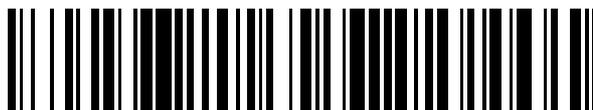


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 545**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

B01D 15/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2014 PCT/DE2014/000319**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15003674**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2014 E 14761560 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 3019870**

54 Título: **Procedimiento para la caracterización cuantitativa de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en una muestra**

30 Prioridad:
12.07.2013 DE 102013011634

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2018

73 Titular/es:
**FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH (100.0%)
52425 Jülich, DE**

72 Inventor/es:
**NAGEL-STEGER, LUITGARD;
BRENER, OLEKSANDR;
GREMER, LOTHAR y
WILLBOLD, DIETER**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 670 545 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la caracterización cuantitativa de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en una muestra

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la caracterización cuantitativa de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en una muestra, entre otras para la determinación cuantitativa de la influencia de un producto activo sobre la concentración, tamaño y forma de agregados de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas.

Estado de la técnica

- 10 Por Deguo et al. (Deguo Du, Amber N. Murray, Ehud Cohen, Hyun-Eui Kim, Ryan Simkovsky, Andrew Dillin y Jeffery W. Kelly (2011). A Kinetic Aggregation Assay Allowing Selective and Sensitive Amyloid- β Quantification in Cells and Tissues. *Biochemistry* 50, 1607-1617) es conocido un ensayo de agregación para la cuantificación Abeta.

Aún no existe ningún medicamento admitido para un tratamiento causal de la demencia debida a Alzheimer (AD). En los cerebros de pacientes de AD se encuentran típicamente acumulaciones *post-mortem* del denominado péptido beta-amiloide ($A\beta$) en placas. Por lo tanto, ya desde hace tiempo, diversas formas de $A\beta$, por ejemplo fibrillas, se consideran responsables de la aparición y el progreso de AD.

- 15 Desde hace algunos años, especialmente los pequeños $A\beta$ -agregados ($A\beta$ -oligómeros) se consideran responsables principales de la aparición y el progreso de AD. Por consiguiente, una reducción o eliminación completa de $A\beta$ -oligómeros sería el criterio más importante para curar o retardar la AD.

- 20 Los $A\beta$ -monómeros se producen constantemente en nuestro cuerpo y probablemente no son tóxicos de por sí. Se especula si los $A\beta$ -monómeros, dependiendo de su concentración, que resulta en último término debido a tasas de formación y degradación en el cuerpo, se acumulan accidentalmente y, de este modo, con probabilidad cada vez mayor con edad creciente, de manera espontánea para dar $A\beta$ -oligómeros. Los $A\beta$ -oligómeros ya formados se podrían propagar mediante un mecanismo similar a prion y conducir a la enfermedad en último término.

- 25 Debido a estas consideraciones, el objetivo de un tratamiento causal sería destruir completamente $A\beta$ -oligómeros tóxicos y/o impedir su propagación similar a prion. En este caso, un punto importante consiste en que cada producto activo se debe someter a ensayo en un modelo animal y en estudios clínicos. Éstos requieren mucho tiempo y costes elevados. Sería muy ventajosa una investigación *in vitro* rápida, fiable y cuantitativa, que seleccionara previamente los productos activos más efectivos contra $A\beta$ -oligómeros.

- 30 Hace algunos años se identificó un péptido D-enantiomérico con el nombre D3 mediante una selección de reflejo-expresión de fagos contra $A\beta$ (1-42) predominantemente monómero, con el plan de estabilizar éste mediante el enlace e impedir su transformación en $A\beta$ -agregados tóxicos. Según los conocimientos actuales, D3 destruye los $A\beta$ -oligómeros especialmente tóxicos, y en este caso se transforma en agregados no tóxicos, no de tipo amiloide y ThT-negativos amorfos. En el modelo animal, incluso mediante una administración oral de D3 con el agua se consigue que los ratones AD transgénicos tratados contengan claramente menos placas y posean propiedades cognitivas significativamente mejoradas.

- 35 Según el estado de la técnica, los $A\beta$ -oligómeros, por ejemplo en una muestra que contiene $A\beta$, no separada, se detectan y cuantifican por medio de anticuerpos específicos del oligómero. Este método es solo semicuantitativo, ya que, para cada muestra a determinar, se requiere un estándar comparativo que se debe llevar necesariamente al ensayo junto con la muestra a medir. Además, este método no es fiable, ya que los anticuerpos específicos del oligómero no identifican cualquier tipo de oligómero, o no identifican éstos en la misma medida.

- 40 Por lo demás, con ayuda de diversas técnicas de centrifugado se puede fraccionar una muestra que contiene $A\beta$, de modo que se presentan diferentes especies $A\beta$ en diferentes fracciones. Esto se puede analizar a continuación por medio de ELISA, Western Blot o SDS-PAGE, como es sabido, por ejemplo, por Funke et al. (S. A. Funke, T. van Groen, I. Kadish, D. Bartnik, L. Nagel-Steger, O. Brener, T. Sehl, R. Batra-Safferling, C. Moriscot, G. Schoehn, A. H. C. Horn, A. Muller-Schiffmann, C. Korth, H. Sticht, D. Willbold. Oral Treatment with the D-Enantiomeric Peptide D3 Improves the Pathology and Behavior of Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *ACS Chem. Neurosci.* (2010), 1, 639-648).

Un tercer método que se emplea con frecuencia es el ensayo de tioflavina T (ThT), con el que, no obstante, solo se puede medir una reducción de la proporción de fibrillas de manera desfavorable. Según el actual conocimiento, esto no es suficiente para identificar un candidato a producto activo prometedor para la reducción de oligómeros.

- 50 Por consiguiente, todas las técnicas basadas en detección de anticuerpos son desfavorablemente dependientes de

la accesibilidad del epítipo. No obstante, debido a diversas estructuras de A β -agregados, los epítipos están ocultos muchas veces. Los análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) son ciertamente independientes de los problemas citados con anterioridad, pero tienen desfavorablemente una menor sensibilidad y no son cuantitativos. Además, SDS-PAGE es desfavorable, ya que se forman e identifican diversas bandas de dímeros, trímeros y tetrámeros, puesto que especialmente las muestras intensamente agregantes forman agregados de peso molecular elevado. Por consiguiente, también este procedimiento es desfavorable y solo semicuantitativo, ya que, para cada muestra a determinar, se requiere un estándar comparativo que se debe llevar necesariamente al ensayo junto con la muestra a medir.

Tarea de la invención

La tarea de la invención es poner a disposición un procedimiento para la caracterización cuantitativa de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en una muestra.

Solución de la tarea

La tarea se soluciona conforme al procedimiento según la reivindicación 1. De las reivindicaciones referidas a ésta resultan acondicionamientos ventajosos a tal efecto.

Descripción de la invención

El procedimiento para la caracterización cuantitativa de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en una muestra presenta los siguientes pasos:

- se pone a disposición una muestra, comprendiendo la muestra un péptido amiloide y/o agregante y/o una proteína en al menos un tamaño y forma de agregado,
- un añade un producto activo a investigar a la disolución de muestra,
- se separan los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas respecto a su tamaño y forma de agregado mediante centrifugado por gradiente de densidad como fraccionamiento. De este modo, a partir de la muestra se obtiene una pluralidad de fracciones analizables respecto a la concentración, en las que los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas se presentan con un determinado tamaño y una determinada forma de agregado,
- opcionalmente, los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas de una determinada fracción se desnaturalizan completamente para dar componentes monoméricos,
- la modificación de concentración de los componentes peptídicos y/o proteicos se determina mediante una comparación con valores de control sin el producto activo.

La tarea se soluciona igualmente mediante el siguiente procedimiento.

El procedimiento para la caracterización cuantitativa de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en una muestra presenta los siguientes pasos:

- se pone a disposición una muestra, comprendiendo la muestra un péptido amiloide y/o agregante y/o una proteína en al menos un tamaño y forma de agregado,
- un añade un producto activo a investigar a la disolución de muestra,
- se separan los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas respecto a su tamaño y forma de agregado mediante centrifugado por gradiente de densidad como fraccionamiento en varias, al menos 2, preferentemente al menos 3, de modo especialmente preferente al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 fracciones analizables. De este modo, a partir de la muestra se obtiene una pluralidad de fracciones analizables respecto a la concentración, en las que los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas se presentan con un determinado tamaño y una determinada forma de agregado,
- opcionalmente, los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas de una determinada fracción se desnaturalizan completamente para dar componentes monoméricos,
- la modificación de concentración de los componentes peptídicos y/o proteicos en al menos una fracción, preferentemente en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o bien 15, respecto a la concentración de fracciones analizables, se determina mediante una comparación con valores de control sin el producto activo.

Mediante uno de los procedimientos citados anteriormente se puede analizar cualquier fracción deseada sobre modificaciones de concentración tras adición de producto activo. Por consiguiente, el procedimiento representa un paso de procedimiento que permite analizar más de una concentración sobre modificaciones de concentración, o también sobre modificaciones de tamaño de agregado u otros parámetros. Por lo tanto, mediante el procedimiento se obtienen fracciones que se pueden analizar de modo tanto cuantitativo como cualitativo, y no solo respecto a modificaciones de concentración. No obstante, el concepto "fracción deseada" en el sentido del procedimiento no

comprende en particular exclusivamente aquellas fracciones que contenían también péptidos agregantes y/o agregados y/o componentes proteicos antes de la separación, en especial oligómeros tóxicos.

En primer lugar se prepara una disolución de muestra que comprende péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas. También se puede extraer una muestra de otro experimento, un cultivo celular, un animal o un hombre.

5 Los péptidos y/o las proteínas presentan un comportamiento de agregación. Es decir, bajo determinadas condiciones, los péptidos y/o las proteínas se agregan para dar formas moleculares superiores. A modo de ejemplo cítese el A β (1-42)-péptido que se produce en la demencia debida a Alzheimer, que presenta una tendencia a la agregación especialmente fuerte. Además de A β (1-42), también se producen otras variantes de A β , por ejemplo A β (1-40), A β (1-43), A β (3-40), A β (1-40), piroGlu-A β (3-40) y piroGluA β (3-42).

10 Se concentra o se pone a disposición, por ejemplo, un ensamblaje citotóxico, oligomérico, de (A β)péptido y/o de proteína, ajustándose una distribución de tamaños específica mediante una incubación previa. Ventajosamente, esto provoca que el producto activo a analizar se pueda analizar con exactitud y de modo claramente cuantitativo respecto a su influencia sobre la distribución de tamaños de partícula, y en caso dado distribución de tamaños. Incluso en el caso de muestras agregantes que comprenden A β (1-42), de este modo se puede determinar
15 rápidamente la influencia del producto activo sobre las especies A β -oligoméricas tóxicas en la muestra.

Se añade un producto activo a la muestra, que comprende los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas con diferente tamaño y forma de agregado. El producto activo varía la distribución de tamaños, y con ella la concentración de determinados agregados en la muestra. Esta modificación de concentración se verifica cuantitativamente. La modificación es una medida de la reducción, o incluso de la eliminación completa de
20 determinadas especies tóxicas con tamaño de agregado, o bien partícula identificable. Es decir, durante el procedimiento se identifica el aumento o el descenso de la concentración de determinados péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas a través de la modificación de la distribución de tamaños de agregado.

Para una investigación a efectuar se analizan varios productos activos y su influencia sobre la muestra. Después se pone a disposición ventajosamente un procedimiento para una rápida selección previa de productos activos apropiados.
25

La composición de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas con diferente tamaño y forma de agregado se modifica durante el procedimiento bajo influencia del producto activo. Mientras que algunos péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas con un determinado tamaño estaban presentes inicialmente en la muestra, éstos se reducen o incluso se eliminan ventajosamente por completo bajo la influencia del producto activo. Otros tamaños de
30 partícula aumentan o permanecen constantes bajo la influencia del producto activo.

Las partículas que están constituidas por los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas se separan entre sí.

De este modo se logra ventajosamente la obtención de una pluralidad de fracciones a partir de la muestra. En las fracciones, las partículas están contenidas en péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas con un determinado tamaño y forma de agregado en cada caso. Esta separación de partículas se efectúa por medio de un centrifugado por gradiente de densidad según el valor s . Se puede recurrir asimismo a otros parámetros físicos de los agregados como base del fraccionamiento a realizar, por ejemplo el radio hidrodinámico de las partículas. Las fracciones se separan espacialmente, por ejemplo mediante pipeteado. El centrifugado por gradiente de densidad tiene la ventaja de poner a disposición todos los agregados de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas presentes originalmente en la muestra para un análisis cuantitativo ulterior.
35

Finalmente se determina la concentración de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en la respectiva fracción.
40

Ventajosamente, de este modo se determina de manera cuantitativa la modificación de concentración de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas con determinado tamaño en cada caso bajo la influencia del producto activo. Mediante una comparación con controles sin el producto activo se puede determinar cuantitativamente la influencia del producto activo sobre la distribución de los agregados de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en la respectiva fracción. De este modo se obtiene una medida, entre otras, a través de la eficacia del producto activo respecto a su capacidad de eliminar de la muestra determinadas especies, por ejemplo oligómeros tóxicos.
45

Es posible investigar una única fracción de este modo. Con el procedimiento según la invención se obtiene entonces una medida sobre la capacidad del producto activo de modificar cuantitativamente determinados confómeros a partir de la fracción, por ejemplo eliminar oligómeros tóxicos de la muestra.
50

De este modo se pone a disposición ventajosamente un procedimiento en el que se pueda determinar cuantitativamente la modificación de la proporción de monómeros y/u oligómeros y/o fibrillas y/o agregados especialmente grandes bajo la influencia del producto activo.

- 5 En un acondicionamiento de la invención se analiza también la modificación de la distribución de formas de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas bajo la influencia del producto activo, por ejemplo mediante microscopía de campo de fuerza. De este modo, además de la modificación de tamaños de partícula, también se registra, verifica y/o confirma ventajosamente la modificación de la distribución de formas de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas bajo la influencia del producto activo.
- 10 En un procedimiento de detección se analizan ventajosamente *in vitro* varios productos activos respecto a la influencia sobre la distribución de tamaños de partícula de la muestra. El procedimiento es muy especialmente apropiado para la detección de productos activos potenciales contra la demencia debida a Alzheimer (AD) basándose en la modulación de amiloide- β (A β)-oligómeros bajo la influencia del producto activo.
- 15 El procedimiento según la invención proporciona además un resultado cuantitativo completo respecto a la distribución variable de tamaños de partícula, o bien agregado, de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas bajo la influencia del producto activo. De este modo se seleccionan previamente los productos activos prometedores, por ejemplo para una terapia de la demencia debida a Alzheimer, que reducen las concentraciones de componentes tóxicos solubles, como por ejemplo de A β -oligómeros.
- 20 El procedimiento no está limitado a esto. Sin una limitación del procedimiento, éste permite además determinar si el producto activo conduce a un aumento de otras especies potencialmente tóxicas o deseadas en la muestra. En el caso de demencia debida a Alzheimer, entre éstas cuentan, por ejemplo, los monómeros y/o las fibrillas A β (1-42). El procedimiento se aplica preferentemente en la determinación de productos activos, que no conducen a un aumento de otros componentes tóxicos según el actual nivel de conocimientos. A tal efecto, de modo especialmente ventajoso, según la invención se investigan gracias de las fracciones obtenidas respecto a modificación de la concentración de componentes.
- 25 En un acondicionamiento de la invención especialmente ventajoso se prepara una muestra que comprende pocas, o no contiene en absoluto fibrillas y/o agregados mayores. De este modo se ocasiona ventajosamente que se pueda identificar de modo especialmente sencillo su formación bajo influencia del producto activo.
- 30 El fraccionamiento de los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas que se encuentran en la disolución de muestra se efectúa por medio de un centrifugado por gradiente de densidad bajo empleo, por ejemplo, de Optiprep, Percoll, sacarosa o material de gradiente de densidad análogo. En este caso, los agregados se separan entre sí según el tamaño y, en caso dado, la forma (coeficiente de sedimentación). Este procedimiento es especialmente ventajoso en el caso de agregados A β (1-42) agregantes y agregados microtubulares.
- 35 El concepto "determinado exactamente" comprende de modo especialmente ventajoso un paso de calibrado en el fraccionamiento mediante moléculas de forma y comportamiento conocidos. Tras el fraccionamiento, en cada fracción se presenta solo un tipo determinado (es decir, conocido) de conformero, por ejemplo oligómeros o fibrillas, etc.
- 40 En el centrifugado por gradiente de densidad, los conformeros se separan según su valor *s* o coeficientes de sedimentación como paso de fraccionamiento. Moléculas de diferente tamaño pueden poseer un radio hidrodinámico idéntico, aunque tienen valores de *s* diferentes y también se separan según éstos. Mediante un calibrado con moléculas de valor *s* conocido, los agregados obtenidos por medio de centrifugado por gradiente de densidad se determinan exactamente según su valor *s*.
- 45 En un acondicionamiento de la invención especialmente ventajoso, la modificación de concentración en péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas con un determinado tamaño en una fracción respectiva se determina tras la adición del producto activo mediante una desnaturalización completa de péptidos amiloides y/o componentes proteicos durante una (RP)HPLC en fase inversa llevada a cabo a continuación del fraccionamiento.
- 50 En general, se puede efectuar una desnaturalización completa a través de una reacción fisicoquímica con un agente desnaturalizante o a través de la temperatura. De este modo se provoca ventajosamente que se alimenten exclusivamente los componentes monoméricos al análisis cuantitativo.
- En un acondicionamiento de la invención muy especialmente ventajoso, el paso de desnaturalización se efectúa casi de por sí mediante la química de la columna y la temperatura. De este modo se ahorran varios pasos en la elaboración de la muestra, de modo que el procedimiento según la invención se puede llevar a cabo muy rápidamente.
- No obstante, la concentración de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en la respectiva fracción se puede determinar también mediante marcaje isotópico del péptido empleado y/o de la proteína empleada, y recuento de escintilación de las fracciones, que se efectúa a continuación del fraccionamiento.

Para determinar qué influencia tenía la adición de productos activos sobre oligómeros presentes, la disolución se incubaba en primer lugar y después se estratifica preferentemente a un gradiente de densidad preformado antes o después de la adición de productos activos, y las partículas de agregado contenidas en la misma se separan correspondientemente mediante ultracentrifugado. En este caso, el tamaño de partícula juega un papel importante.

5 En el transcurso de este centrifugado se separan de este modo, por ejemplo, diferentes A β -agregados, como monómeros, oligómeros y fibrillas, o agregados amorfos, según sus coeficientes de sedimentación, entre otras cosas dependientes del tamaño de partícula. Éstos se cosechan de manera fraccionada.

10 En el centrifugado por gradiente de densidad, los diferentes agregados se separan entre sí según su valor s . Cuanto mayor es la partícula, tanto más migra ésta en el gradiente. En las fracciones cosechadas se determina la concentración de péptido (A β) amiloide y/o agregante y/o de proteína por medio de RP-HPLC.

A tal efecto, la fracción de gradiente que contiene partículas con tamaño correspondiente, bajo las condiciones de centrifugado empleadas, se desnaturaliza por completo y se analiza mediante RP-HPLC.

15 La desnaturalización de los agregados para dar monómeros se puede efectuar completamente, por ejemplo, en un material de columna de RP-HPLC, como por ejemplo una columna C8 con aproximadamente un 30 % (v/v) de acetonitrilo y un 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético como fase de HPLC móvil a una temperatura de columna de aproximadamente 80°C. Los monómeros de péptido amiloide y/o agregante y/o proteína que se producen se separan entonces, preferentemente mediante RP-HPLC, según hidrofobicidad. De este modo también se separan ventajosamente especies A β del material de gradiente de densidad iodixanol, que imposibilita la medición de absorción de proteínas debido a sus propiedades espectroscópicas. El péptido eluyente, como por ejemplo A β , se detecta por medio de absorción UV a 215 nm. La integración de superficies de pico se puede efectuar por medio del software Agilent Chemstation. El cómputo de valores producidos de este modo con el calibrado llevado a cabo previamente permite el cálculo de la concentración del péptido, o bien de la proteína presente en la respectiva fracción. Según fracción, el valor medio se debía calcular a partir de varios, por ejemplo seis experimentos llevados a cabo de modo independiente entre sí, con la desviación estándar que resulta.

25 La ventaja del análisis por HPLC consiste en que se puede detectar de manera muy sensible (por ejemplo aproximadamente 20 nM o 1,8 ng A β (1-42)) y cuantificar de manera fiable, por ejemplo, A β independientemente del estado de agregación previo.

30 Por lo tanto, una ventaja decisiva del procedimiento según la invención puede consistir en un acoplamiento de centrifugado por gradiente de densidad y RP-HPLC, que posibilita una cuantificación fiable, en especial también de A β -oligómeros. A tal efecto, en un acondicionamiento ventajoso de la invención se analiza la fracción que comprende oligómeros tóxicos, con y sin adición de productos activos, y su modificación de la concentración.

35 Sorprendentemente, en el ámbito de la invención se identificó que la fase móvil empleada durante la RP-HPLC, en combinación con la temperatura de columna elevada, garantiza una desnaturalización completa de las especies A β presentes en todos los posibles estados de agregación. Un especialista puede adaptar la química y la temperatura a las condiciones de este paso de procedimiento, de modo que se efectúe la desnaturalización de la muestra deseada.

Este conocimiento es sorprendente en tanto que algunas de las especies A β que se presentan en la demencia debida a Alzheimer muestran tendencias a la agregación especialmente elevadas. No obstante, también en este caso se garantiza la desnaturalización de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas para dar el monómero.

40 Además es especialmente sorprendente que, con una RP-HPLC, también el péptido amiloide y/o agregante y/o la proteína presente como monómero mediante desnaturalización se pueda separar limpiamente de la sustancia que forma el gradiente de densidad, y que el análisis cuantitativo se facilite de modo reproducible.

45 Por consiguiente, mediante la combinación especialmente ventajosa de un fraccionamiento basado en centrifugado por gradiente de densidad y la determinación de la concentración con RP-HPLC se desarrolló un procedimiento que cuantifica de modo especialmente rápido la influencia de productos activos potenciales sobre la proporción de especies oligoméricas tóxicas de un A β (1-42)-péptido u otros péptidos y/u otras proteínas, ya que en este caso se deshabilita la forma monomérica.

50 Una comprobación del control con la muestra que contiene un producto activo o un ligando natural permite una determinación reproducible y rápida de la efectividad de productos activos respecto a la eliminación y reducción de determinadas especies, como por ejemplo oligómeros y, por lo tanto, una estimación de su acción en un modelo animal, y más tarde en las fases de ensayo clínicas. En contrapartida, según el estado de la técnica solo se describe la posibilidad de cuantificar la influencia de una sustancia sobre el contenido en A β -oligómero.

No obstante, de modo muy especialmente ventajoso, mediante correspondiente análisis y cuantificación por HPLC también se obtienen simultáneamente datos sobre la influencia que tiene el producto activo sobre el aumento de

péptido amiloide y/o agregante y/o proteína en otras fracciones, por ejemplo en fracciones que contienen A β -monómeros y/o fibrillas.

- 5 Es posible que, con el procedimiento según la invención, una mayoría de productos activos potenciales se cuantifiquen respecto a su influencia sobre la distribución de tamaños de partícula de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en una muestra, de modo rápido y reproducible. En este caso, la muestra puede ser de tipo sintético. No obstante, también se pueden analizar productos activos naturales o muestras extraídas de este modo.

Ejemplos de realización

A continuación se explica la invención más detalladamente por medio de ejemplos de realización y las figuras adjuntas, sin que por ello se llegue a una limitación de la invención.

- 10 El procedimiento según la invención se aplicó para cuantificar el efecto de D3 (enantiómero D) según SEQ ID NO: 1 sobre A β -oligómeros. Para la comprobación en un análisis se sintetizó un dímero de D3 y se empleó en el ensayo descrito anteriormente para verificar si D3D3 (enantiómero D) es de hecho más eficiente que D3.

- 15 Para los siguientes ejemplos de realización se requirieron únicamente una ultracentrífuga y una instalación de HPLC con columna de separación apropiada y un detector UV. Para la determinación de la reducción de la proporción de A β -oligómero en una mezcla de agregado se disolvió A β (1-42)-péptido pretratado y desecado, y se incubó hasta que se produjo una proporción de A β -oligómero lo mayor posible. A esta muestra enriquecida con oligómeros se añadió correspondientemente el producto activo a analizar.

Muestran:

- 20 La Figura 1: cromatograma en columna de una RP-HPLC para diferentes estados de agregación del A β (1-42)-péptido.
- La Figura 2: cromatograma de RP-HPLC para las fracciones 1 a 15 de un gradiente de densidad con las concentraciones calculadas a partir del mismo por cada fracción.
- La Figura 3: distribución de tamaños promedio para seis controles A β (1-42) sin adición de productos activos tras centrifugado por gradiente de densidad y RP-HPLC.
- 25 La Figura 4: aplicación del procedimiento presentado al análisis de productos activos potenciales para la terapia de la demencia debida a Alzheimer en el ejemplo de un D-péptido (D3) y su dímero tándem (D3D3).
- La Figura 5: planteamiento de ensayo para la caracterización cuantitativa de A β amiloide y/o agregante sin y con producto activo, así como verificación de la modificación de la concentración de monómeros en diversas fracciones tras desnaturalización durante y con la RP-HPLC y la adición de producto activo.
- 30

Material y métodos

- 35 Se incubó 1 mg de A β (1-42) liofilizado (Bachem, Heidelberg) tras la extracción del congelador durante 10 a 30 min a temperatura ambiente (RT) para igualar la temperatura del aglomerado peptídico y el entorno y, por consiguiente, para evitar la condensación de humedad del aire. Después se disolvió el A β -péptido en HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) en una concentración de 1 mg/700 μ l, y se incubó para la disolución completa durante la noche bajo agitación y RT, con el fin de asegurar que en este momento el A β (1-42) se presentaba completamente dissociado en monómeros. A continuación se alicuotó el A β (1-42), respectivamente 36 μ g por recipiente de Eppendorf. Para eliminar el HFIP se dejaron reposar las alicuotas al descubierto bajo la extracción durante aproximadamente 30 min. El concentrador de vacío por rotación (concentración de vacío rotatorio RVC 2-18, Christ, Mainz-Mombach) se enfrió previamente aproximadamente 30 min. Después se secaron adicionalmente las alicuotas de A β (1-42) durante 30 min en el concentrador de vacío por rotación, para poder evaporar también los últimos restos de HFIP. El A β (1-42) dividido en alicuotas, desecado, se almacenó hasta empleo a -20 °C.
- 40

- 45 Antes del experimento se disolvió una alicuota de A β (1-42) en 100 μ l de tampón NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 10 mM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), pH 7,4 a 80 μ M, y se incubó bajo agitación a RT durante 6 h. El tiempo de incubación de 6 h se optimizó para este A β de esta firma especial con el fin de asegurar se presente una proporción de A β como oligómero lo mayor posible, para poder medir su reducción lo más claramente posible. Para otros A β -péptidos de otras firmas fabricantes, el tiempo de incubación se puede variar y se se debe/puede adaptar correspondientemente.

Después se añadió el candidato a producto activo a analizar a 10 o 20 μM . La coincubación de la disolución de producto activo A β se efectuó siempre bajo agitación a RT 40 min. En caso de no añadir producto activo (control), la disolución de A β se trató del mismo modo.

5 A continuación se estratificaron las muestras a un gradiente de densidad preformado (véase la Tabla 1). El material de gradiente empleado estaba constituido por una disolución de iodixanol al 60 % (w/v) con el nombre Optiprep™ (Axis-Shield, Oslo, Noruega). Éste es un compuesto dímero de iohexol con el nombre sistemático 5,5-[(2-hidroxi-1,3-propanodiilo)-bis(acetilimino)]bis-[N,N'-bis(2,3hidroxipropil)-2,4,6-triyodobencenodicarboxamida]. La producción del gradiente discontinuo se efectuó pipiteándose sobre el fondo de un tubo de centrífuga de polialómero (Beckman-Coulter, Palo Alto, USA) con las dimensiones 11 x 34 mm la dilución de Optiprep más densa, y recubriéndose con las diluciones menos densas. El gradiente ajustado a pH 7,4 con tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM se desarrolló a partir de seis etapas según la tabla 1.

Volumen (μl)	Iodixanol (% w/v)	Densidad (g/ml)
100	5	1,030
260	10	1,056
780	20	1,109
260	30	1,162
260	40	1,215
260	50	1,267

Tab. 1: volúmenes, concentración y densidad de las etapas de gradiente.

15 El gradiente de densidad no lineal se centrifugó a 4°C y 259.000 x g en un rotor libre TLS-55 (Beckman-Coulter, Palo Alto, USA) durante 3 h en una ultracentrífuga TL 100 (Beckman-Coulter, Palo Alto, USA). Mediante determinación refractométrica de la concentración de iodixanol en las fracciones aisladas se mide el gradiente de densidad. Una estimación del tamaño de partículas proteicas sedimentadas por medio de la posición en el gradiente al final de la centrifugación se efectúa por medio de un calibrado con proteínas marcadoras de tamaño y forma conocidos, que se analizaron sobre el gradiente bajo condiciones de centrifugación idénticas.

20 La recogida de las fracciones se efectuó de arriba hacia abajo mediante pipeteado cuidadoso. Se obtuvieron 14 fracciones de 140 μl respectivamente. Por consiguiente, la 1ª fracción era la de menor densidad y la fracción 14ª era la de mayor densidad. Posiblemente se incluyó en el análisis proteína pelletizada. En el tubo de centrífuga recogido se introdujeron 60 μl de cloruro de guanidinio 6 M (GdnCl) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) y se llevaron a ebullición 10 min a 98°C. El pellet elaborado de este modo representaba la 15ª fracción.

25 Tras el fraccionado del contenido del tubo de centrífuga se analizó cada fracción por medio de RP-HPLC (sistema de HPLC Agilent 1260 Infinity; bomba de HPLC cuaternaria con desgasificador de disolvente G1311B, unidad de temperado de columna G1316A, detector de longitud de onda múltiple G1365C, inyector manual G1328C; Agilent, Waldbronn). Como fase estacionaria se empleó una columna Zorbax SB-300 C8 (5 μm , 4,8 x 250 mm, Agilent, Waldbronn). La separación de sustancias se efectuó por vía isocrática con un 30 % (v/v) de acetonitrilo, 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético en H_2O como fase móvil con una tasa de flujo de 1 ml/min a una temperatura de columna de 80°C. El volumen de muestra ascendía a 20 μl . Se detectaron sustancias eluyentes por medio de absorción UV a 215 nm. El registro de datos y la integración de superficies de pico se efectuaron por medio del software Agilent Chemstation (Agilent, Waldbronn). Mediante el empleo de RP-HPLC se separa el material de gradiente de densidad presente en las fracciones, iodixanol, del A β (1-42)-péptido. Solo mediante esta separación es posible detectar espectroscópicamente A β , ya que, sin separación, la fuerte absorción de iodixanol en la zona UV oculta la absorción del A β -péptido.

35 La determinación de las concentraciones molares de A β se efectuó con concentraciones conocidas (serie de dilución A β). La recta de regresión adaptada para la relación lineal entre superficie y concentración de péptido tiene un coeficiente de determinación R^2 de 0,998. Debido a esta cuantificación es posible calcular la tasa de recuperación de A β 42- péptido aplicado para cada ensayo. Con este fin, las concentraciones molares determinadas por fracción se

suman tras conversión mediante multiplicación por el volumen de fracción 140×10^{-6} l (fracciones 1 a 14) y 120×10^{-6} l (fracción 15) en mol/fracción. El cociente de esta suma y el número de moles de A β -péptido contenido en la muestra aplicada proporciona la tasa de recuperación R representada en porcentaje.

$$R = \frac{c_P V_P + \sum_{n=1}^{14} c_n \cdot V_F}{c_0 \cdot V_0}$$

- 5 con c_P concentración molar de A β en el pellet, c_n concentración molar A β en las fracciones 1 a 14, c_0 concentración molar A β antes de DGZ, V_F volumen de fracción (140×10^{-6} l), V_P volumen de la fracción de pellet (120×10^{-6} l) y V_0 volumen de muestra antes de DGZ (100×10^{-6} l).

- 10 La tasa de recuperación se situaba entre un 0,8 y un 1,0, o bien entre un 80 y un 100 %. Mediante la elevada tasa de recuperación se garantiza que los datos obtenidos representen el estado de la muestra total y no describan solo una proporción de la muestra.

La ventaja del método de RP-HPLC frente a otros métodos consiste en que la cuantificación del Abeta-péptido es independiente de su estado de agregación previo, es decir, monómero, oligómero o fibrilla. Esto no se garantiza, por ejemplo, en métodos de identificación inmunoquímicos, ya que, debido a la agregación, los epítopos que forman anticuerpos son posiblemente menos accesibles, o incluso ya no son accesibles.

- 15 Se mostró que la desnaturalización de las partículas de A β 1-42 presentes de algún modo en la muestra conduce siempre a monómeros. Éstos son cuantificables de modo especialmente ventajoso con independencia de la estructura original. De este modo, las diferentes especies, como oligómeros, fibrillas y agregados amorfos, se cuantifican con seguridad, siempre como monómeros de manera reproducible.

Resultados

- 20 La Figura 1 muestra cromatogramas en columna de una RP-HPLC para diferentes estados de agregación del A β (1-42)-péptido. Por cada muestra se inyectaron 20 μ l de disolución con 1,8 ng de A β (1-42) en una columna C8 (5 μ , 4,8 x 250 mm) y se eluyeron con un 30 % (v/v) de acetonitrilo, un 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético en H₂O como eluyente con una tasa de flujo de 1 ml/min a una temperatura de columna de 80 °C. Se aplica la absorción relativa a 215 nm del eluato frente al tiempo de retención para A β (1-42) recién disuelto (0 h), preincubado 2,5 h, 19 h y 60 h, que se ajustó a un 40 % (w/v) de iodixanol, para simular las condiciones de gradiente de densidad. El iodixanol se eluye claramente antes de A β (1-42) con un tiempo de retención entre 2 y 5 min. El cromatograma documenta claramente la separación perfecta del iodixanol que impide la detección de A β en UV la cuantificación reproducible del A β -péptido, independientemente de que se presente en una muestra como monómero, oligómero o como fibrilla.

- 30 La Figura 2 muestra cromatogramas de RP-HPLC para las fracciones 1 a 15 de un gradiente de densidad con las concentraciones calculadas a partir del mismo por cada fracción. Tras la preparación de una muestra de A β (1-42) enriquecida con oligómeros, ésta se estratifica en un gradiente de densidad de iodixanol y se centrifuga con 259.000 a 4°C durante 3 h. En este caso se separan entre sí diversos A β -agregados según su valor s. Cuanto mayor es el tamaño de partícula, tanto más migra ésta en el gradiente. En las 14 fracciones recogidas de arriba a abajo, de 140 μ l de tamaño, y en el pellet llevado a ebullición con 60 μ l de GdnCl 6 M (fracción 15) se determina la concentración de A β (1-42)-péptido por medio de RP-HPLC. A tal efecto se desnaturalizan completamente 20 μ l de cada fracción en una columna C8 con un 30 % (v/v) de acetonitrilo y un 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético a una temperatura de columna de 80°C, y se separan según hidrofobicidad. En este caso se separa el A β (1-42) del material de gradiente de densidad iodixanol, que imposibilita la medición de absorción de proteínas debido a sus propiedades espectroscópicas. El A β (1-42) eluyente se detecta por medio de absorción UV a 215 nm. La integración de superficies de pico se efectúa por medio del software Agilent Chemstation. El cómputo de valores obtenidos de este modo con el calibrado llevado a cabo previamente permite el cálculo de la concentración del A β -péptido presente en la respectiva fracción. Como se muestra previamente en la Figura 1, en este caso se reúnen solo los desarrollos de elución para todas las fracciones recogidas de un gradiente de densidad en una figura (A). Es esencial la constancia del tiempo de retención para el A β (1-42), independientemente de la posición en el gradiente, y con ésta del estado de agregación del péptido. En el diagrama (B) se representan las concentraciones de A β calculadas por medio de las rectas de calibrado determinadas para la columna a partir de las superficies de pico en μ mol/litro.

- 50 La Figura 3 muestra la distribución de tamaños promedio para seis controles A β (1-42) sin adición de producto activo tras centrifugado por gradiente de densidad y RP-HPLC. Por fracción se representa respectivamente el valor medio de seis experimentos llevados a cabo independientemente entre sí, con la desviación estándar que se produce de este modo. En las primeras fracciones se encuentra de nuevo el A β (1-42)-péptido, que se presentaba como monómero en el momento del fraccionamiento. En las fracciones 4 a 6 se pueden identificar claramente oligómeros del A β (1-42)-péptido, que se han producido durante la incubación previa. Debido a su posición en el gradiente y a la

comparación con proteínas de valores conocidos, éstos tienen un valor s de aproximadamente 5 S. Debido al valor s y suponiendo una forma globular, estos oligómeros están constituidos por aproximadamente 20 unidades monoméricas. Los análisis al microscopio de fuerza pudieron confirmar la forma globular de estas partículas. Los ensayos de toxicidad con los oligómeros fraccionados mostraban sus propiedades neurotóxicas. Mediante la combinación de fraccionamiento por gradiente de densidad y determinación de la concentración con RP-HPLC se desarrolló un procedimiento que permite analizar la influencia de productos activos potenciales sobre la fracción de una especie oligomérica tóxica del A β (1-42) péptido de A β -oligómeros en una muestra, así como influencias sobre su calidad mediante productos activos potenciales.

La Figura 4 muestra la aplicación del procedimiento presentado sobre el análisis de productos activos potenciales para la terapia de la demencia de Alzheimer en el ejemplo de un péptido D (D3) y su dímero tándem (D3D3). El diagrama muestra la acción de D3 20 μ M según SEQ ID NO: D3D3 1 y 10 μ M, según SEQ ID NO: 2 sobre la distribución de tamaños de los A β (1-42)-agregados en un gradiente de densidad. Tras preparación de una muestra de A β rica en oligómeros se añade el producto activo a analizar. Esta carga se estratifica en un gradiente de densidad de iodixanol tras una incubación de 40 minutos, y se centrifuga con 259.000 g a 4 °C durante 3 h. Como control se emplea una disolución de A β (1-42) tratada análogamente sin adición de producto activo. Mediante el centrifugado se separan diferentes A β -agregados según su coeficiente de sedimentación (valor s). Cuanto mayor es el valor s de la partícula, tanto más migra ésta en el gradiente. A continuación, el gradiente se fracciona manualmente de arriba a abajo. Resultan 14 fracciones, respectivamente con 140 μ l y una fracción de pellet de 60 μ l, que se lleva a ebullición con 60 μ l de GdnHCl 6 M. Los oligómeros A β , constituidos por aproximadamente 20 unidades monoméricas (el valor s asciende aproximadamente a 5 S), se encuentran de nuevo en las fracciones 4 a 6. Para cada gradiente se analiza de todas las fracciones respectivamente una alícuota de 20 μ l por medio de RP-HPLC. Para la determinación de la concentración de A β por fracción se desnaturaliza completamente A β en la alícuota en una columna C8 con una fase móvil constituida por un 30 % (v/v) de acetonitrilo y un 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético a una temperatura de columna de 80 °C, y se separa del material de gradiente de densidad iodixanol, y se separa el producto activo, de modo que se puede detectar y cuantificar el mismo mediante su absorción UV a 215 nm. El registro de datos y la integración de superficies de pico se efectúa bajo el empleo del software Agilent Chemstation (Agilent, Waldbronn). Los datos de concentración obtenidos de este modo se aplican en el diagrama frente a los números de la fracción. En las fracciones 4 a 6, en las que se encuentran las especies A β oligoméricas, la adición de D3 a D3D3 ha conducido a una reducción de la cantidad de oligómeros. D3D3, que se ha empleado en la mitad de concentración en comparación con D3, muestra un efecto claramente más fuerte que D3 respecto a la eliminación de A β -especies oligoméricas en este sistema de ensayo. La proporción de agregados grandes en las fracciones 11 a 14 es claramente mayor bajo la influencia de los productos activos, en especial en el caso de D3D3. Por consiguiente, la combinación de gradiente de densidad y RP-HPLC representa un nuevo procedimiento para el análisis de productos activos para una terapia de la demencia debida a Alzheimer y para la caracterización cuantitativa de péptidos amiloides y/o agregantes, o bien proteínas, que emplea la capacidad de eliminación de A β -oligómeros como nuevo criterio de selección.

La Figura 5 muestra esquemáticamente una forma de realización del procedimiento según la invención en breve. Tras incubación previa de A β , la muestra se analiza ulteriormente en una carga con y sin adición de producto activo. Tras la separación en 15 fracciones con centrifugado por gradiente de densidad, después de la desnaturalización durante la RP-HPLC se determina la concentración de componentes monoméricos preferentemente en todas las 15 fracciones, y en especial se evalúa la influencia del producto activo sobre la concentración de oligómeros.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de investigación Juelich GmbH

<120> Procedimiento para la caracterización cuantitativa de péptidos amiloides y/o agregantes y/o péptidos en una muestra

<130> PT 1.2626 PCT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

< 211> 12

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

ES 2 670 545 T3

<220>
< 223> Secuencia artificial

<400> 1
Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg
1 5 10

5
<210> 2
< 211> 24
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

10
<220>
< 223> Secuencia artificial

<400> 2
Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Arg Pro Arg Thr
1 5 10 15

Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg
20

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la caracterización cuantitativa de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas en una muestra, con los pasos:
- 5 - un añade un producto activo a investigar a la disolución de muestra, poniéndose a disposición la muestra y comprendiendo la muestra un péptido amiloide y/o agregante y/o una proteína con al menos un tamaño y una forma de agregado,
 - se separan los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas respecto a su tamaño y forma de agregado mediante centrifugado por gradiente de densidad como fraccionamiento,
 - 10 - se determinan las modificaciones de concentración de los componentes peptídicos y/o proteicos en al menos una fracción mediante una comparación con valores de control sin el producto activo.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas de una determinada fracción se desnaturalizan para dar componentes monoméricos.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación precedente, caracterizado por un calibrado del fraccionamiento, en especial por un calibrado de un centrifugado por gradiente de densidad.
- 15 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la concentración de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas se determina mediante (RP)HPLC en fase inversa.
- 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que, mediante la selección de una fase móvil y/o mediante la selección de la temperatura de columna de (RP)HPLC en fase inversa se provoca simultáneamente la desnaturalización de péptidos amiloides y/o agregantes y/o proteínas para dar monómeros.
- 20 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que se selecciona una fase móvil para la HPLC en fase inversa, que posibilita también la separación de péptidos amiloides y/o agregados y/o proteínas de la sustancia que forma los gradientes de densidad.
- 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que durante el procedimiento se puso a disposición una muestra en la que se selecciona A β agregante, por ejemplo A β (1-40), A β (1-42), A β (1-43), A β (3-40), piroGluA β (3-40) y piroGluA β (3-42), o proteína microtubular, o bien otro péptido presente típicamente en la demencia debida a Alzheimer con comportamiento de agregación tendencialmente elevado.
- 25 8.- Procedimiento según la reivindicación 1 a 7, caracterizado por que se analiza la influencia también sobre la distribución de formas de péptidos amiloides y/o agregados y/o proteínas en al menos una fracción.
- 9.- Procedimiento según la reivindicación precedente, caracterizado por una investigación de las fracciones por microscopía de campo de fuerza o microscopía electrónica.
- 30 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que se compara entre sí la modificación de la concentración de componentes peptídicos y/o proteicos en varias fracciones de la muestra.
- 11.- Procedimiento según la reivindicación precedente, caracterizado por una comparación que determina la modificación de la concentración de monómeros y/u oligómeros y/o fibrillas y/u otros confórmeros de una fracción bajo influencia del producto activo, y la relaciona con otras fracciones.
- 35 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que se pone a disposición un candidato a producto activo apropiado para fines terapéuticos de una enfermedad, basada en una afección por plegamiento de proteínas defectuoso, como por ejemplo la demencia debida a Alzheimer, que permite producir pocas moléculas tóxicas tras su adición.
- 40 13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que los péptidos amiloides y/o agregantes y/o las proteínas se separan entre sí respecto a tamaño y forma de agregado en varias fracciones, al menos 2, preferentemente al menos 3, de modo especialmente preferente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 fracciones analizables.
- 45 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que, tras adición de un producto activo, se determina la modificación de la concentración de componentes peptídicos y/o proteicos en al menos una fracción, preferentemente en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o bien en todas las fracciones analizables, mediante una comparación con valores de control sin el producto activo.

15.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que se incluyen aquellas fracciones que contenían también péptidos agregantes, o bien agregados, y/o proteínas antes de la separación.

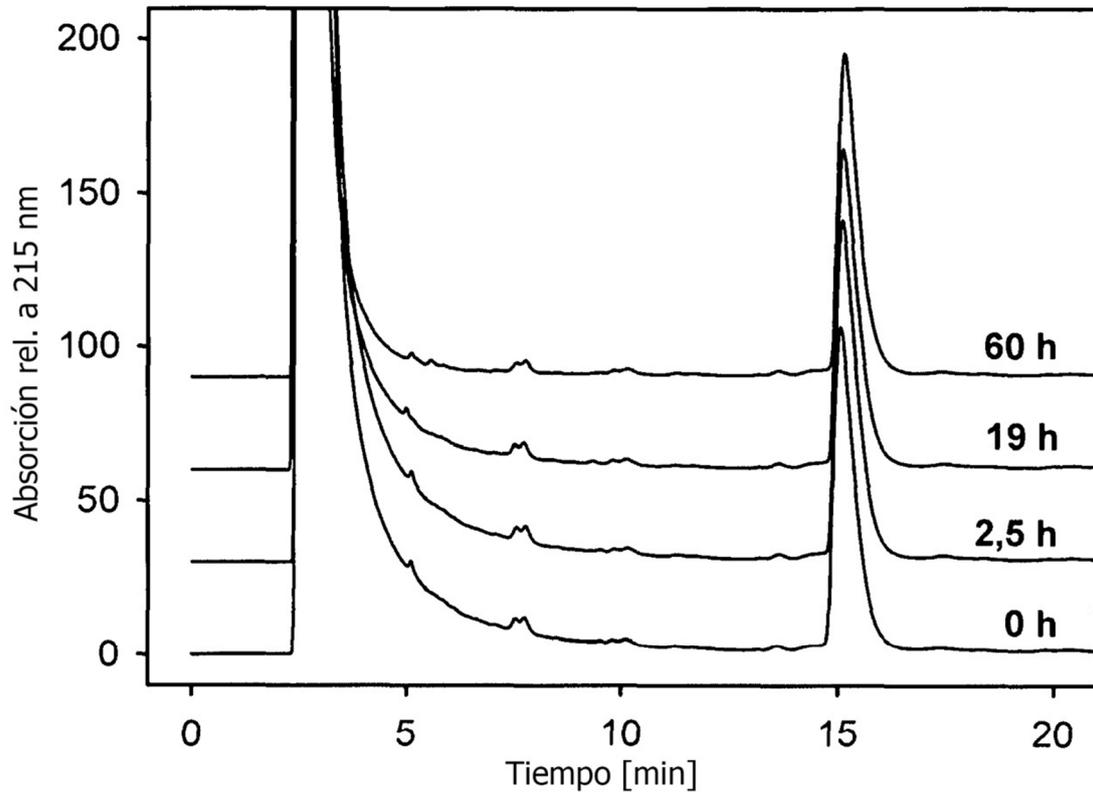


Figura 1

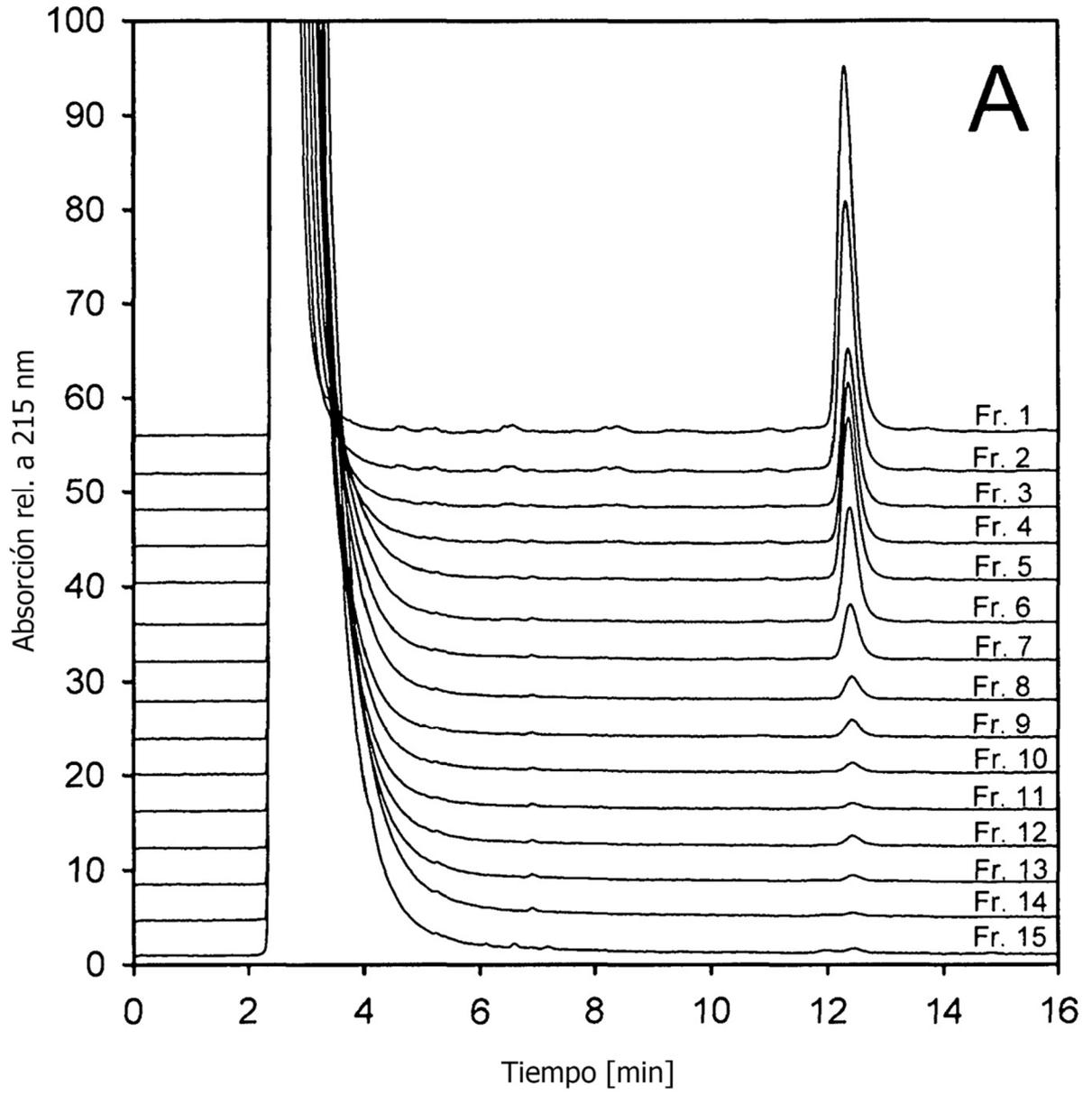


Figura 2

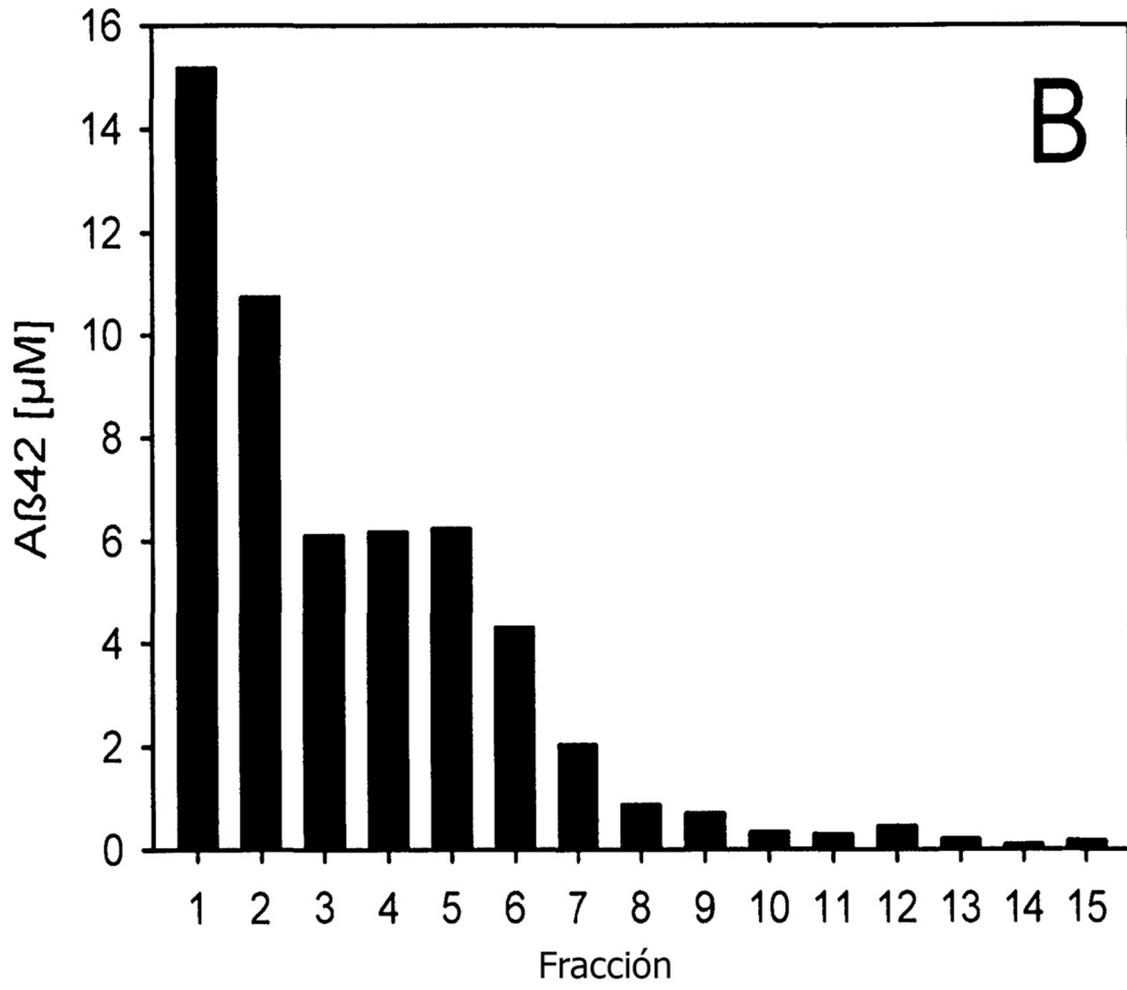


Figura 2 (continuación)

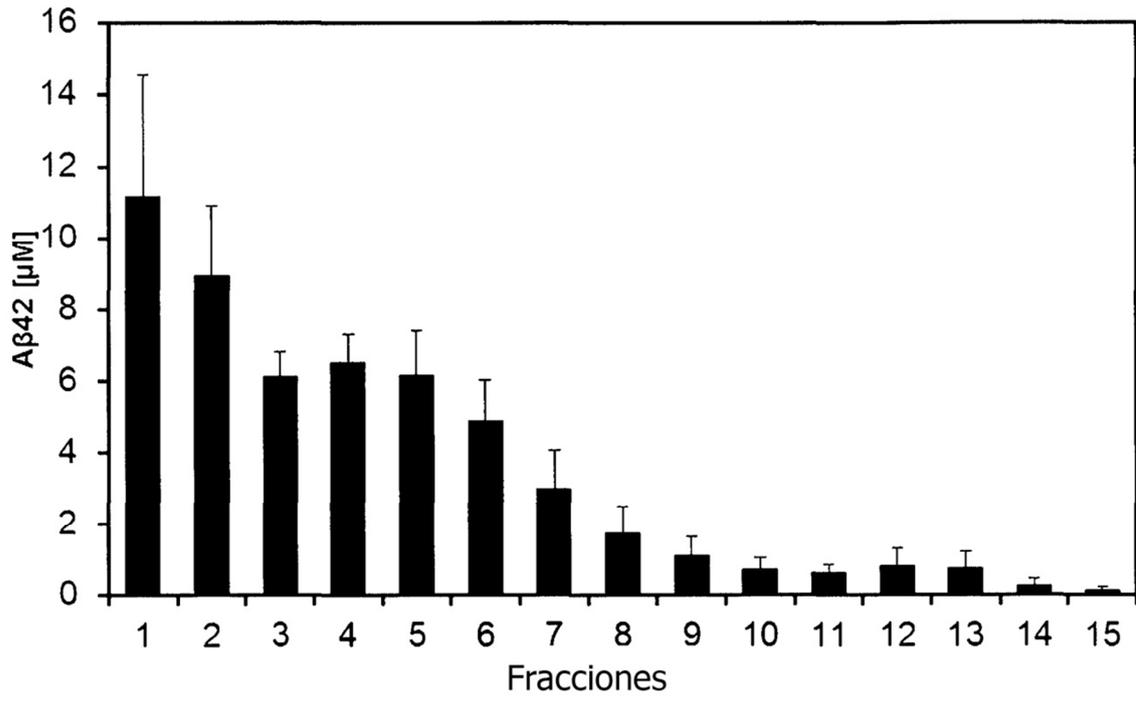


Figura 3

Control Abeta
 Abeta con D3
 Abeta con D3D3

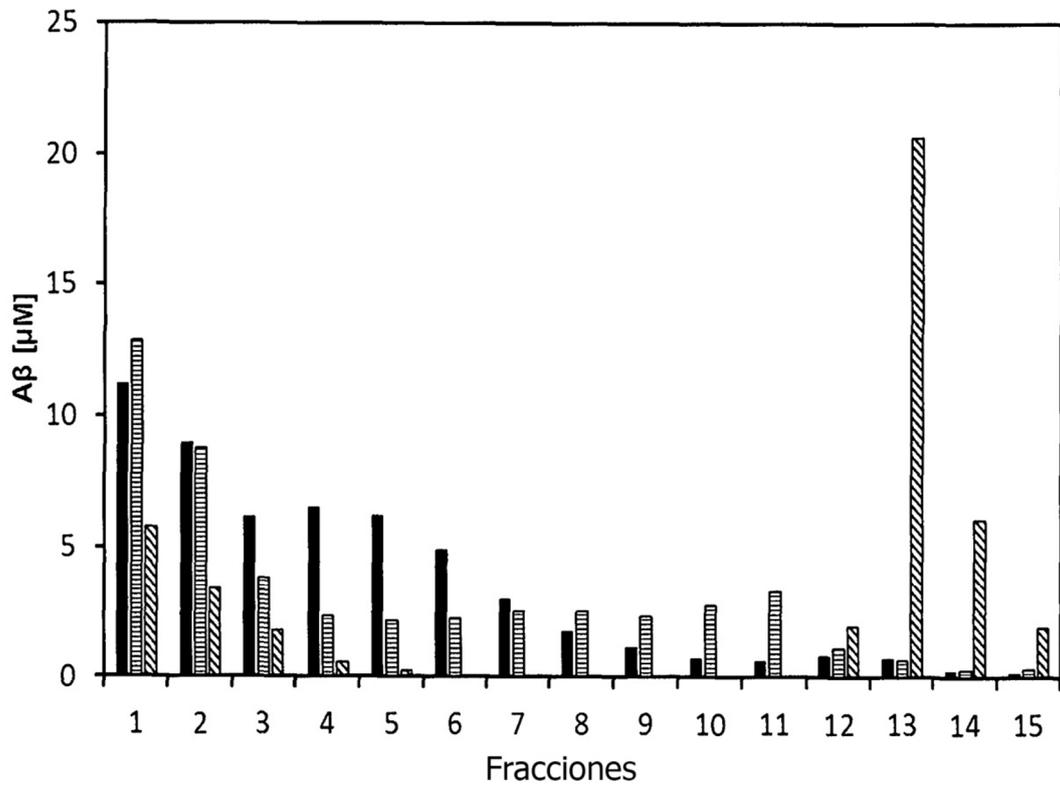


Figura 4

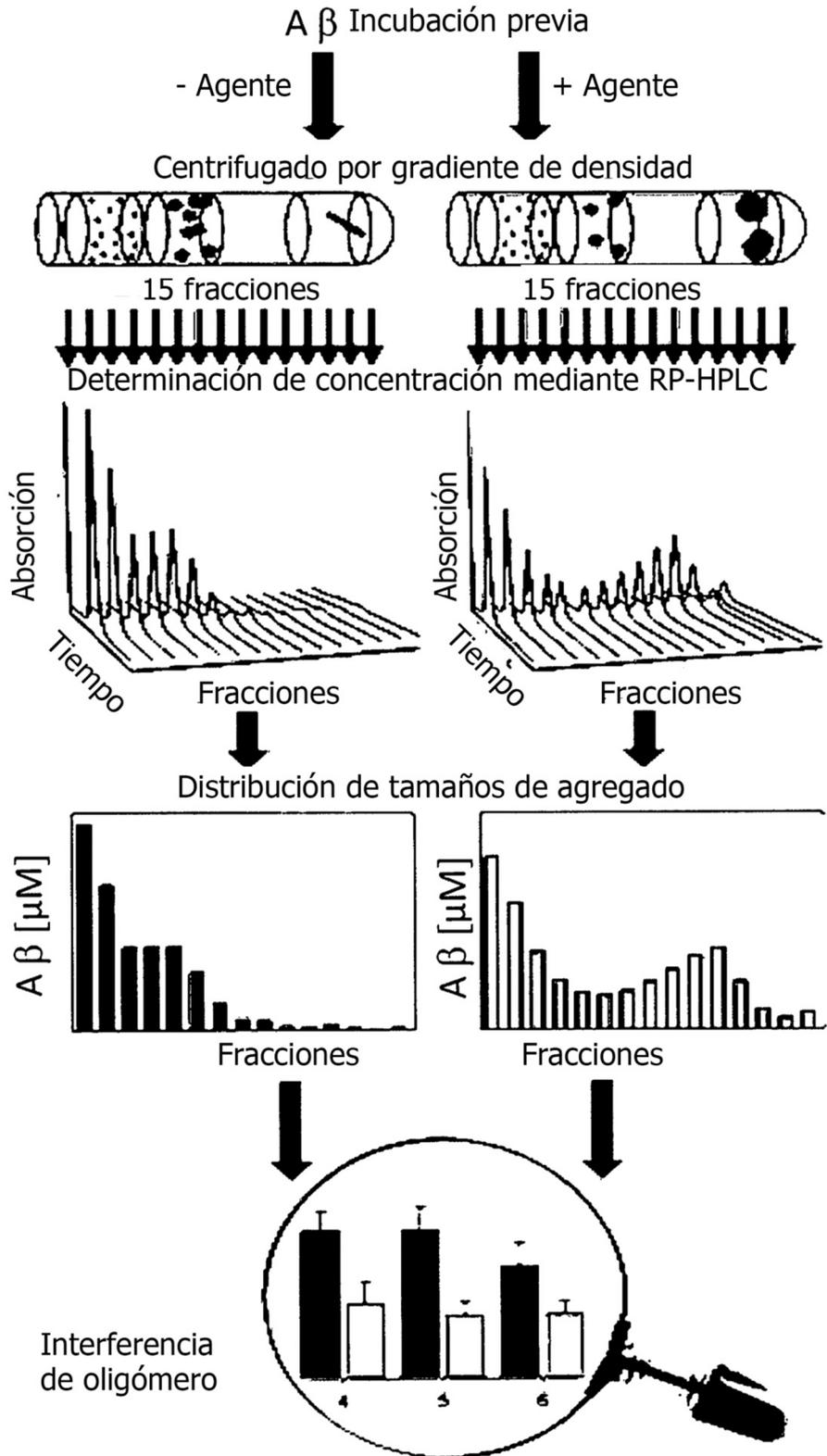


Figura 5