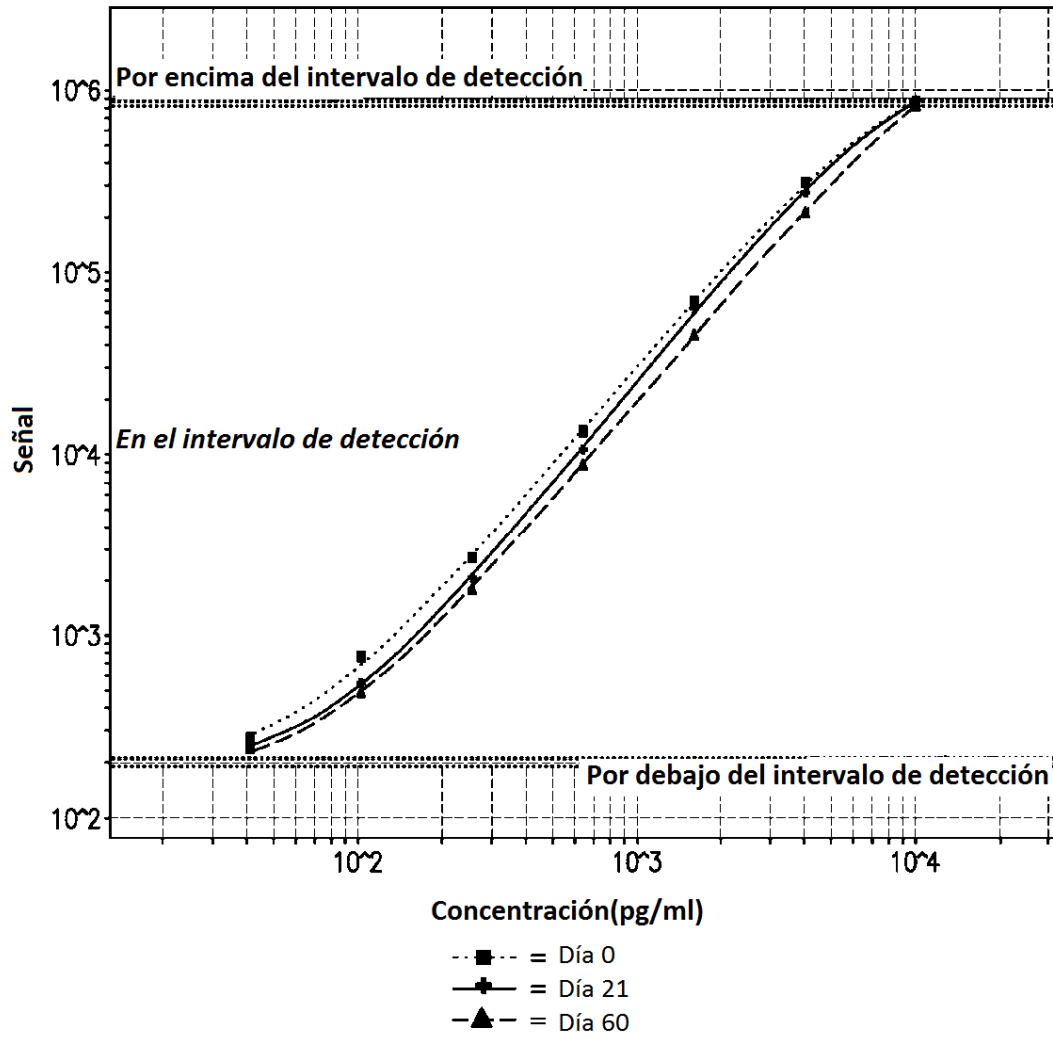
**FIG. 10B**

GS#1 a 37 C



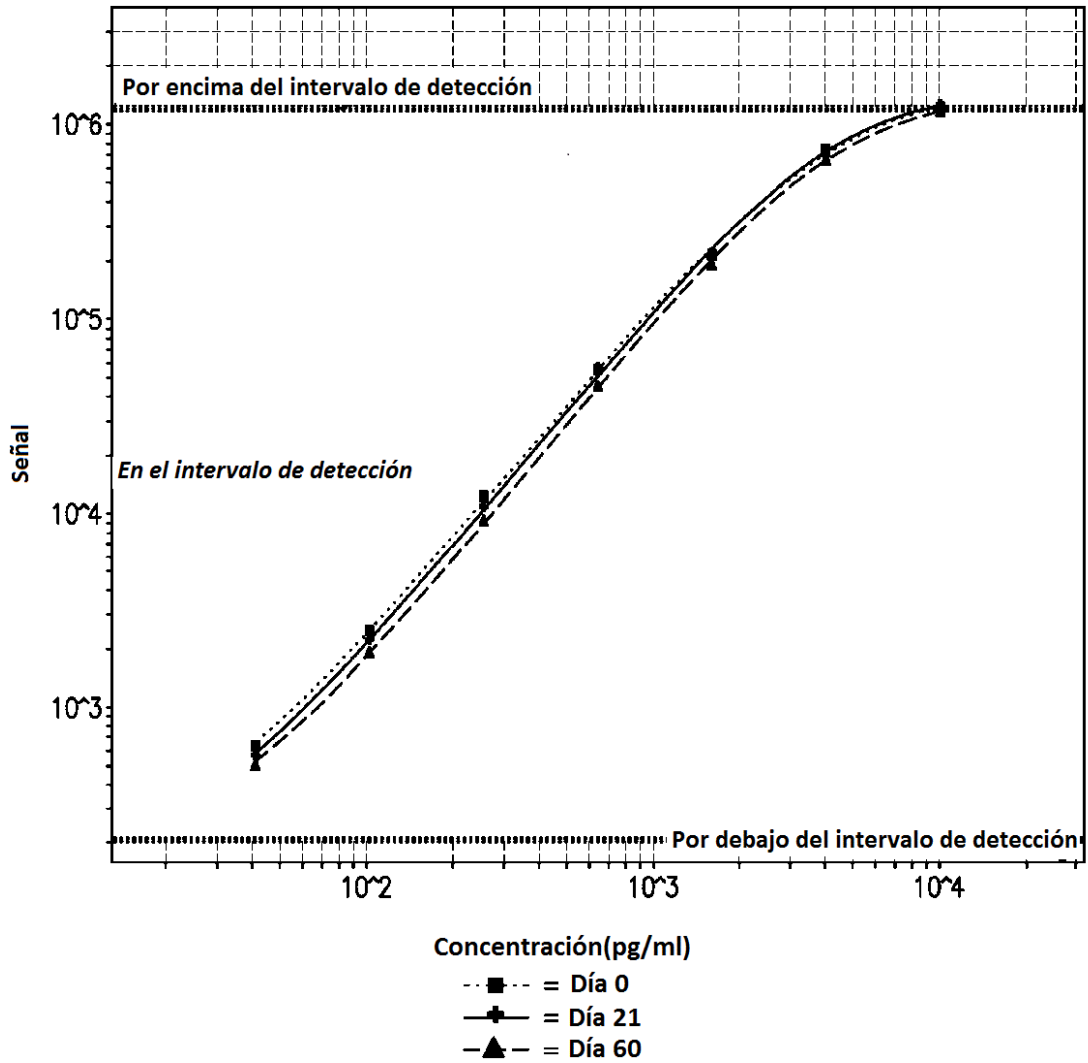
**FIG. 10C**

GS#2 a 37C



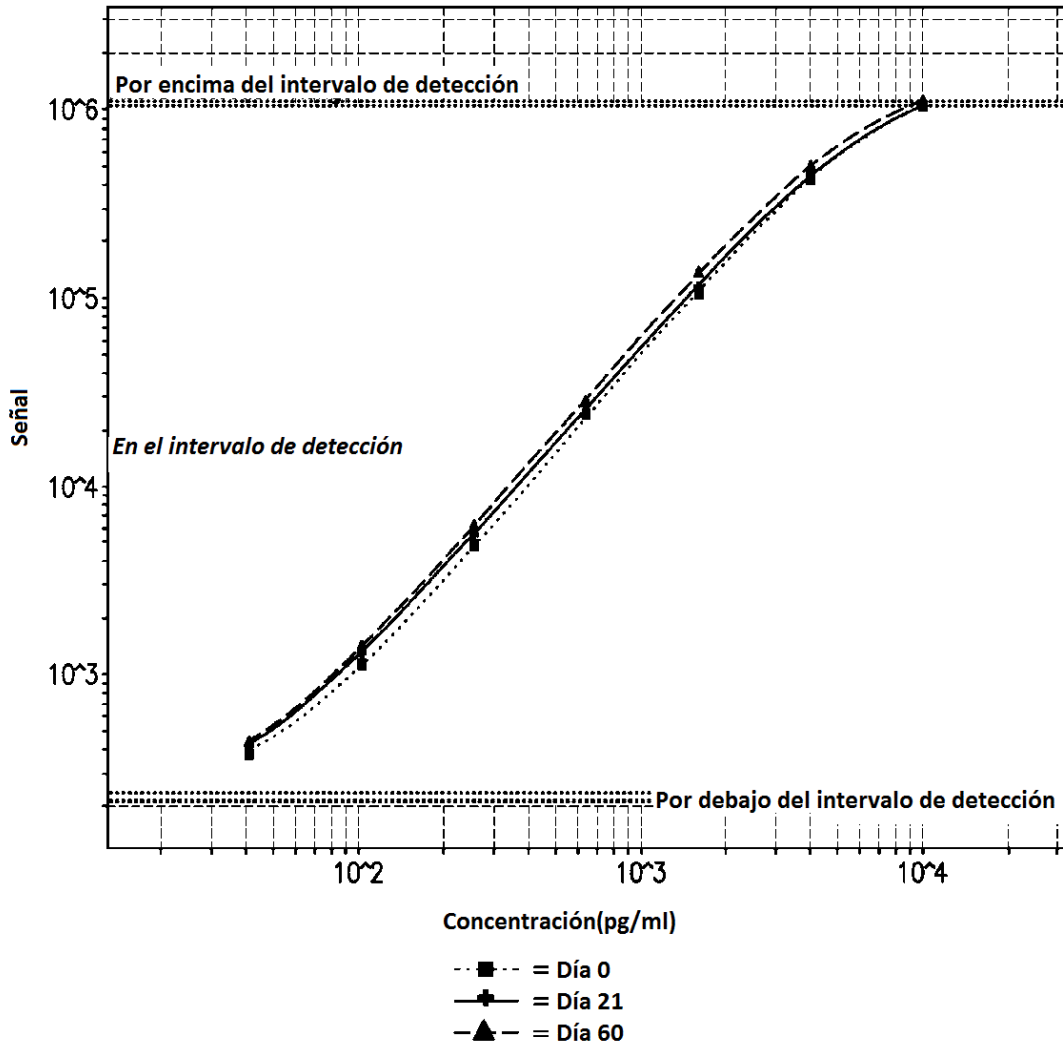
**FIG. 10D**

GS#3 a 37 C



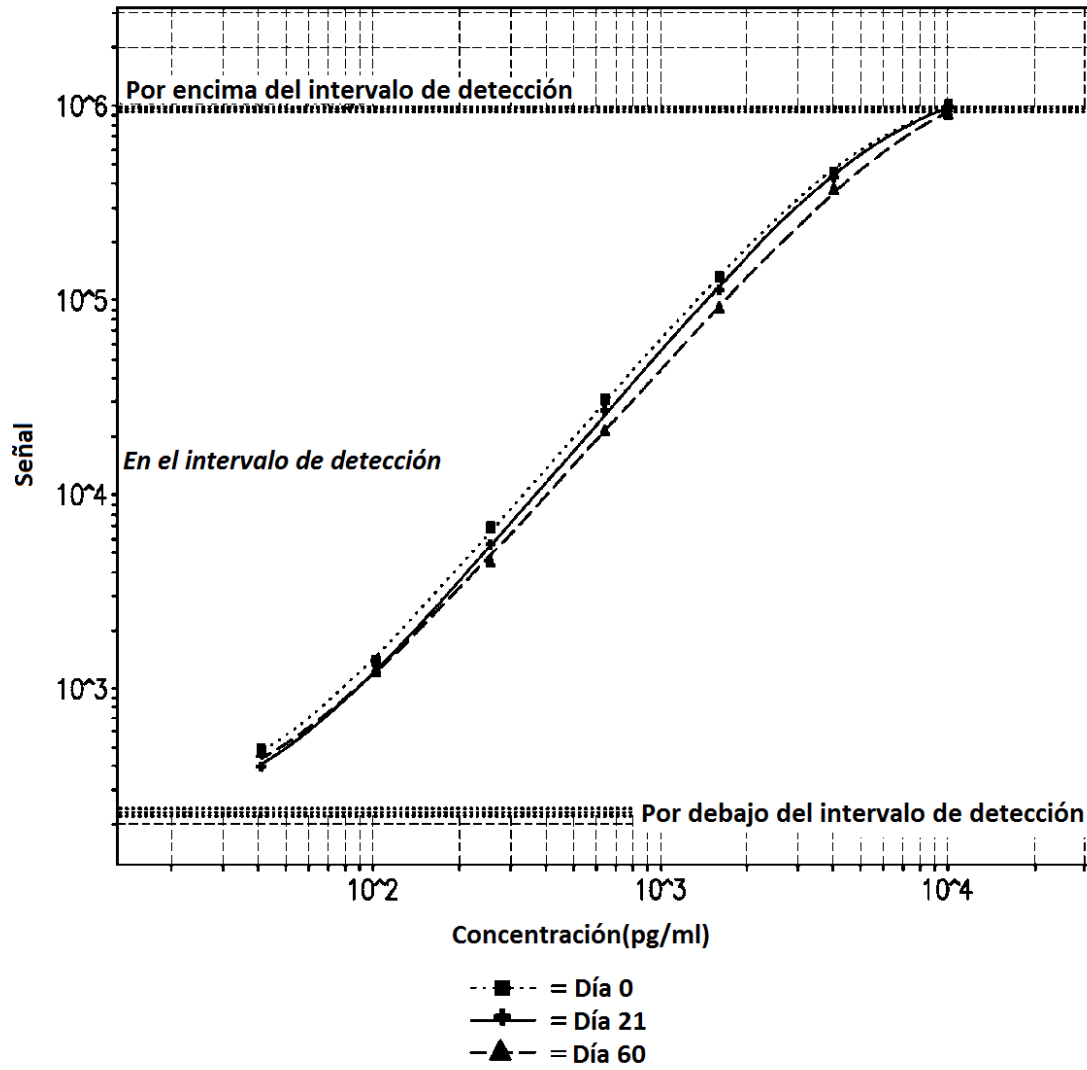
**FIG. 10E**

GS#4 a 37 C



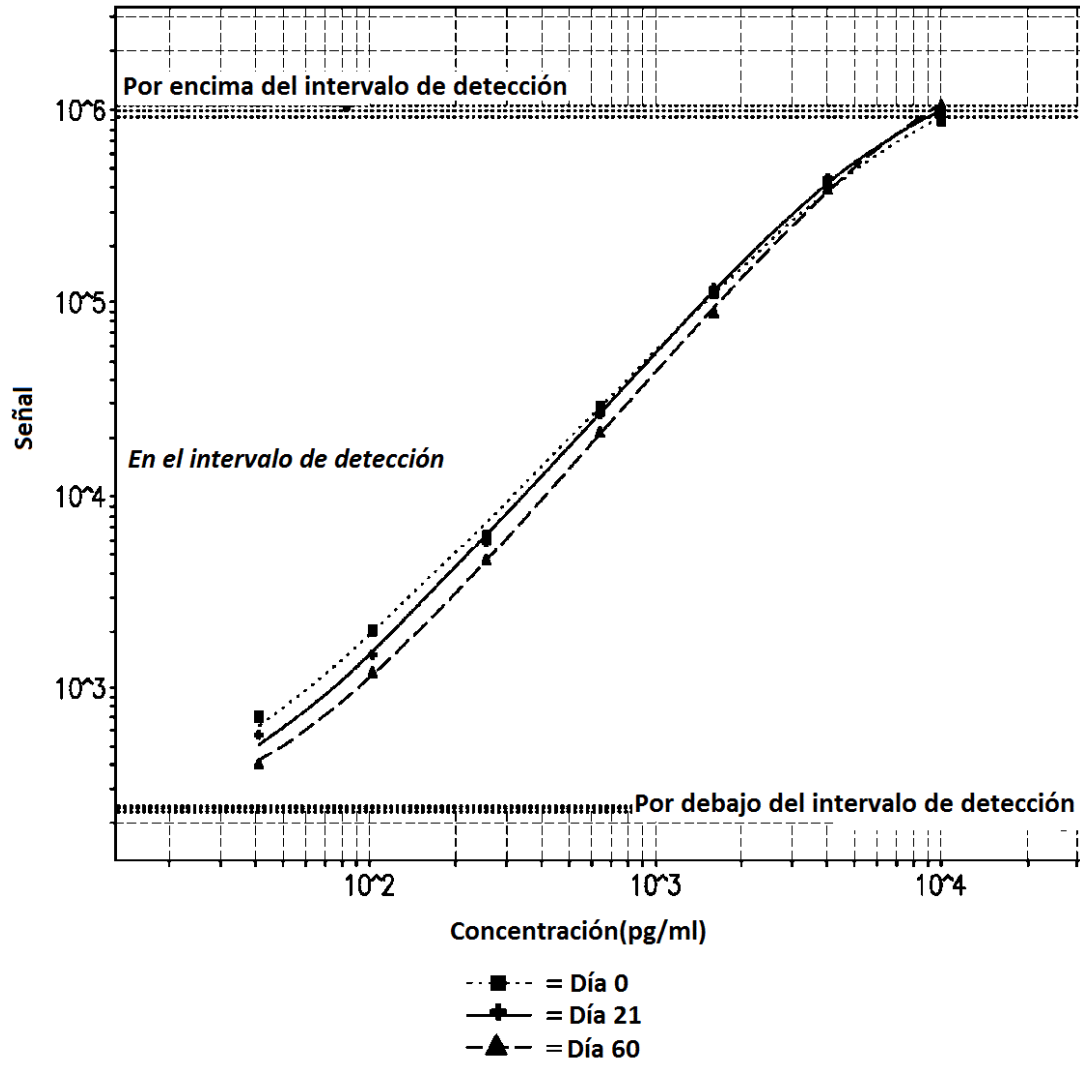
**FIG. 10F**

GS#5 a 37 C



**FIG. 10G**

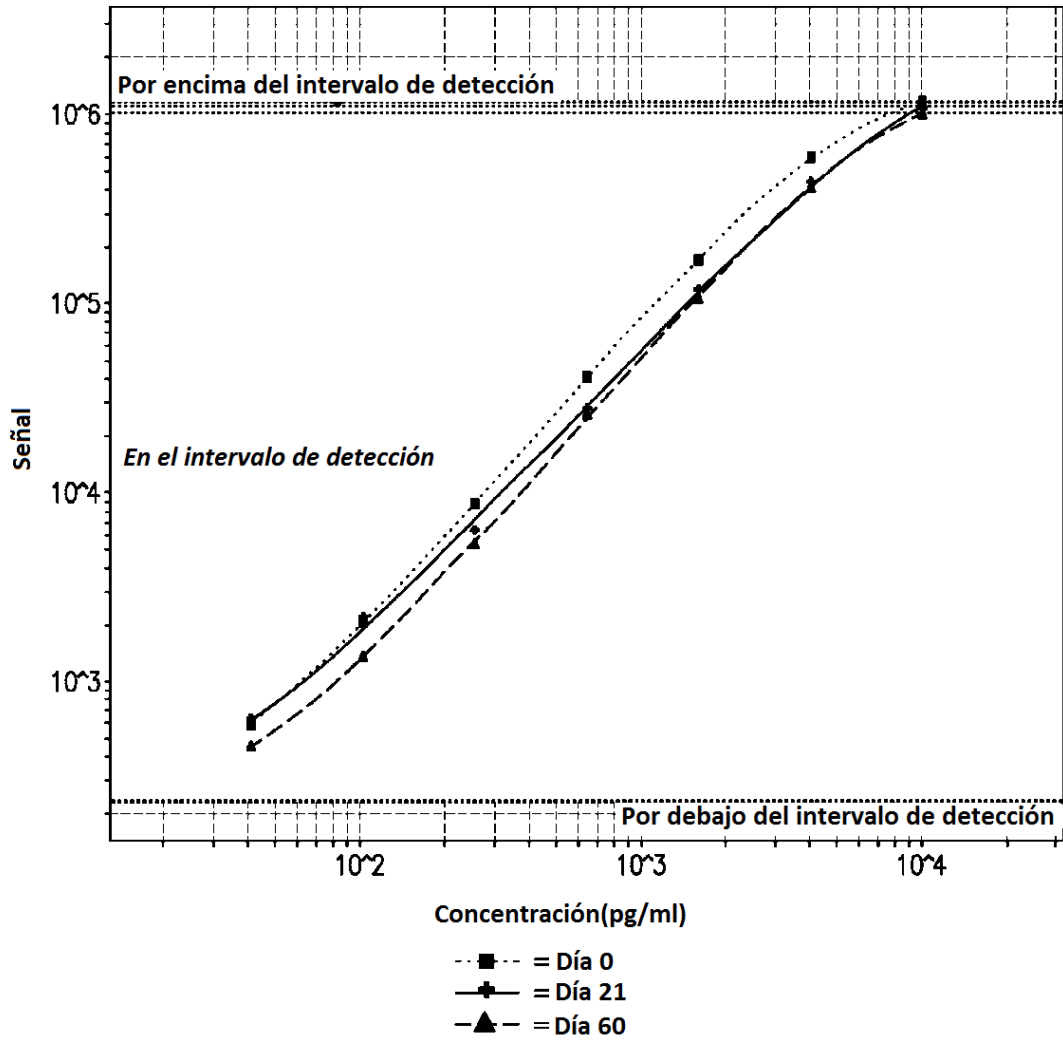
GS#6 a 37 C



**FIG. 10H**

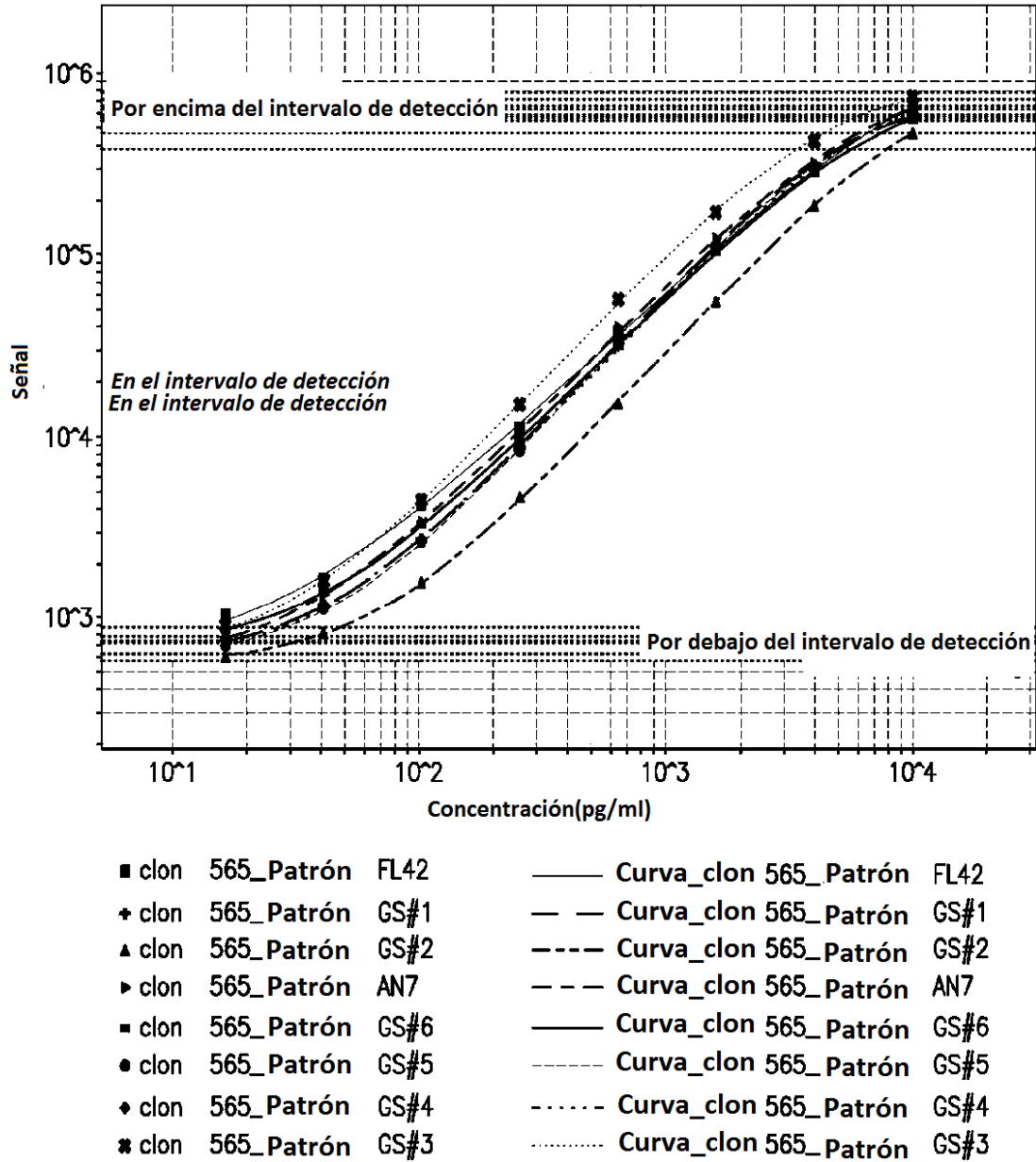


AN-7 a 37 C



**FIG. 10I**

Plot\_20101129140314



**FIG. 11**

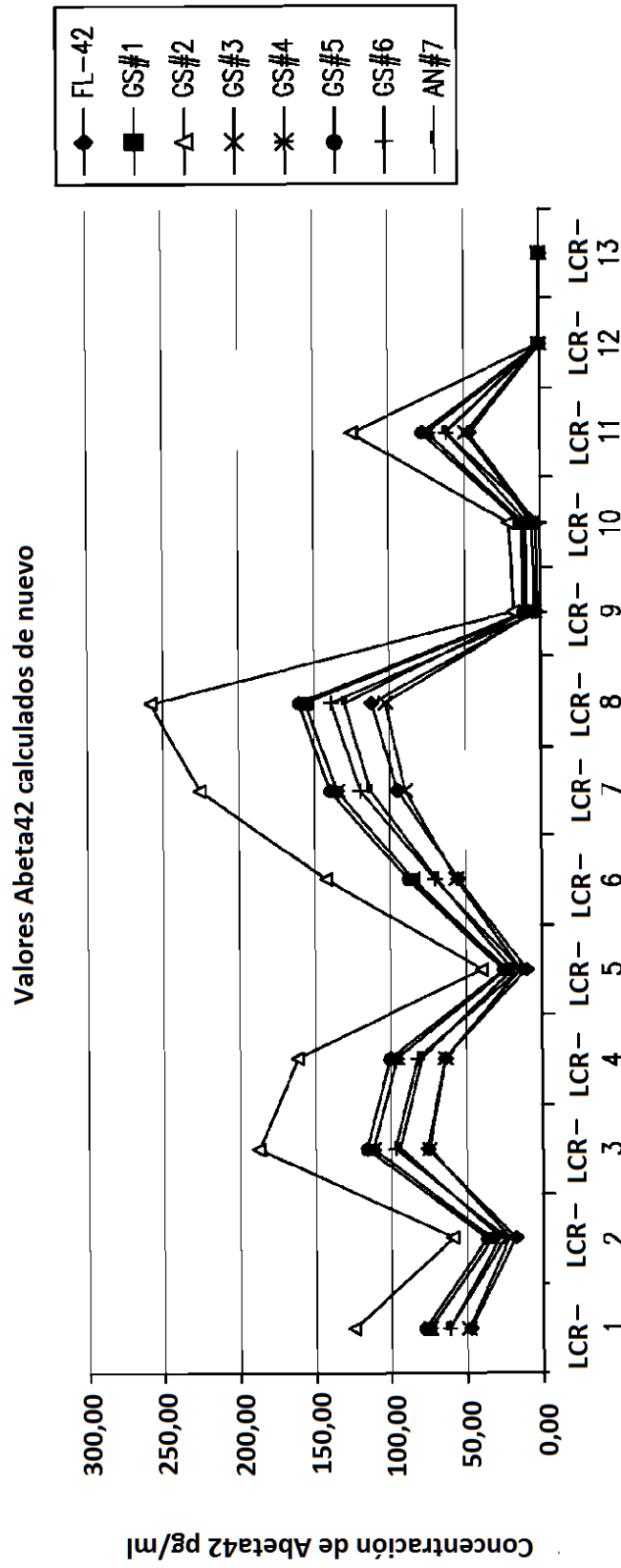
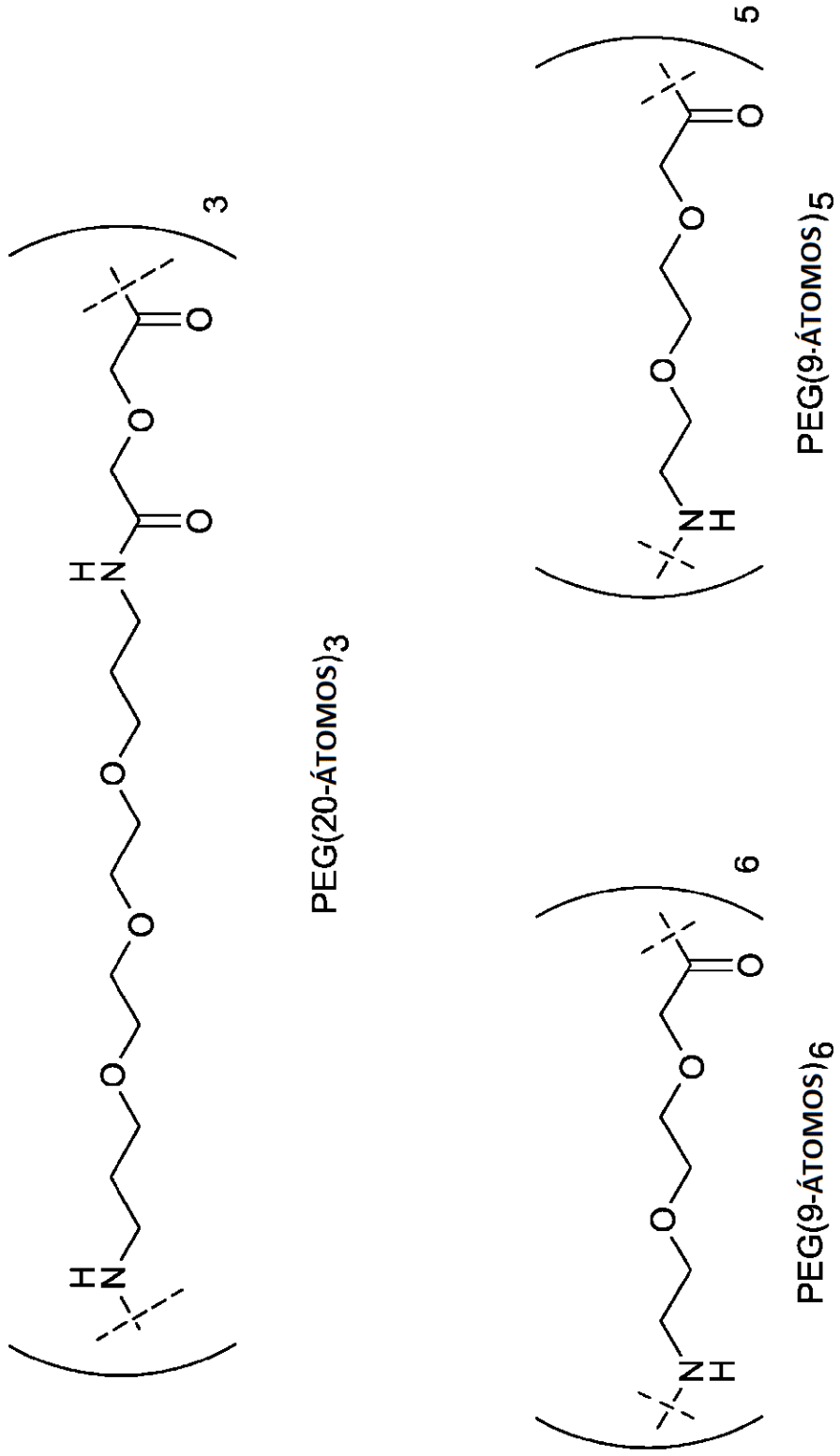


FIG. 12



**FIG. 13**