(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 810 829**

(51) Int. CI.:

G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/96 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2016 PCT/DE2016/000081**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146093**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2016 E 16715787 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3271724**

(54) Título: **Uso de un estándar para la detección de agregados de proteínas de una enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas**

(30) Prioridad:

18.03.2015 DE 102015003404

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2021

(73) Titular/es:

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH (100.0%)
52425 Jülich, DE

(72) Inventor/es:

HÜLSEMANN, MAREN;
ZAFIU, CHRISTIAN;
BANNACH, OLIVER y
WILLBOLD, DIETER

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Uso de un estándar para la detección de agregados de proteínas de una enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas

La invención se refiere al uso de un estándar para la detección de agregados de proteínas de una enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas.

Estado de la técnica

El término enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas es un término colectivo para las enfermedades causadas por proteínas mal plegadas y agregadas. De particular relevancia médica son las enfermedades neurodegenerativas como la demencia de Alzheimer (DA) y la enfermedad de Parkinson. El diagnóstico de las enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas se limita generalmente al análisis de los síntomas clínicos y solo puede hacerse post mortem con certeza mediante la detección histopatológica de los agregados de proteínas. Los procedimientos de diagnóstico más prometedores basados en biomarcadores detectan los agregados proteicos patológicos directamente en los fluidos corporales. Estos procedimientos no solo deben ser extremadamente sensibles, sino que también deben ser capaces de distinguir los monómeros de las conformaciones proteicas agregadas. A menudo los procedimientos se basan en la denominada detección inmunológica, es decir, en el aislamiento o la detección de agregados de proteínas mediante la unión de antígenos y anticuerpos. Para determinar los agregados de proteínas como biomarcadores de forma cuantitativa, es necesario utilizar un estándar interno en los procedimientos. De la publicación WO 2013/092951 A2 se conoce un estándar para la cuantificación de agregados patógenos u oligómeros de proteínas endógenas que caracterizan una enfermedad por agregación de proteínas o una degeneración amiloide o enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas. Este está caracterizado porque se forma un polímero a partir de secuencias de polipéptidos que son idénticas en secuencia en la zona parcial correspondiente con las proteínas endógenas o presentan una homología de al menos un 50 % sobre la zona parcial correspondiente con las proteínas endógenas que caracterizan una enfermedad por agregación de proteínas o una degeneración amiloidea o una enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas, donde los polímeros no se agregan. El número de epítopos se determina utilizando una secuencia de polipéptidos idéntica en secuencia a aquella subsección de proteínas endógenas que forma un epítopo o tiene una homología de al menos un 50 % con esta subsección, y que tiene la actividad biológica del epítopo. Una secuencia de polipéptidos seleccionada de esta manera se incorpora en el número deseado durante la formación de los estándares según la invención y/o se enlaza según la invención. Este estándar es adecuado para determinar el número real de agregados u oligómeros patógenos.

La desventaja de este estándar es que su uso es limitado.

Además, los estándares de agregados pueden fabricarse a partir de Aß recombinante o sintético. La agregación de Aß se induce en condiciones amortiguadoras adecuadas. Las diferentes especies de agregados pueden purificarse a continuación mediante técnicas especiales de centrifugación y cromatografía. Además, para estabilizar los agregados, se pueden aportar procedimientos de reticulación química, como el denominado procedimiento GraFix (Kastner y col. 2008, Stark 2010).

Por tanto, todos los estándares anteriores para la determinación de agregados y oligómeros de proteínas patológicas, que se producen en la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas no son ventajosos y solo tienen una utilidad limitada.

Sapsford y col. ("Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology", Chemical Reviews, vol. 113, N.º 3, 2013, páginas 1904-2074) dan una visión muy completa de la funcionalización de nanopartículas por moléculas biológicas.

Skaat y col. ("Acceleration and inhibition of amyloid-beta fibril formation by peptideconjugated fluorescent-maghemite nanoparticles", Journal of nanoparticle research, vol. 13, núm. 8, 2011, páginas 3521-3534) describen la síntesis de nanopartículas γ-Fe_2O_3 magnéticas uniformes que contienen fluoresceína unida covalentemente y la inmovilización covalente de los péptidos $A\beta_{40}$ o LPFD en la superficie de las nanopartículas.

Yang y col. ("Detection of amyloid plaques targeted by USPIO-Abeta 1-42 in Alzheimer's disease transgenic mice using magnetic resonance microimaging", Neuroimage, vol. 55, N.º 4, 2011, páginas 1600-1609) dan a conocer nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro, a las que están químicamente unidos péptidos Aβ1-42, para la detección de placas amiloides. Triulzi y col. ("Photothermal ablation of amyloid aggregates by gold nanoparticles", Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, vol. 63, N.º 2, 2008, páginas 200-208) describen la preparación de conjugados a partir de nanopartículas de oro y fragmentos de Aß.

Roberti y col. ("Quantum Dots as Ultrasensitive Nanoactuators and Sensors of Amyloid Aggregation in Live Cells", Journal of the American Chemical Society, vol. 131, N.º 23, 2009, páginas 8102-8107) describen los puntos cuánticos funcionalizados con la proteína amiloide α-sinucleína como aceleradores de la agregación de proteínas.

Lee y col. (Ca2+-Dependent Intracellular Drug Delivery System Developed with "Raspberry-Type" Particles-on-a-Particle Comprising Mesoporous Silica Core and [alpha]-Synuclein-Coated Gold Nanoparticles", ACS Nano, vol. 8, N.º 9, 2014, páginas 8887-8895) dan a conocer partículas que comprenden un núcleo de sílice en el que están dispuestas nanopartículas de oro recubiertas con α-sinucleína.

El documento WO 2013/092951 A2 se refiere a los estándares para la cuantificación de agregados patógenos u oligómeros de proteínas endógenas que caracterizan las enfermedades por agregación de proteínas, una degeneración amiloide o enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas y a la utilización de estos estándares para la cuantificación de estos agregados u oligómeros patógenos.

Objetivo de la invención

El objetivo de la descripción es proporcionar un estándar que no tenga las desventajas del estado de la técnica y que pueda usarse universalmente a largo plazo y en particular como un estándar para la detección de diversas enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas. Uno de los objetivos de la invención es indicar los usos ventajosos del estándar.

Solución del objetivo

El objetivo de la invención se logra con el uso de un estándar que comprende una nanopartícula inorgánica con un tamaño de 2 a 200 nm, en cuya superficie, ya sea mediante i) ácidos carboxílicos-espaciador-maleimida o mediante ii) éster de NHS se unieron monómeros del agregado de proteínas de la a enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas a detectar, en la detección de un agregado de proteínas, en particular en la detección de agregados y/u oligómeros potencialmente tóxicos de la demencia de Alzheimer, donde se trata una muestra con un número desconocido de sitios de unión y el estándar con un número conocido de sitios de unión con un péptido o anticuerpo fluorescente y se deduce el número de sitios de unión en la muestra con el resultado del estándar. Las realizaciones ventajosas resultan de las reivindicaciones secundarias.

Descripción de la invención

El procedimiento para fabricar un estándar para la detección de agregados de proteínas de una enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas tiene las siguientes etapas:

A) Proporcionar una nanopartícula inorgánica con el tamaño del agregado de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas.
B) Formación de grupos amino libres o grupos carboxi libres en la superficie de la nanopartícula (para funcionalizar la superficie de la nanopartícula para formar una nanopartícula funcionalizada con amino o carboxi).
C)

i) Unión de ácido carboxílico-espaciador-maleimida a los grupos amino libres en la etapa B), o
ii) Conversión de los grupos carboxi libres en la etapa B) en ésteres de NHS.

D) Unión de monómeros del agregado de proteínas,

i) a los ácidos carboxílicos-espaciador-maleimida a través de un grupo sulfhidrilo en el extremo libre de los monómeros, o
ii) a los ésteres de NHS a través del grupo amino en el extremo libre del monómero.

Para la etapa A), la nanopartícula puede oxidarse ventajosamente, ya que los grupos hidroxilo (grupos OH) son buenos puntos de partida para las etapas de síntesis posteriores.

En una realización, se puede llevar a cabo una síntesis de Stöber en la etapa A) para fabricar una nanopartícula de sílice. La síntesis de Stöber tiene el efecto ventajoso de que se pueden fabricar nanopartículas de un tamaño definido.

El tamaño del estándar fabricado está determinado principalmente por el tamaño de los agregados de proteínas a detectar. Esto tiene la ventaja de que el estándar tiene el mismo tamaño que el agregado de proteínas a detectar en una muestra desconocida. La muestra se analiza al menos parcialmente fuera del cuerpo humano o animal.

Si una nanopartícula de sílice está presente al menos como cubierta exterior de una nanopartícula, la silanización de la superficie con, por ejemplo, aminopropiltrietoxisilano en etanol para formar grupos amino libres en la etapa B) puede realizarse en una configuración posterior.

En otra configuración, se produce una reacción de los grupos amino con el anhídrido succínico para formar grupos carboxílicos libres en la etapa B). Los grupos de carboxi libres también pueden producirse de otras maneras.

En una configuración posterior, un ácido carboxílico-espaciador-maleimida se convierte en un éster de NHS antes de ser unido en la etapa C) i) al grupo amino libre de la etapa B). La etapa de reacción es importante porque alternativamente en la etapa C) ii) el grupo carboxi libre se convierte en un éster de NHS.

En la etapa C) del procedimiento se activa la superficie de la nanopartícula. En contraste con el estado de la técnica, es importante tener en cuenta las características de los agregados de proteínas de las enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas al preparar el estándar. Por lo tanto, la activación de la nanopartícula en sí tiene que tener lugar antes de la adición de los monómeros o epítopos. Un ejemplo: El monómero $A\beta_{1-42}$ presenta una secuencia conocida de aminoácidos. Lo mismo se aplica a otros monómeros y proteínas que juegan un papel en las enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas. En el caso del $A\beta_{1-42}$, por ejemplo, se sabe que la zona del epítopo para los anticuerpos utilizados está dispuesta en la zona de los aminoácidos 1-11 después del grupo amino libre y no en la zona responsable de la agregación. Si los monómeros se activaran, habría un peligro considerable de que los monómeros ya reaccionaran y se agregaran entre sí antes de que pudieran disponerse en la superficie de la nanopartícula. Esta afirmación se aplica de manera similar a todos los demás monómeros y proteínas conocidos de las enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas, véase la Tabla 1. Por lo tanto, en la etapa C) la superficie de la nanopartícula debe activarse llevando a cabo la etapa C) i) o la etapa C) ii).

El tratamiento de las nanopartículas carboxi-terminadas con EDC/NHS provoca una conversión del ácido carboxílico en un éster NHS. Este éster reacciona con las aminas primarias en los péptidos para formar amidas y, por lo tanto, se une a estos péptidos a la partícula. Sin embargo, en el caso de un tratamiento de los péptidos con EDC/NHS, además de la reacción con la superficie de la partícula, también se produciría una unión de los péptidos entre sí. En principio, antes de la etapa C) i) o en la etapa C) ii) se puede llevar a cabo una reacción del ácido carboxílico-espaciador-maleimida antes de la etapa C) i) o de los grupos carboxílicos libres de la etapa B) con la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y/o la N-hidroxisuccinimida para su conversión en un éster de NHS. La formación de un éster de NHS en la vía de síntesis es importante para las futuras reacciones entre los reactivos.

En la etapa D), se produce la unión de los monómeros del agregado de proteínas

i) a los ácidos carboxílicos-espaciador-maleimida a través de un grupo sulfhidrilo en el extremo libre de los monómeros, o
(ii) a los ésteres del NHS a través del grupo amino en el extremo libre del monómero

No es necesario unir las secuencias completas de los monómeros de los agregados de proteínas en la superficie de la nanopartícula. Más bien, puede ser suficiente unir la zona del epítopo, si se conoce, a los ácidos carboxílicos-espaciador-maleimida o a los ésteres de NHS.

Así pues, el término "monómero" en el sentido de la invención es también una zona del epítopo o, más en general, una secuencia de reconocimiento que se utiliza posteriormente en el uso del estándar para unirse a ella un anticuerpo o péptido específico que detecta la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas.

En una realización de la invención, el estándar también puede tener varios tipos de monómeros en la superficie de nanopartículas. Esto tiene el efecto ventajoso de que también se pueden producir estándares para agregados de proteínas que consisten en dos o más monómeros diferentes.

En una configuración ventajosa adicional, se dispone tras la realización de la etapa C) ii) una molécula de estreptavidina en el éster de NHS de la nanopartícula y antes de la etapa D) un grupo de biotina en el monómero del agregado de proteínas. Esto tiene el efecto ventajoso de que los monómeros provistos de grupos de biotina pueden unirse a partículas.

Sin embargo, la unión del grupo amino de los monómeros con el éster de NHS en la etapa D ii) puede tener lugar de forma covalente.

Se proporciona un estándar para la detección de agregados de proteínas de una enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas, entre otros, mediante el procedimiento indicado. Sin embargo, también se puede proporcionar de otra manera.

Los grupos amino libres en la superficie de las nanopartículas se convierten en grupos carboxi libres o en grupos maleimida.

Cabe señalar que el procedimiento mencionado anteriormente se refiere de manera especial pero no exclusivamente a la fabricación de nanopartículas de sílice. Las partículas de oro también se pueden proveer fácilmente con grupos amino libres o grupos hidroxilo en la superficie.

En el caso de las nanopartículas de oro, se usa una reacción de intercambio de ligandos en la que se produce una sobrefuncionalización a través de los tioles correspondientes. Debe mencionarse que con ácido 3-mercaptopropiónico un carboxi y con 2-mercapto-etilamina se obtiene una amino-funcionalización de las partículas de oro. También es posible, como se muestra a continuación, utilizar puntos cuánticos como material de partida para el procedimiento.

En el intervalo de tamaño más bajo de los agregados de proteínas, es decir, en el intervalo de 4-7 nm, los puntos cuánticos son particularmente adecuados como nanopartículas. Las nanopartículas de oro también son adecuadas en el intervalo de tamaño medio de los agregados de proteínas de aproximadamente 2 a 60 nm, y en el intervalo de tamaño superior (>40 nm) partículas de plástico como látex, poliestireno modificado, etc.

Sin embargo, las nanopartículas de sílice como patrones para la detección de enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas pueden usarse ventajosamente en todo el intervalo de tamaños y pueden fabricarse fácilmente de la manera mostrada.

En el caso de las nanopartículas de plástico y sílice, existe la posibilidad adicional de agregar fluorocromos o puntos cuánticos y marcarlos internamente de esta manera para lograr ventajas adicionales del estándar como control de calidad, p. ej., en el enfoque sFIDA y/o en relación con sus propiedades espectroscópicas.

Las nanopartículas de sílice son, por lo tanto, aquellas que, después de la síntesis de Stöber, consisten en dióxido de silicio amorfo. Este enfoque tiene el efecto ventajoso de que los grupos hidroxilo están presentes en la superficie de las nanopartículas de sílice.

La síntesis de Stöber puede usarse ventajosamente para sintetizar partículas en un amplio intervalo de tamaños, cada uno de los cuales presente una distribución de tamaños muy estrecha, preferentemente monodispersa. Esta propiedad es particularmente ventajosa cuando se usan las nanopartículas como estándar.

Síntesis de nanopartículas de sílice y nanopartículas de sílice QD

En una primera variante, las nanopartículas de sílice se fabrican con síntesis de Stöber. En función del tamaño deseado de la nanopartícula a sintetizar, se pone en contacto etanol, agua y solución de amoníaco en una proporción adecuada. Para este enfoque, se añade Tetra-etoxi-ortosilicato (abreviado: TEOS) y se realiza la síntesis de Stöber. La relación de los disolventes, catalizadores y reactivos entre sí determina el tamaño de las partículas y se elige de modo que las nanopartículas determinen el tamaño del agregado de proteína, p. ej., un oligómero de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas a detectar a detectar. El resultado es la nanopartícula de sílice con el tamaño deseado del agregado y/u oligómero. Hay grupos hidroxilo en la superficie de la nanopartícula de sílice. Los catalizadores se eliminan opcionalmente. Para este propósito, la solución de partículas puede transferirse, por ejemplo, a membranas de diálisis y dializarse o centrifugarse.

En una segunda variante, los puntos cuánticos fluorescentes (QD), preferentemente CdSe/ZnS, se funcionalizan con (3-sulfanilpropil)trimetoxitoxisilano (MPS). Después de la funcionalización, estas nanopartículas contienen grupos etoxisilano, al igual que tetra-etoxi-ortosilicato (TEOS). Dichas nanopartículas pueden usarse como centros de cristalización en la síntesis de Stöber para formar una cubierta de sílice de un tamaño determinado. Ventajosamente, se forman partículas QD de sílice que tienen las propiedades fluorescentes de los puntos cuánticos per se. La superficie de dichas nanopartículas de sílice QD también presenta grupos hidroxilo.

La nanopartícula de sílice o las nanopartículas de sílice QD se silanizan a continuación, por ejemplo, con aminopropiltrietoxisilano (abreviado: APTES). Esto tiene el efecto ventajoso de que el grupo amino libre está inmovilizado en la superficie de las partículas. La molécula resultante es una nanopartícula de sílice amino-funcionalizada, véase [1] en la Figura 1. Se forman nanopartículas de 3-amino-propil-sílice o 3-aminopropil-sílice-QD.

En una variante del procedimiento, el anhídrido succínico puede unirse a este grupo amino libre, de modo que se forma una nanopartícula de sílice carboxi-funcionalizada. Debido a la reacción, esta tiene un grupo carboxilo libre, véase [2] en la Figura 1.

No hace falta decir que un gran número, preferentemente un número conocido, de dichos grupos amino libres o grupos carboxi están dispuestos en la superficie de las nanopartículas.

Fabricación de modificaciones de superficie de puntos cuánticos

En otra variante, los puntos cuánticos (Qdots) se usan directamente como núcleo. Estos se pueden adquirir en el mercado. Los denominados puntos cuánticos núcleo-capa de, por ejemplo, CdSe/ZnS son particularmente adecuados para pequeñas nanopartículas con propiedades fluorescentes. Estos pueden estar presentes, por ejemplo, en el intervalo de 2-7 nm. A medida que aumenta el diámetro, la fluorescencia cambia de azul a rojo.

En una etapa adicional, se mezclan QDots (puntos cuánticos) 0,1 nM con una mezcla de tiol-espaciador-ácido. Esta mezcla de tiol-espaciador-ácido consiste, por ejemplo, en hidróxido de tetrametilamonio 550 mM, tiol-espaciador-ácido 275 mM (p.ej., ácido 3-mercaptopropiónico) en, p.ej., 1 ml de $CHCl_3$, donde se elimina la fase acuosa resultante. Esta solución se mezcla con los Qdots y se añaden 50 [iL de PBS después de 2 días. Después de agitar, los Qdots migran a la fase acuosa y se obtienen Qdots carboxi-funcionalizados.

En otra variante, 1 mg de Qdots secos se mezclan con una mezcla de amino-espaciador-tiol en metanol. Esta mezcla de amino-espaciador-tiol consiste en 100 mg de amino-espaciador-tiol (por ejemplo: 2,2'-diaminodietil disulfuro). La mezcla se somete a ultrasonidos hasta que la solución absorba los Qdots. Estos se centrifugan y se recogen en agua. Los Qdots amino-terminados se encuentran en la fase acuosa.

El acoplamiento de monómeros o epítopos, generalmente secuencias de reconocimiento, a las nanopartículas

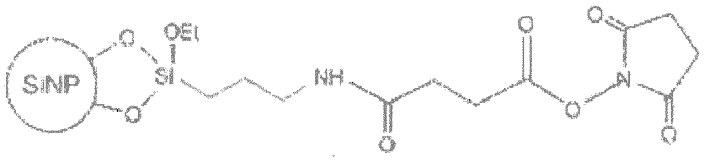
con carboxi-terminales se convierte, tal como se mencionó, en un éster de NHS reactivo. El éster de NHS se forma preferentemente con 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil)carbodiimida (abreviado: EDC) y/o N-hidroxisuccinimida (abreviado: NHS). El éster de NHS es el intermediario reactivo para la reacción con una amina primaria, que se agrega como un monómero a la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas a detectar.

Una segunda variante del procedimiento proporciona la nanopartícula amino-funcionalizada de [1] en la Figura 1 para que reaccione con un ácido carboxílico-espaciador-maleimida, p. ej., con ácido 6-maleimido-caproico o PEG-maleimida (longitud opcional)-COOH. La ruta se muestra en la Figura 2B.

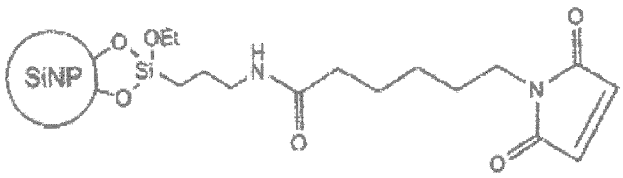
Esto tiene el efecto ventajoso de que se introduce un grupo en la superficie de la nanopartícula que reacciona específicamente con los tioles.

En una tercera variante, las partículas de éster de NHS mencionadas anteriormente se usan para unir estreptavidina a la superficie de las nanopartículas, véase la Figura 2C.

Las nanopartículas como tales, es decir, sin el monómero (o epítopo) del agregado de proteínas, son nuevas y, por lo tanto, ya resuelven el objetivo de la descripción:



es un producto de partida particularmente preferido con ésteres de NHS en la superficie de, por ejemplo, nanopartículas de sílice (SINP).



es un producto de partida particularmente preferido con grupos maleimida en la superficie de, por ejemplo, nanopartículas de sílice (SINP).

Por supuesto, una gran cantidad de los compuestos que se muestran aquí solo una vez están dispuestos en la

superficie de las nanopartículas. Este número se determina ventajosamente por cálculo y depende del diámetro de la partícula.

Las nanopartículas, entre otras cosas, se fabrican o se ponen a disposición mediante el procedimiento para su fabricación.

Las nanopartículas con superficies de éster de N-hidroxisuccinimida reaccionan opcionalmente bajo la disociación de N-hidroxisuccinimida con la amina primaria del monómero o un epítopo sintético del agregado y/u oligómero en su caso de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas a detectar.

Este procedimiento es particularmente adecuado si el aminoácido lisina está presente una o más veces en una secuencia peptídica del monómero. Este procedimiento es particularmente adecuado si el aminoácido no está en la zona del epítopo, es decir, la zona de unión para los anticuerpos. Si no hay lisina presente, el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos en sí puede usarse para la unión a la nanopartícula, o se pueden usar secuencias peptídicas con lisinas introducidas adicionalmente.

Las nanopartículas con grupos maleimida en la superficie pueden reaccionar en su caso con tioles existentes o introducidos sintéticamente (por ejemplo, cisteína) en la secuencia de proteínas del monómero o epítopo.

Las nanopartículas con estreptavidina se unen a monómeros o epítopos particularmente fuertemente biotinilados.

Los estándares mencionados anteriormente sin los monómeros o epítopos pueden usarse de una manera particularmente ventajosa de forma universal como tecnología de plataforma para la producción adicional de un estándar con los monómeros o epítopos para la detección de enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas. En particular, se proporcionan en kits junto con la proteína o monómero o epítopo del agregado de proteínas de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas junto con un disolvente.

Estas nanopartículas de sílice reaccionan opcionalmente bajo disociación de N-hidroxisuccinimida con la amina primaria del monómero del agregado y/u oligómero de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas a detectar.

En la variante 1, la N-hidroxisuccinimida se disocia durante la reacción con la amina primaria de los monómeros, véanse las Figuras 2A y 2C, en la Variante 2, sin embargo, el éster de NHS permanece en la nanopartícula de sílice, véase la Figura 2B.

Las formas adicionales de unir los monómeros a los ésteres de NHS con o sin un espaciador se indican en las rutas generales en las Figuras 2A-2C. Estas formas describen diferentes formas de biofuncionalización. Debido a las propiedades químicas de la superficie, las modificaciones se pueden realizar fácilmente. Además, el material es estable en soluciones amortiguadoras fisiológicas y se considera inofensivo para la salud.

En particular, las nanopartículas de sílice biofuncionalizadas que se muestran arriba representan estándares estables, definidos con un tamaño exacto con un número determinado de epítopos accesibles y, por lo tanto, también se usan ventajosamente como tecnología de plataforma en procedimientos de pruebas diagnósticas o en experimentos con muestras enriquecidas para enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas.

En la Tabla 1 se ofrece una descripción general de las proteínas o agregados de proteínas que se producen en las enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas. El tamaño de los agregados de proteínas correspondientes se conoce de la bibliografía. Por ejemplo, el tamaño del oligómero beta amiloide de la demencia de Alzheimer es de aproximadamente 20 nm.

Las etapas A) y B) del procedimiento se llevan a cabo en consecuencia.

Tabla 1: Proteína y enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas correspondiente

Monómero o epítopo de la proteína	Enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas
Beta amiloide	Demencia de Alzheimer
Proteína priónica	Enfermedades priónicas
Proteína amiloide A sérica	Amiloidosis AA
Cadena ligera de IgG	Amiloidosis AL
AApoAI	Amiloidosis AApoAI
AApoAII	Amiloidosis AApoAII
TTR (ATTR)	Amiloidosis TTR (ATTR)
DISC1	Patologías asociadas a DISC1
FUS	Proteínopatías asociadas a FUS
IAPP	Diabetes mellitus tipo 2
SOD1	Esclerosis lateral amiotrófica
α-Sinucleína	Sinucleinopatías
Tau	Taupatías
TDP-43	Proteinopatías TDP-43
Huntingtina	Enfermedad de Huntington
Lisozima	Amiloidosis familiar visceral

El estándar para la detección de agregados tóxicos y/u oligómeros de una enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas comprende una nanopartícula inorgánica, en cuya superficie se dispone un determinado número de sitios de unión para los monómeros del agregado o su epítopo de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas.

Esto tiene el efecto ventajoso de que las nanopartículas y los sitios de unión puedan usarse como tecnología de plataforma para diversas enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas.

En una realización de la invención, la nanopartícula cargada con monómeros presenta un tamaño correspondiente al agregado y/u oligómero de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas.

Se reconoció que esta es una imitación particularmente buena con respecto al tamaño de las especies que se producen en la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas.

En una realización de la invención, el número de epítopos en el estándar corresponde, por lo tanto, al número de monómeros o epítopos presentes en el agregado de proteínas. Esto tiene el efecto ventajoso de que el estándar tiene varios sitios de unión, como el agregado y/u oligómero tóxico natural.

En otra configuración ventajosa de la invención, el estándar presenta un tamaño de 2 a 200 nm, preferentemente de 2 a 60 nm, con especial preferencia de 2 a 20 nm. En particular, en el caso de un tamaño de aproximadamente 2-20 nm, también se localizan los agregados y/u oligómeros de la mayoría de las enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas. Esto significa que esta medida proporciona estándares que son idénticos en tamaño a los agregados tóxicos y/u oligómeros de la mayoría de las enfermedades por plegamiento incorrecto de proteínas. Las síntesis de Stöber pueden sintetizar las nanopartículas de sílice de una manera particularmente ventajosa de una manera definida. También es posible fabricar núcleos muy pequeños, en particular de 2 a 20 o 25 nm de tamaño. Las nanopartículas de sílice se pueden fabricar ventajosamente en el orden de magnitud de 1-200 nm, y se puede admitir cualquier valor intermedio.

Los estándares también pueden presentar una nanopartícula de oro o un punto cuántico como núcleo.

Los estándares también pueden presentar un punto dorado o cuántico como núcleo y pueden encerrarse en una capa de silicato.

Los ésteres de NHS activados, los grupos maleimida o la estreptavidina para la unión de monómeros del agregado y/u oligómero tóxico se disponen de manera particularmente ventajosa en la superficie de la nanopartícula.

Un estándar particular, de manera particularmente ventajosa, presenta alrededor de 40 monómeros beta amiloides de la demencia de Alzheimer, que están dispuestos en una superficie activada por éster del NHS de una nanopartícula de sílice de aproximadamente 25 nm. Esto proporciona de forma ventajosa un estándar que presenta aproximadamente el mismo tamaño y estructura espacial, si procede, tal como el beta oligómero amiloide tóxico a detectar y tiene aproximadamente el mismo número de epítopos que en el agregado. Se ha reconocido que esto proporciona un estándar con una capacidad de unión definida y similar para anticuerpos, como el oligómero beta amiloide tóxico.

En el contexto de la invención, se reconoció que los estándares de agregados fabricados según los procedimientos del estado de la técnica presentan algunas desventajas importantes que los estándares ya no presentan. Las desventajas en el estado de la técnica se refieren a, por ejemplo, la falta de homogeneidad. Dado que la agregación de proteínas es un proceso de tiempo crítico, es un gran desafío fabricar agregados de un tamaño exacto y predefinido. Una distribución de tamaño no homogénea también puede ser problemática. Estas desventajas aún no se han podido remediar.

Además, la falta de adaptabilidad de los procedimientos y estándares anteriores es un problema fundamental en el estado de la técnica. Por ejemplo, se puede adaptar el procedimiento sFIDA para la detección de varios agregados de proteínas asociadas a la enfermedad tal como se resume en la

Tabla 1. Sin embargo, para cada estándar de agregado, primero se deben determinar las condiciones de agregación y limpieza adecuadas en experimentos complejos. Algunas veces determinadas proteínas no se agregan en absoluto in vitro o solo proporcionan intermedios metaestables que no pueden aislarse en una cantidad satisfactoria.

En particular, se reconoció que la estabilidad de los estándares según el estado de la técnica no es suficiente y que, por lo tanto, el uso de los estándares es por un tiempo limitado. En particular, los estándares del estado de la técnica pueden agregarse adicionalmente después de la limpieza y durante el almacenamiento, lo que tiene un efecto no deseado en la distribución del tamaño.

También se reconoció en el contexto de la invención que la accesibilidad del epítopo no es suficiente en el estado de la técnica. Con agregados de proteínas más grandes, resulta difícil cuantificar el número de epítopos disponibles para la unión de anticuerpos, incluso si se conoce el número exacto de subunidades monoméricas.

También se reconoció que los estándares según el estado de la técnica también restringieron la elección de secuencias de proteínas, lo que también dio lugar a un uso limitado de estos estándares. La secuencia de la proteína debe contener al menos tanto la región hidrofóbica, que es responsable de la agregación, como el epítopo para la unión del anticuerpo.

Por las razones mencionadas, se deduce que los estándares según el estado de la técnica no resultan económicos de fabricar y usar. Las proteínas costosas se utilizan principalmente para producir los agregados, aunque en última instancia solo se necesita la superficie.

Por esta razón, se utilizan nanopartículas inorgánicas económicas como cuerpos básicos estándar.

Además, debido a la distribución de tamaño no homogénea, los estándares en el estado de la técnica requieren procedimientos que requieren mucho tiempo y costes (por ejemplo, cromatográficos) para purificar el producto.

Además, los estándares según el estado de la técnica solo se pueden usar funcionalmente de forma limitada. La falta de la posibilidad de marcar los estándares según el estado de la técnica es un problema. En el caso de agregados homogéneos, las modificaciones químicas deseadas (por ejemplo, marcadores fluorescentes) a menudo pueden tener efectos negativos en propiedades como la accesibilidad del epítopo.

Los estándares no tienen las desventajas mencionadas anteriormente. Por el contrario, los estándares tienen una distribución de tamaños estrecha y permiten modificaciones de superficie para bioconjugación. Por los demás, estos son solubles en agua en el intervalo de tamaño deseado. Deben almacenarse durante un período de tiempo más largo sin perder sus propiedades deseadas como estándar, especialmente para la tecnología de plataforma.

Ejemplos de realización:

La invención se explica con más detalle a continuación sobre la base de ejemplos de realización y las figuras adjuntas, sin que la invención esté limitada por ello.

Muestran:

Figura 1 Fabricación de cuerpos básicos de nanopartículas de sílice como tecnología de plataforma.
Figura 2 Fabricación de una nanopartícula de sílice según las variantes 2A a 2C.
Figuras 3-7: Las Figuras 3-7 muestran resultados para $Aß_{1-42}$-SiNP con tamaños de 20 y 80 nm y para 2-MAP-SiNP con un tamaño de 20 nm, que se midieron con sFIDA.

Para las Figuras 3 a 7, las nanopartículas de sílice se diluyeron en serie en H_2O, plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) y se midieron dos o tres veces mediante sFIDA. Después de que las nanopartículas de sílice funcionalizadas fueron detectadas por dos anticuerpos anti-Aß marcados de manera diferente (IC16-Alexa633 y 6E10-ATTO488), se realizó la medición en el microscopio TIRF. Las señales de los dos fluorocromos se registraron en diferentes canales (canal 1: ex 633 nm, em 705 nm; canal 2: ex 488 nm, em 525 nm). Solo los resultados por encima de un valor umbral definido (corte) de cada canal se incluirían en el análisis de datos. Los dos canales fueron colocalizados entre sí y la intensidad de los resultados colocalizados se mostró como lectura de sFIDA.

Fabricación de nanopartículas de sílice.

A continuación, se explica la fabricación utilizando nanopartículas de sílice ß amiloide (Aß-SiNP) para su uso en el diagnóstico de Alzheimer:

I. Síntesis general de SiNP:

1. Se producen nanopartículas de sílice con un diámetro de 20 nm, ya que los oligómeros Aß tóxicos naturales también tienen aproximadamente este tamaño.
Para este propósito, la solución de etanol, agua y amoníaco se introduce en una proporción adecuada (en función del tamaño deseado) en un matraz de vidrio y se agita fuertemente. Después de dos minutos, se agrega TEOS (trietoxorthosilicato). La solución se agita durante dos días a temperatura ambiente (síntesis de Stöber). Para SiNP de 20 nm, se agitan 200 ml de etanol (99 %), 2,7 ml de agua (desionizada), 4,47 ml de amoniaco (30 %) y se añaden 4,43 ml de TEOS. La reacción se llevó a cabo a
temperatura ambiente durante 2 días con agitación vigorosa.
2. La solución de partículas se transfiere a membranas de diálisis (MWCO 3500) y se dializa contra etanol durante dos días para eliminar el exceso de reactivos y el catalizador.
3. Para la silanización, se agrega aminopropiltrietoxisilano a los SiNP en etanol para inmovilizar un grupo amino libre en la superficie de la partícula. Se agrega aminopropiltrietoxisilano en un exceso quíntuple en relación con el número espacialmente posible de moléculas de aminopropiltrietoxisilano de unión. Al día siguiente, el exceso de aminopropiltrietoxisilano se elimina mediante tres etapas de centrifugación y lavado con etanol. Después de cada etapa de centrifugación (3000 g, al menos 2 horas), el sedimento debe someterse a ultrasonidos durante al menos 20 minutos para separar nuevamente las partículas.
En el caso de SiNP de 20 nm, se añaden 50 ml de solución de SiNP (10g l^{-1}) en etanol a 120 µl de APTES y se agita durante la noche.
Se pueden seguir diferentes formas de biofuncionalización. Las siguientes formas solo deben explicarse con más detalle a modo de ejemplo, es decir, de ninguna manera limitantes.
A. Modificación con oligómero beta amiloide 1-42 y péptidos 2-MAP, Figuras 1, 2A,
4A. En la siguiente etapa, se aplica un grupo carboxi a la superficie de la partícula mediante la reacción del grupo amino con anhídrido succínico. Para este fin, el sedimento de partículas se disuelve en anhídrido succínico 0,1 M en DMF bajo una atmósfera de argón durante 20 min, se somete a ultrasonidos y luego se agita durante la noche bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente. Al día siguiente, las etapas de centrifugación y lavado (3000 g, al menos 2 horas) con etanol se utilizan para reemplazar la solución de DMF con etanol. Después de cada etapa de centrifugación el sedimento debe someterse a ultrasonidos durante al menos 30 minutos para separar nuevamente las partículas.
En el caso de SiNP de 20 nm, se agitan 500 mg de SiNP aminado (de la etapa 3A) en 50 ml de una solución de anhídrido succínico 0,1 M en DMF durante la noche
De esta forma, se proporciona la nanopartícula según [2] (cSiNP). Las etapas según la Figura 2A se realizan de este modo.
El grupo carboxi introducido se convierte en un éster de NHS que es un intermedio reactivo para la reacción con una amina primaria por reacción con 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida. Para este propósito, el sedimento de partículas se recoge en tampón MES 10 mM (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisuccinimida se mezclan en una proporción de 4: 1 añadido a los grupos carboxi esperados en la superficie de la partícula. La activación de 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)carbodiimida/ N-hidroxisuccinimida se usa para acoplar proteínas porque poseen un grupo amino primario en el extremo N-terminal o en los grupos laterales (por ejemplo, lisina) está presente un grupo amino primario.

6A. Las partículas activadas se añaden en la siguiente etapa a la biomolécula respectiva o viceversa. Como se mencionó, en este caso se pueden usar varios biomarcadores potenciales u otros péptidos. En este ejemplo específico, los péptidos $Aß_{1-42}$ y/o los péptidos 2-MAP, que consisten en dos unidades Aß 1-11 acopladas, se unieron covalentemente a los sitios de unión activados en las nanopartículas de sílice. Para evitar la reticulación de los péptidos entre sí, se eliminó previamente el exceso de 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida y N-hidroxisuccinimida. Esto se realiza mediante dos etapas de centrifugación y lavado (3000 g, 0,5 h) contra tampón MES 10 mM. La etapa de reacción es crítica en el tiempo y debe llevarse a cabo en un plazo de 2-3 horas.

7A. Las partículas activadas se agregan en tampón MES 10 mM a las alícuotas de péptido seco correspondientes evaporadas de HFIP (hexafluoroisopropanol), de modo que se produce una relación aproximada de 5: 1 de sitios de unión potencialmente libres a péptido, ya que un péptido puede unirse espacialmente en aproximadamente cada décimo sitio de unión (calculado para un diámetro de 20 nm).

La mezcla se somete a ultrasonidos durante 30 minutos para que la película de proteína se desprenda de la pared del vaso y se incuba durante la noche con agitación a temperatura ambiente.

Para eliminar los péptidos no unidos, las partículas se centrifugan al día siguiente, se recogen en HFIP y se someten a ultrasonidos durante 30 minutos. Después de 2 etapas adicionales de centrifugación y lavado en agua, las nanopartículas de sílice biofuncionalizadas (en el ejemplo $Aß_{1-42}$-SiNP o 2-MAP-SiNP) están presentes en agua y pueden almacenarse a 4 °C hasta su uso posterior.

B. Modificación covalente con epítopos sintéticos (oligopéptidos) (Figura 1, 2B). En lugar de la etapa 4A de A, se realiza la etapa 4B. Las nanopartículas de sílice laminado, véase [1] en las Figuras 1 y 2B, de la etapa 3 general, se transfieren a PBS. Esto se hace mediante centrifugación (3000 g, 20 min, 25 °C) y dos lavados con PBS. Las nanopartículas se redispersan por tratamiento en un baño ultrasónico.

5B. Una molécula bifuncional de ácido carboxílico-espaciador-maleimida, por ejemplo, en este caso el ácido 6-maleimido-caproico se disuelve en DMF o agua y se mezcla con EDC y NHS en una proporción de 1:4:1 en PBS y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente para convertir el ácido carboxílico en un éster de NHS reactivo.

6B. Esta mezcla de reacción se agrega a las nanopartículas de sílice aminada de la etapa 3 general, en un exceso molar quíntuple a los grupos amino presentes. Con un diámetro de 20 nm, hay aproximadamente 2095 grupos amino primarios en la nanopartícula de sílice. La solución de reacción se remueve durante una hora a temperatura ambiente.

La reacción se detiene usando etanolamina en la misma concentración que NHS.

El epítopo sintético correspondiente (por ejemplo: Ab 1-11 + SH), que está provisto con una cisteína terminal o cistamina, se disuelve en una solución 20 mM de TCEP (tris (2-carboxietil)fosfina) en PBS y se incuba durante 1 hora. TCEP hace que los disulfuros se reduzcan a tioles. Esta solución ahora está en una relación molar 1:1 entre el epítopo y los posibles sitios de superficie (20 nm: 2095), de partículas a funcionalizar. La reacción se lleva a cabo durante la noche (aproximadamente 8 horas) con agitación.

La purificación se lleva a cabo mediante diálisis (membranas de diálisis MWCO 3500) contra PBS, o mediante centrifugación (3000 g, al menos 2 h) con 2 etapas de lavado con PBS.

No hace falta decir que al final de la ruta de reacción en la Figura 2B, una nanopartícula esquemáticamente esférica, que ya no se muestra por razones de espacio, está presente como estándar, análoga al producto final en la Figura 2A.

C. Modificación no covalente con epítopos sintéticos (oligopéptidos), Figura 1, 2C Después de las etapas 1-3 generales y 4A, 5A y 6A de A., se realiza la etapa 7C en lugar de la etapa 7A de A. Las partículas activadas de la etapa 6A se mezclan en tampón MES 10 mM con estreptavidina en PBS de modo que resulte una relación aproximada de 20: 1 de sitios de unión potencialmente libres y péptidos, ya que una estreptavidina puede unirse espacialmente a aproximadamente cada cuadragésimo sitio de unión (calculado para un diámetro de 20 nm), véase la Figura 2C.

8C. Después de dos horas, la reacción se apaga con etanolamina en PBS en la misma relación molar que NHS. La mezcla se dializa luego contra PBS (MWCO 3500) o se centrifuga (3000 g, al menos 2 h) y se lava dos veces con PBS.

9C. El oligopéptido biotinilado correspondiente (o epítopo, ver Figura 2C, grupo biotina como un triángulo sin relleno) se disuelve en PBS y se mezcla con el SiNP funcionalizado en una proporción de 1:1 (al número teóricamente unido de estreptavidina) y se agita durante 2 horas.

10C. Las partículas se centrifugan (3000 g, al menos 2 h) y se lavan dos veces con PBS. No hace falta decir que al final de la ruta de reacción en la Figura 2C, una nanopartícula esquemáticamente esférica, que ya no se muestra por razones de espacio, está presente como estándar, análoga al producto final en la Figura 2A.

Análisis:

- La caracterización de partículas (tamaño, homogeneidad, radio hidrodinámico) se basa en registros por TEM

(espectroscopía electrónica de transmisión) y DLS (dispersión dinámica de luz).
- La concentración de las partículas se puede determinar gravimétricamente después de cada etapa eliminando el disolvente en el concentrador y calculándola en función del tamaño conocido.
- Las etapas de funcionalización exitosas se registran mediante espectros FTIR (espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier).
- El número de péptidos se puede determinar, por ejemplo, de la siguiente manera:
- Las partículas activadas se funcionalizan con cisteína-Aß. De este modo se introduce un grupo tiol por péptido unido, que puede detectarse mediante una reacción estequiométrica 1: 1 con el reactivo de Ellmans. Aquí, el tiol de la cisteína reacciona con DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico); reactivo de Ellman) para liberar 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB-), que se desprotona al tinte amarillo TNB2 y en uno se puede cuantificar a una longitud de onda de 412 nm.

Resultados:

La Figura 3 muestra la lectura de sFIDA para $Aß_{1-42}$-SiNP de 20 nm que se diluyeron en H_2O de 1 nM a 1 fM. Las muestras se midieron por triplicado en sFIDA.

La lectura de sFIDA muestra una clara dependencia de la concentración.

La Figura 4 muestra la lectura de sFIDA para 2MAP-SiNP de 20 nm que se diluyeron de 1 nM a 1 fM en H_2O (la molécula 2MAP consiste en dos subunidades $Aß_{1-11}$ acopladas entre sí).

Las muestras se midieron por duplicado en sFIDA. Existe una clara dependencia de la concentración de la lectura de sFIDA y una clara delimitación del control de H_2O hasta el intervalo femtomolar más bajo.

La Figura 5 muestra la lectura de sFIDA para una dilución en serie $Aß_{1-42}$-SiNP de 80 nm en H_2O. Existe una correlación clara entre la concentración de $Aß_{1-42}$-SiNP y la lectura de sFIDA.

La Figura 6 muestra la lectura de sFIDA para una dilución en serie de $Aß_{1-42}$-SiNP de un tamaño de 80 nm en LCE. Existe una correlación clara entre la concentración de $Aß_{1-42}$-SiNP y la lectura de sFIDA.

La Figura 7 muestra la lectura de sFIDA para una dilución en serie de $Aß_{1-42}$-SiNP de 80 nm en plasma. Existe una clara correlación entre la concentración de $Aß_{1-42}$-SiNP y la lectura de sFIDA y una clara demarcación de la señal del control de plasma.

Figura 8 muestra:

A La funcionalización de la superficie de los puntos cuánticos CdSe/ZnS con ácido 3-mercaptopropiónico, que da lugar a un punto cuántico carboxi-funcionalizado.
B La funcionalización de la superficie de los puntos cuánticos CdSe/ZnS con 2-mercapto-etilamina, que da lugar a una nanopartícula amino-funcionalizada.
C La funcionalización de la superficie de los puntos cuánticos CdSe/ZnS con (3-sulfanilpropil) rimetoxitoxisilano, que da lugar a un punto cuántico silanizado. Esto se puede rodear con una cubierta de silicato usando la síntesis de Stöber.

El procedimiento para producir un estándar para la detección de agregados de proteínas y/u oligómeros de una enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas se lleva a cabo con las siguientes etapas:

A) Proporcionar una nanopartícula inorgánica con el tamaño del agregado de proteína y/u oligómero de una enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas a detectar,
B) Acoplamiento de secuencias de reconocimiento (tres variantes)

Variante 1. Acoplamiento de secuencias de reconocimiento a aminas primarias

i. Formación de grupos amino o grupos carboxi libres en la superficie de la nanopartícula para funcionalizar la superficie de la nanopartícula para formar una nanopartícula funcionalizada con amino o carboxi,
ii. En su caso: Conversión de los grupos amino libres en grupos carboxi,
iii. Conversión de los grupos carboxi en la superficie de las nanopartículas en un éster de NHS,
iv. Unión de grupos amino de monómeros del agregado y/u oligómero potencialmente tóxico de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas a los ésteres de NHS de la etapa iii).
v.

Variante 2. Acoplamiento de secuencias de reconocimiento a tioles

i. Formación de grupos amino o grupos carboxi libres en la superficie de la nanopartícula (para funcionalizar la superficie de la nanopartícula para formar una nanopartícula funcionalizada con amino, ii. Acoplamiento de una molécula de maleimida-espaciador-carboxi a la amina primaria, iii. Unión de grupos tiol de la secuencia de reconocimiento o del péptido oligomérico de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas al grupo maleimida de la etapa ii).
Variante 3.

i) Formación de grupos amino libres en la superficie de la nanopartícula (para funcionalizar la superficie de la nanopartícula para formar una nanopartícula amino-funcionalizada,
ii. Formación de grupos amino libres o grupos carboxi libres en la superficie de la nanopartícula (para funcionalizar la superficie de la nanopartícula para formar una nanopartícula funcionalizada con amino o carboxi,
iii. En su caso: Conversión de los grupos amino libre en grupos carboxi
iv. Conversión de los grupos carboxi en la superficie de las nanopartículas en un éster de NHS,
v. Unión de grupos amino de estreptavidina a los ésteres de NHS de la etapa iv).
vi. Unión de una secuencia de reconocimiento biotinilada de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas a las moléculas de estreptavidina.

Definición de términos:

Para los fines de la invención, los siguientes términos deben entenderse como sigue:
En inmunología, un epítopo es un área en la superficie de un antígeno al que se pueden unir los anticuerpos.

En inmunología, un antígeno es una molécula que el sistema inmune considera extraño.

En química, un grupo acilo, azilo o alcanoilo es un grupo funcional con la estructura general R-(C=O)-, donde R es un radical organilo (alquilo, arilo o un grupo heteroaromático, etc.) o un es un átomo de hidrógeno.

Las imidas (compuestos imido) son un grupo de sustancias de compuestos orgánicos que tienen el grupo funcional R-C(O) -NR-C(O)-R, es decir, son diacilamidas.

La succinimida es un compuesto químico del grupo de las carboximidas y la imida del ácido succínico.

N-hidroxisuccinimida (NHS, generalmente abreviado como HOSu en fórmulas estructurales, según IUPAC 1-hidroxi-2,5-pirrolidinediona) es el derivado *N*-hidroxi de succinimida. La sustancia se usa principalmente en síntesis orgánicas para producir los denominados ésteres de NHS. Los ésteres de NHS son "ácidos carboxílicos activados" y reaccionan fácilmente con funciones amino, por ejemplo, de péptidos o proteínas, que son significativamente más nucleófilas que los alcoholes.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un estándar, que comprende una nanopartícula inorgánica con un tamaño de 2 a 200 nm, en cuya superficie ya sea mediante

i) ácido carboxílico-espaciador-maleimida o mediante
ii) ésteres de NHS

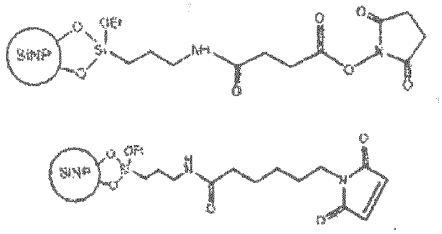
se unieron monómeros del agregado de proteínas de la enfermedad por plegamiento incorrecto de proteínas a detectar, en la detección de un agregado de proteínas, en particular en la detección de agregados y/u oligómeros potencialmente tóxicos de la demencia de Alzheimer, donde se trata una muestra con un número desconocido de sitios de unión y el estándar con un número conocido de sitios de unión con un péptido o anticuerpo fluorescente y con el resultado del estándar se deduce el número de sitios de unión en la muestra.

2. Uso de un estándar según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el número de ácidos carboxílicos-espaciador-maleimida o los ésteres de NHS corresponde aproximadamente al número de monómeros presentes en el agregado antes de la unión de los monómeros.

3. Uso de un estándar según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por** un tamaño de la nanopartícula de 2 a 60 nm, con especial preferencia de 2 a 20 nm.

4. Uso de un estándar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** una nanopartícula de sílice o una nanopartícula de oro o un punto cuántico como nanopartícula.

5. Uso de un estándar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, antes de la unión de los monómeros **caracterizado por** las fórmulas:



con SINP = nanopartículas de sílice o nanopartículas de puntos cuánticos con capa de sílice.

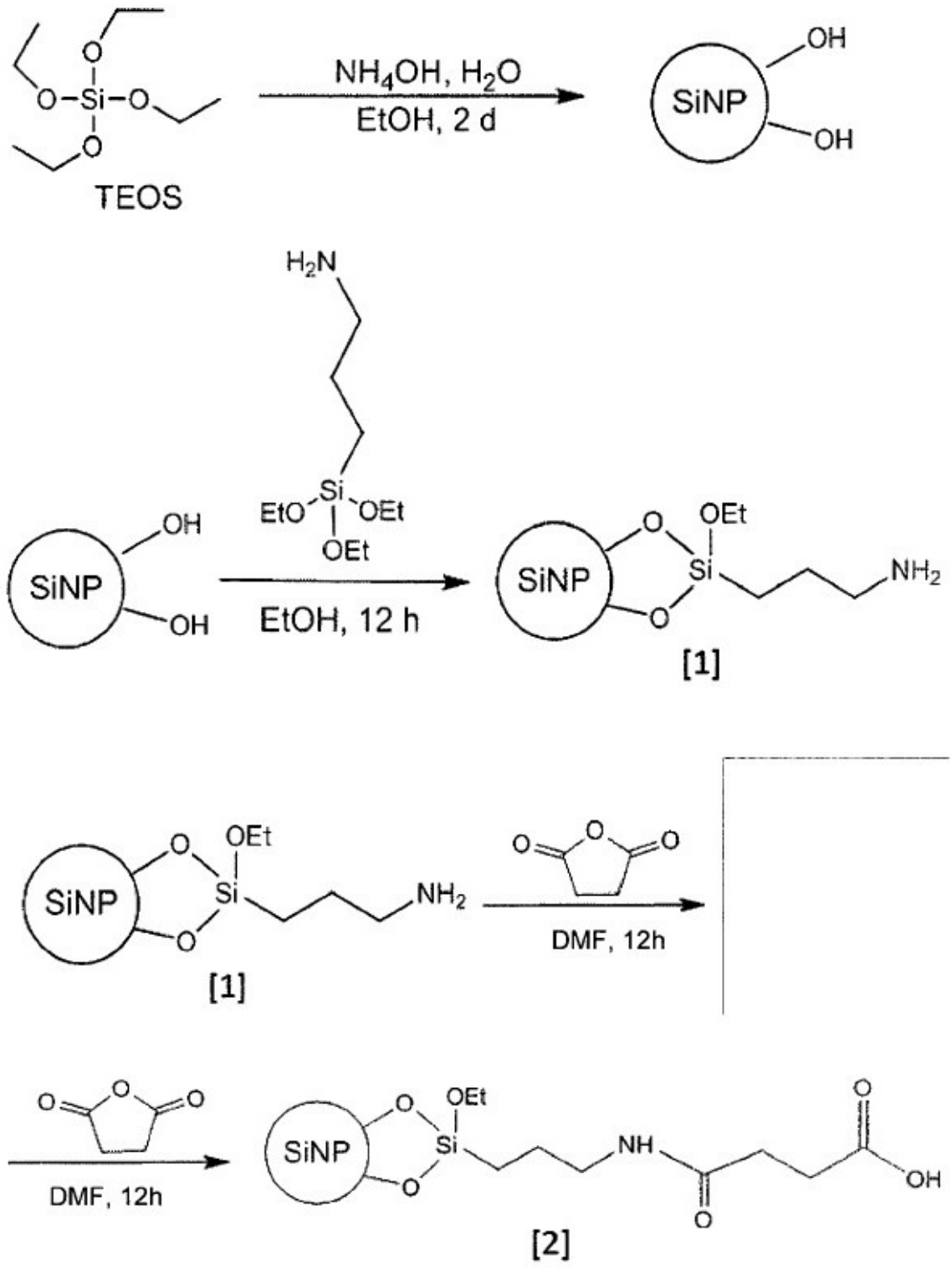

TEOS
NH4OH, H2O
EtOH, 2 d
SiNP
OH
OH
H2N
EtO
OEt
OEt
Si
EtOH, 12 h
[1]
NH2
DMF, 12h
[2]
NH
O
OH

Figura 1

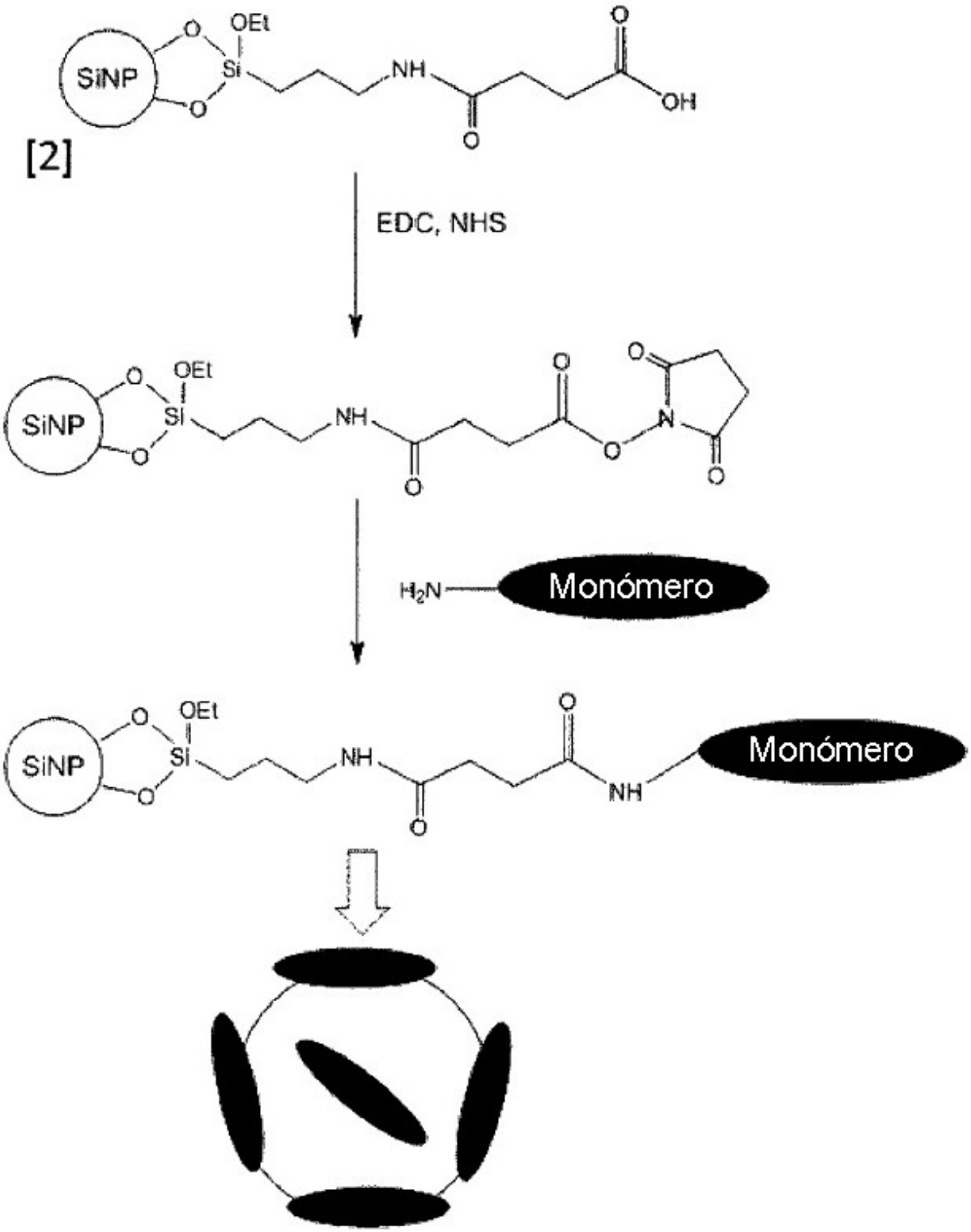


Figura 2A

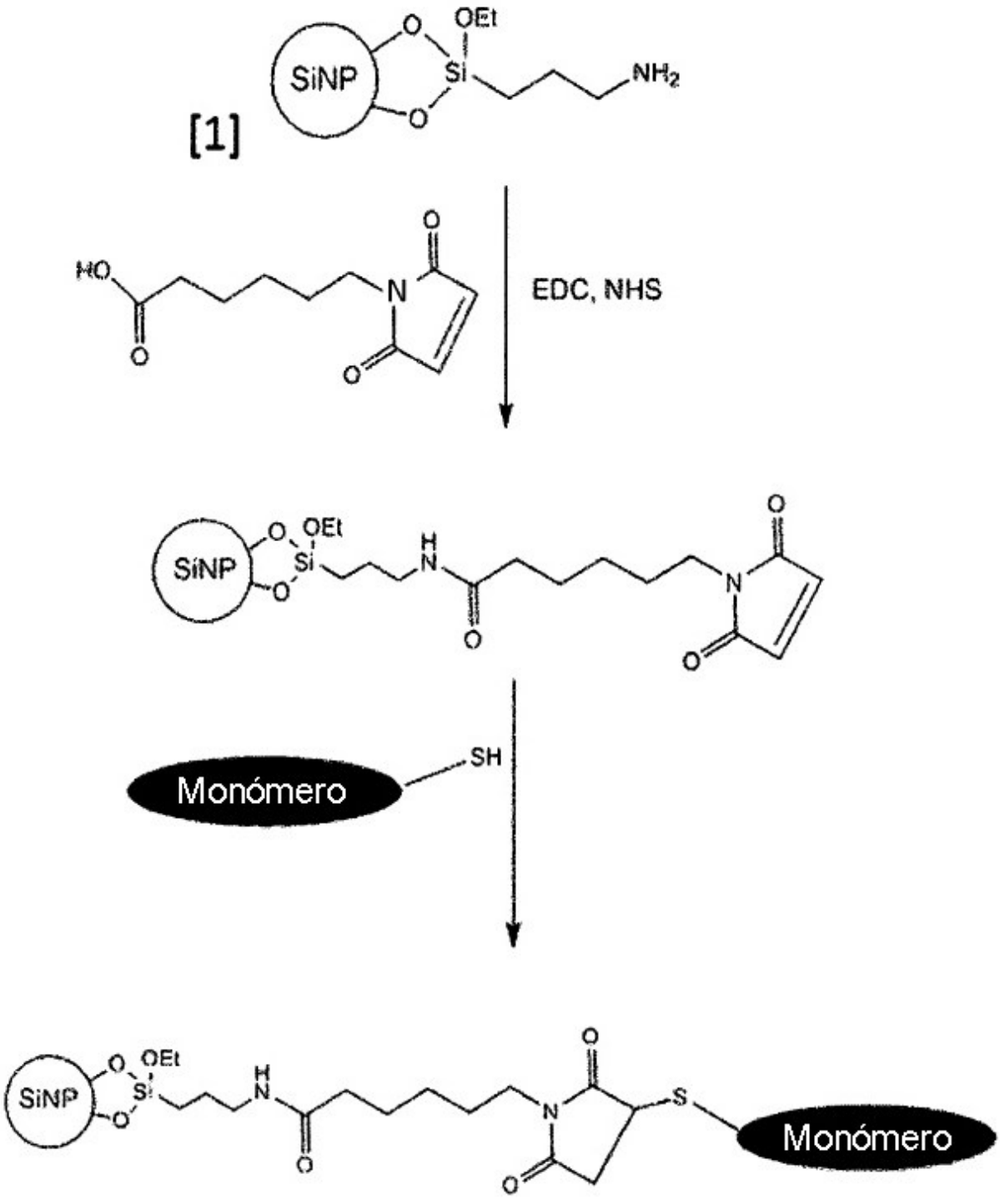

[1]
SiNP
OEt
Si
O
NH2
HO
N
EDC, NHS
SiNP
OEt
Si
H
N
Monómero
SH
SiNP
OEt
Si
H
N
S
Monómero

Figura 2B

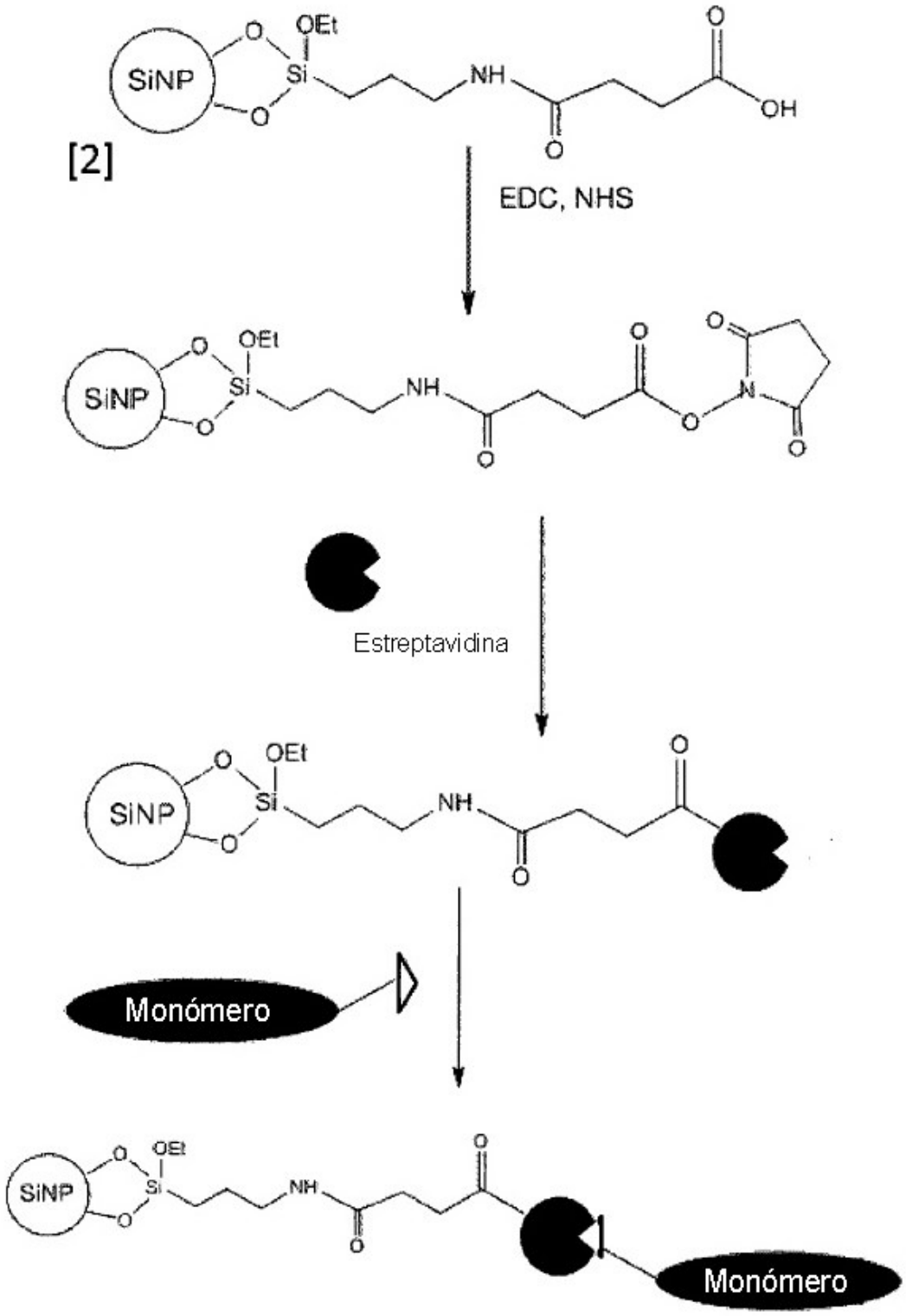

[2]
SiNP
OEt
Si
O
NH
OH
EDC, NHS
N
Estreptavidina
Monómero
Monómero

Figura 2C

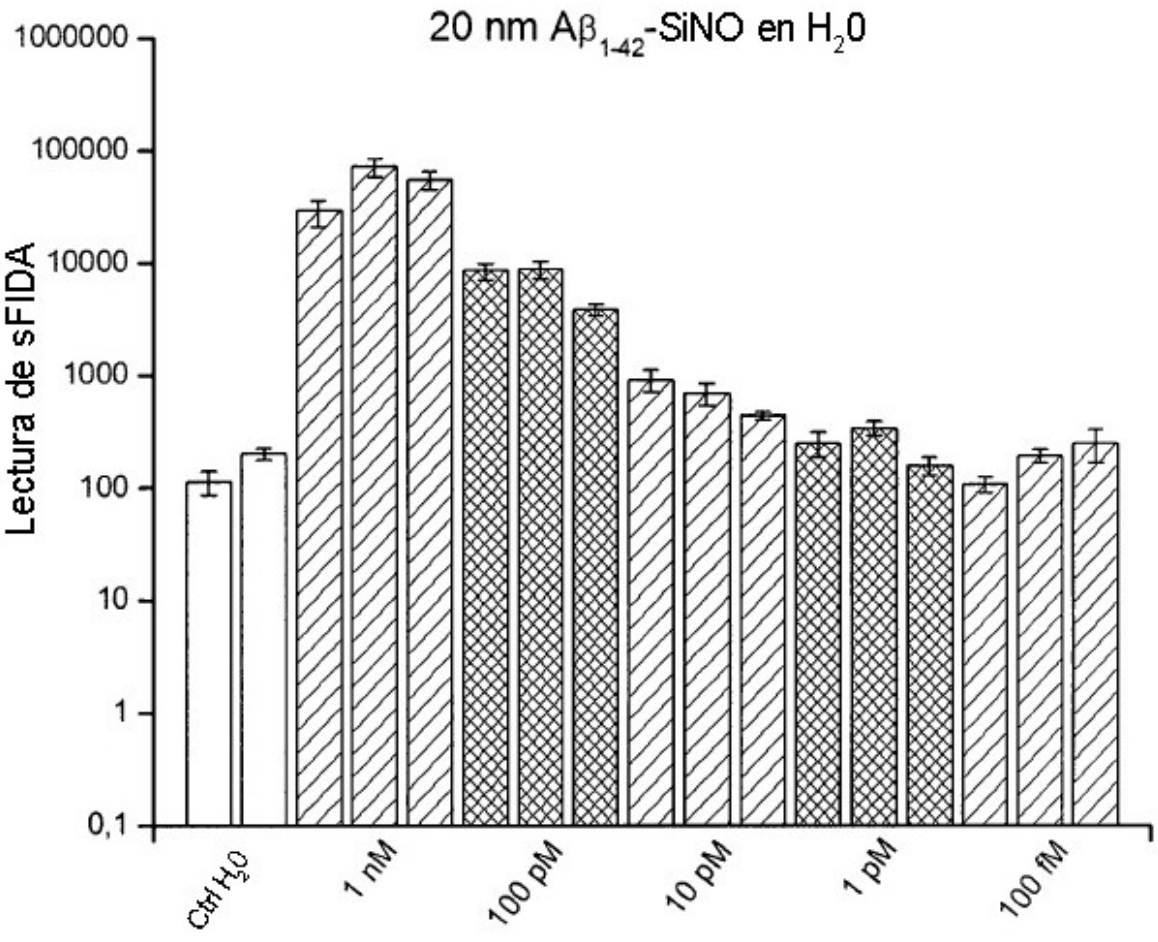

20 nm Aβ1-42-SiNO en H20
Lectura de sFIDA
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
Ctrl H2O
1 nM
100 pM
10 pM
1 pM
100 fM

Figura 3

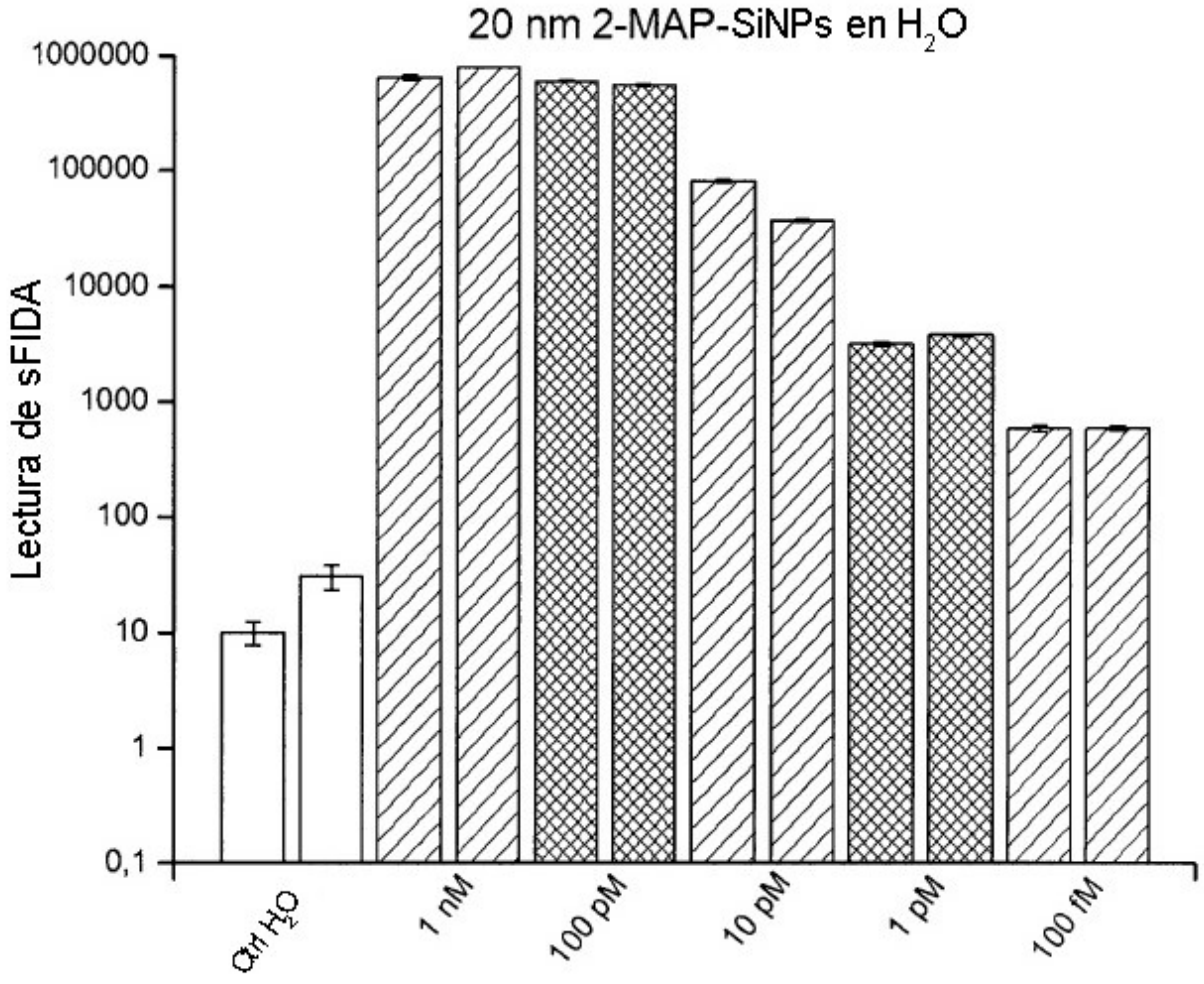

20 nm 2-MAP-SiNPs en H_2O
Lectura de sFIDA
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
Ctrl H_2O
1 nM
100 pM
10 pM
1 pM
100 fM

Figura 4

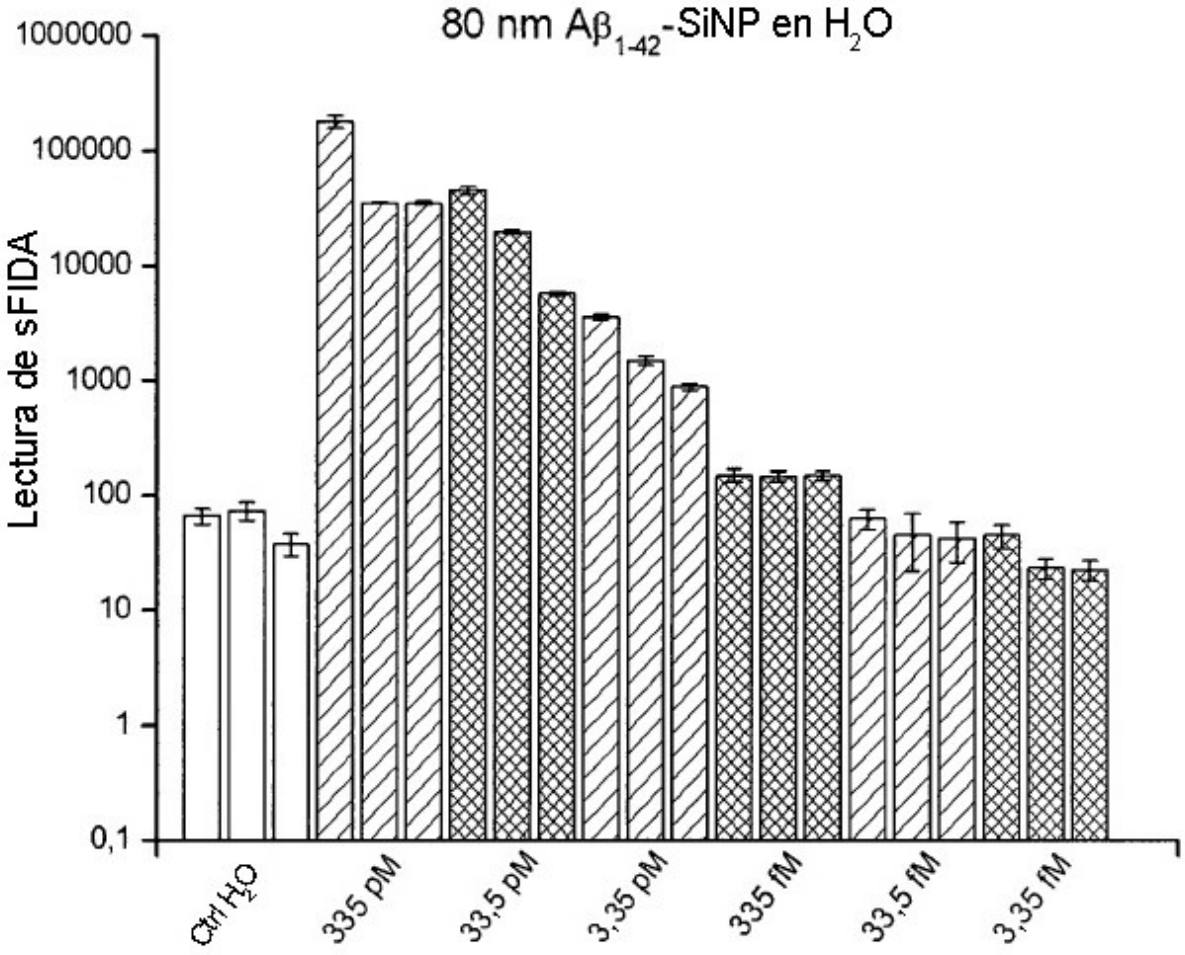

80 nm Aβ1-42-SiNP en H2O
Lectura de sFIDA
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
Ctrl H2O
335 pM
33,5 pM
3,35 pM
335 fM
33,5 fM
3,35 fM

Figura 5

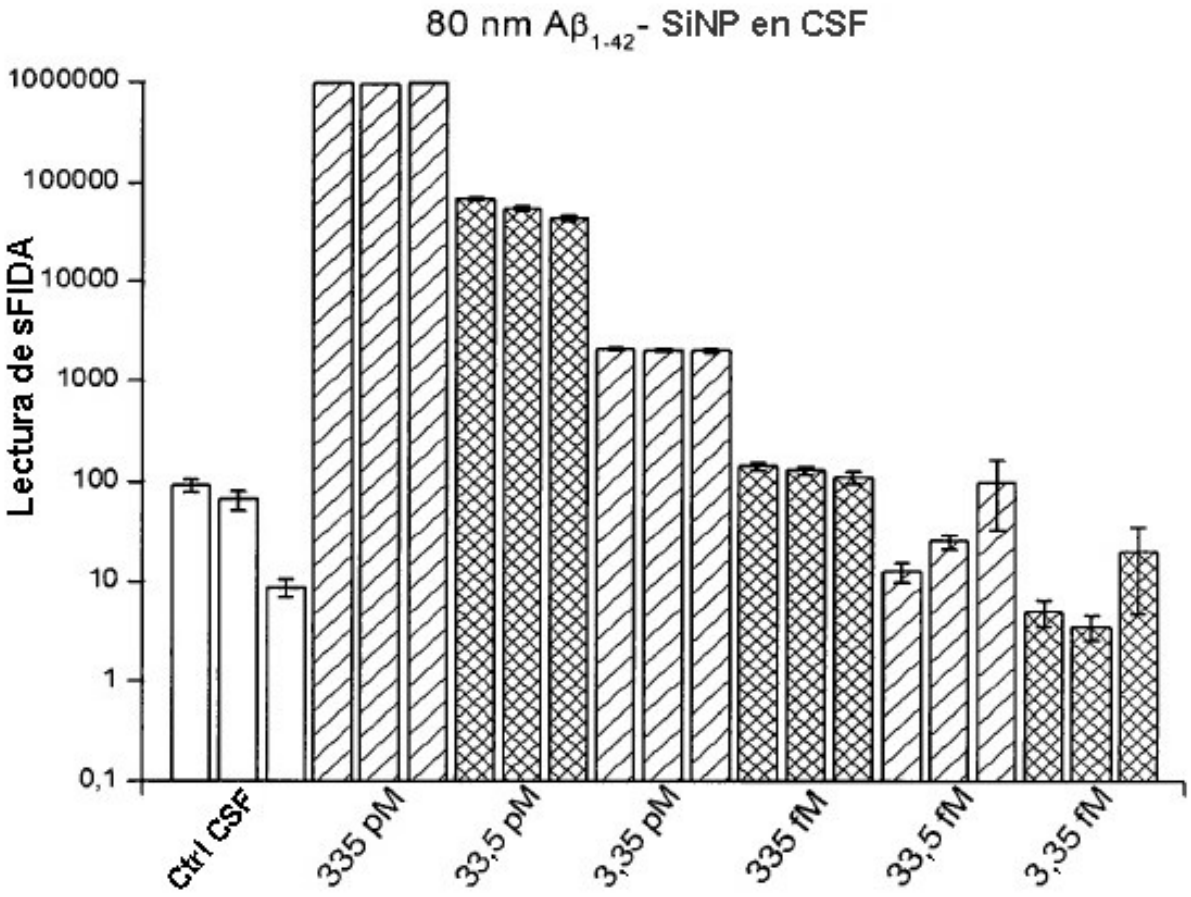

80 nm Aβ1-42- SiNP en CSF
Lectura de sFIDA
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
Ctrl CSF
335 pM
33,5 pM
3,35 pM
335 fM
33,5 fM
3,35 fM

Figura 6

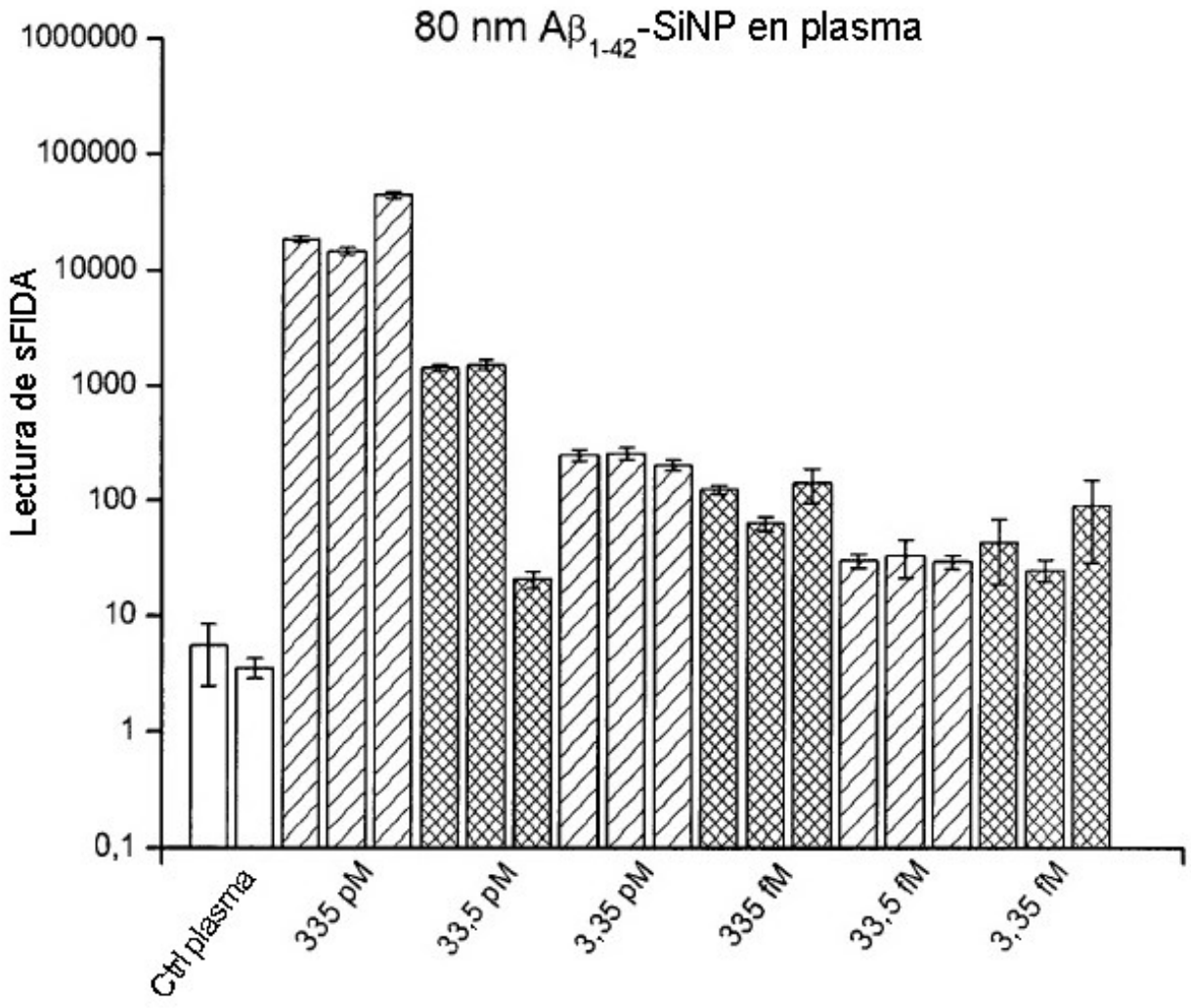

80 nm Aβ1-42-SiNP en plasma
Lectura de sFIDA
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
Ctrl plasma
335 pM
33,5 pM
3,35 pM
335 fM
33,5 fM
3,35 fM

Figura 7

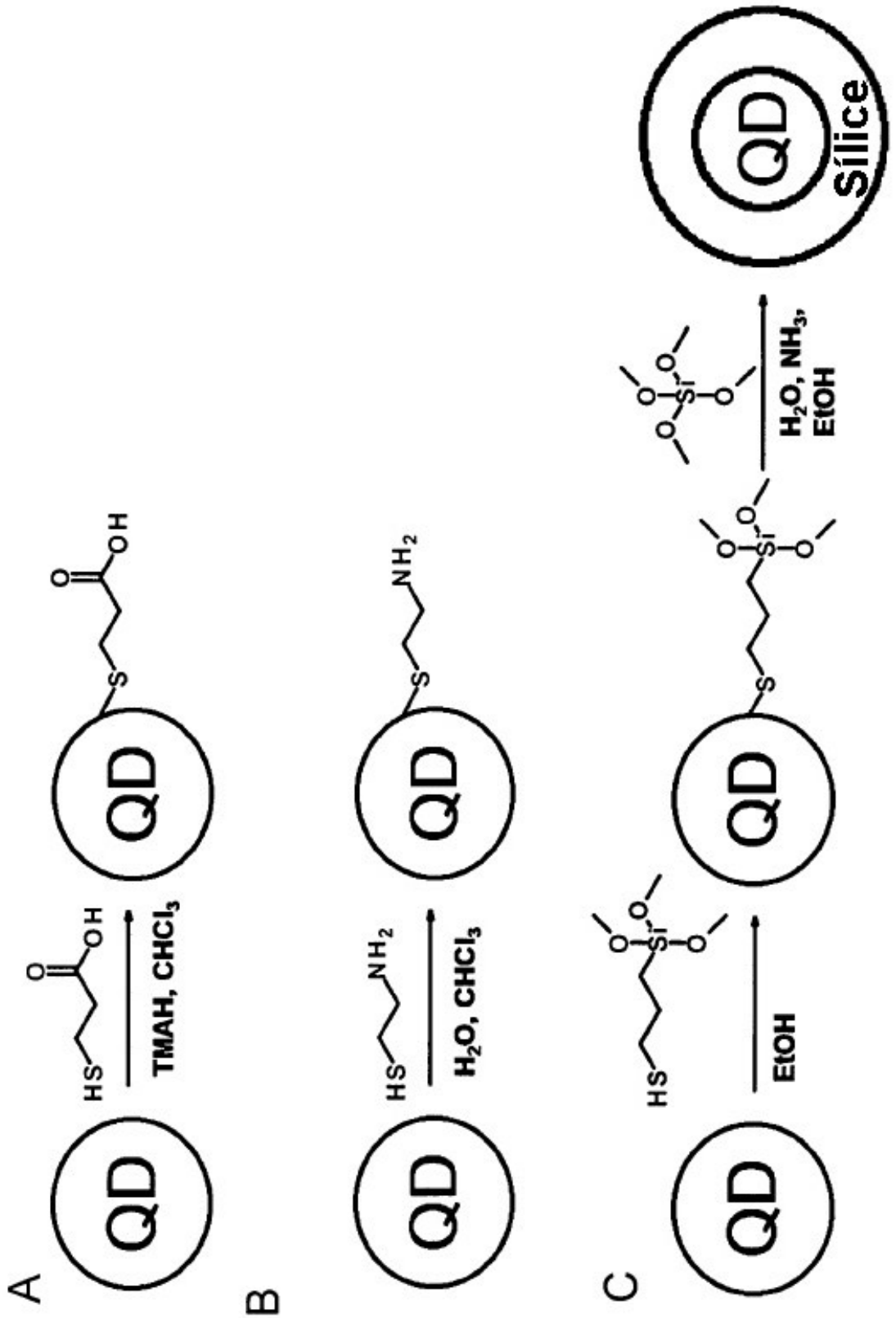

A
QD
HS
TMAH, CHCl3
B
QD
HS
NH2
H2O, CHCl3
C
QD
HS
EtOH
H2O, NH3,
EtOH
Sílice

Figura 8