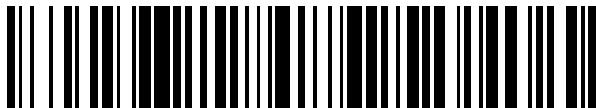


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 781 104**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G06F 19/00 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2015 PCT/EP2015/065044**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16001334**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2015 E 15742188 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3164716**

(54) Título: **Procedimiento para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas**

(30) Prioridad:

**01.07.2014 EP 14175331
03.07.2014 EP 14175677**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.08.2020

(73) Titular/es:

**SENOSTIC HEALTH GMBH (100.0%)
Feodor-Lynen-Strasse 21
30625 Hannover, DE**

(72) Inventor/es:

LÜHRS, THORSTEN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 781 104 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 el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas

La presente invención se refiere a un procedimiento analítico para su uso en el diagnóstico y clasificación de enfermedades neurodegenerativas, especialmente enfermedades neurodegenerativas asociadas con el plegamiento erróneo de proteínas o la agregación de proteínas, y a un dispositivo para su uso en el procedimiento. En la presente memoria, las enfermedades neurodegenerativas asociadas con el plegamiento erróneo de proteínas también se denominan colectivamente enfermedades relacionadas con el agregado de priones, que incluyen, p. ej. amiloidosis y proteopatías que incluyen enfermedades de agregación de sinucleína (sinucleopatías), enfermedades de agregación de tau (tauopatías) y enfermedades de agregación de péptidos beta (A β) del Alzheimer. Las enfermedades preferidas son trastornos neurodegenerativos y demencias, p. ej. enfermedad de Alzheimer, demencia lobular frontotemporal, enfermedad de Parkinson, Demencia con Cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson con demencia, Atrofia Multisistémica, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de la neurona motora y enfermedad de Huntington. Estas enfermedades están acompañadas por la aparición de la proteína priónica de conformación agregada que presenta un analito patológico adecuado que tiene especificidad para dicha enfermedad. La proteína priónica de conformación agregada puede ser transmisible y puede inducir que la proteína priónica de conformación nativa cambie su conformación a la conformación agregada asociada con la patología de la enfermedad. Adicionalmente, la invención se refiere a un dispositivo para su uso en el procedimiento.

Estado de la técnica

El documento WO 2014/043388 A1 describe un dispositivo de microfluidificación y un método para mezclar diferentes líquidos y guiarlos a un detector, en cuyo procedimiento una gotita que fluye más allá de una entrada de inyección recibe una fuerza de cizallamiento.

Salvadores et al., Cell Reports 261-268 (2014) describen la detección de la proteína β -amiloide (A β) agregada para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer incubando en un agitador con temperatura controlada una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) con péptido A β libre de agregado y tioflavina T. La formación de amiloide se determinó mediante fluorometría intermedia utilizando un espectrofluorómetro de placa para la unión de tioflavina T a fibrillas amiloides.

El documento WO 2012/110570 A1 describe un procedimiento para la amplificación de la proteína priónica de conformación agregada a partir de la proteína priónica de conformación nativa en mezcla con la proteína priónica de conformación agregada utilizando el control de la fuerza de cizalla. Opcionalmente, se someten alícuotas de una mezcla a diferentes intensidades de fuerza de cizalla controlada.

Eckroat et al., Beilstein J. Org. Chem 2013, 1012-1044 describen sondas de tinte para β -amiloide. McKhann et al., Neurology. 34(7), 939-44 (1984)), Jack Jr et al., Alzheimers Dement. 2011 7(3), 257-262, McKhann et al., Alzheimers Dement. 7(3): 263-269 (2011), Albert et al., Alzheimers Dement. 7(3): 270-279 (2011), Sperling et al., Alzheimers Dement. 7(3): 280-292 (2011) y Jack Jr et al., Ann. Neurol 71(6): 765-774 (2012) así como Eggert K, et al. "Leitlinien: Parkinson-Syndrome - Diagnostik und Therapie", AWMF-Register Núm. 030/010, Stand 09/2012, y Deutsche Gesellschaft fur Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN), "S3 Praxisleitlinie: Diagnose- und Behandlungsleitlinie 'Demenz'" describen los criterios de diagnóstico para clasificar las enfermedades neurodegenerativas.

Barghorn et al., Methods in Molecular Biology, Vol 299, 2005: Amloid Proteins: Methods and Protocols, páginas 35-51, "Purification of recombinant tau protein and preparation of Alzheimer-paired helical filaments in vitro" describen isoformas de la proteína tau humana.

Objeto de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento analítico que permita detectar un analito específico para una enfermedad relacionada con el agregado de priones utilizando una muestra biopsiada obtenida de un mamífero, especialmente un ser humano o un mamífero experimental, p. ej., un ratón o una rata. Un objeto preferido es un procedimiento analítico que permite un diagnóstico diferencial, más preferiblemente antes del inicio o temprano al inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad.

Descripción de la invención

La invención alcanza el objeto, especialmente el diagnóstico diferencial de una enfermedad relacionada con el agregado de priones por las características de las reivindicaciones, especialmente mediante un procedimiento analítico para analizar la presencia de al menos una proteína priónica de conformación agregada en una muestra de fluido corporal o una muestra de tejido procedente de un mamífero, preferiblemente biopsiada de un ser humano, especialmente de un paciente preclínico o un paciente que se sospecha que tiene una enfermedad neurodegenerativa, p. ej. un paciente que se sospecha que tiene una enfermedad neurodegenerativa basándose en criterios diagnósticos fenomenológicos como se describe en el estado de la técnica. La muestra puede comprender o consistir en sangre, preferiblemente suero sanguíneo, orina y/o líquido cefalorraquídeo (LCR), o cualquier otro tejido

sólido, p. ej. una muestra de tejido que preferiblemente contiene una sección de nervio, por ejemplo, una biopsia de piel. El mamífero es preferiblemente un ser humano, un animal de granja utilizado para la producción de alimentos, p. ej. ganado bovino, ciervos, alces, cerdos, ovejas, cabras, aves o animales de experimentación, p. ej. un ratón, rata o primate no humano. El animal también puede ser un mamífero salvaje, por ejemplo, una cabra, ciervo o alce salvajes. En la presente memoria, la generación de proteína priónica de conformación agregada a partir de una mezcla que comprende proteína priónica de conformación nativa y una muestra que contiene proteína priónica de conformación agregada con aplicación de fuerza de cizalla también se denomina amplificación.

Para los fines de la invención, las enfermedades neurodegenerativas también incluyen el trastorno de estrés postraumático (TEPT, p. ej., ICD10 F43.1) que se puede desarrollar en personas después de estar expuesto a uno o más eventos traumáticos, p. ej. agresión sexual, combatir en una guerra, sufrir lesiones graves o amenaza de muerte con la experiencia de miedo intenso, horror o impotencia, así como síndrome de piernas inquietas (SPI, p. ej., G25.8), también conocido como enfermedad de Willis-Ekbom (WED) o Síndrome de Wittmaack-Ekbom, un trastorno neurológico caracterizado por una necesidad irrisible de mover el cuerpo para detener las sensaciones incómodas o extrañas, p. ej. afectando las piernas, brazos, torso, cabeza o incluso extremidades fantasma, proporcionando el movimiento un alivio temporal.

Durante la preparación de la invención, se ha encontrado que la proteína priónica de conformación agregada induce el cambio en la conformación de la proteína priónica nativa en función de la intensidad de la fuerza de cizalla aplicada a una mezcla de estas, y que el cambio en la conformación puede además depender de la proteína priónica de conformación agregada específica añadida a la proteína priónica de conformación nativa. Como se emplea en la presente memoria, la proteína priónica nativa se refiere a la proteína de conformación no agregada que sufre un cambio en la conformación en presencia de la proteína priónica de conformación agregada (semilla) a proteína priónica de conformación agregada. Por consiguiente, la proteína priónica nativa también se puede denominar proteína priónica no agregada. En mayor detalle, se ha encontrado que, dependiendo de la fuente, la proteína priónica de conformación agregada cuando se somete a una fuerza de cizalla específica mezclada con la proteína priónica de conformación nativa puede producir la amplificación de una conformación agregada solo para intensidades específicas de fuerza de cizalla, mientras que se produce poca o ninguna amplificación de la conformación agregada a diferentes intensidades de fuerza de cizalla, p. ej. diferentes intensidades de fuerza de cizalla producen un patrón diferente de conformación agregada generada a partir de la proteína priónica de conformación nativa original. La proteína priónica de conformación agregada también se denomina semilla proteopática, o semilla. Por ejemplo, la semilla y la proteína priónica de conformación nativa en la mezcla sometida a diferentes intensidades de fuerza de cizalla pueden tener la misma secuencia de aminoácidos, lo que da como resultado la amplificación de la proteína priónica de conformación agregada de la proteína priónica de conformación nativa solo a intensidades específicas de fuerza de cizalla. En consecuencia, la invención utiliza la dependencia de la amplificación de la conformación agregada de la intensidad de la fuerza de cizalla aplicada a la proteína priónica de conformación nativa, que también depende de la semilla específica presente en la mezcla con la proteína priónica de conformación nativa, para analizar específicamente la presencia de una proteína priónica de conformación agregada en la muestra. Por consiguiente, el procedimiento de la invención contiene la etapa de determinación del contenido de la proteína priónica de conformación agregada generada en mezcla con la muestra que se debe analizar utilizando una intensidad de fuerza de cizalla, preferiblemente utilizando al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes y la etapa de comparación de los datos sobre estos contenidos de proteína priónica generada que tiene una conformación agregada con los datos sobre el contenido de proteína priónica agregada que está determinada previamente, cada una con la misma intensidad de fuerza de cizalla para una mezcla de la misma proteína priónica de conformación nativa con una muestra de referencia como semilla. Las al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes pueden, p. ej. ser al menos 3, preferiblemente al menos 4 a al menos 12, p. ej. hasta 24 o hasta 36 intensidades de fuerza de cizalla diferentes. La intensidad de la fuerza de cizalla, generalmente preferida, del procedimiento está determinada previamente y es idéntica para la muestra y para su uso en la generación de datos determinados previamente sobre el contenido de proteína priónica de conformación agregada, especialmente generada a partir de una mezcla de proteína priónica de conformación nativa y una muestra de referencia. La intensidad de la fuerza de cizalla generalmente se puede determinar previamente con respecto a la duración de la aplicación de la fuerza de cizalla para cada ciclo, la duración de la fase de reposo para cada ciclo y el número de repeticiones de ciclos.

Preferiblemente, los datos determinados previamente sobre el contenido de proteína priónica de conformación agregada generada se determinan por separado para cada una de al menos dos mezclas de la misma proteína priónica de conformación nativa con una semilla, conteniendo cada mezcla una muestra de referencia diferente como semilla, que es p. ej obtenida de un paciente de referencia diferente que tiene un diagnóstico conocido para una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo determinada por esquemas de diagnóstico convencionales. Los esquemas de diagnóstico convencionales son pautas de diagnóstico para la demencia y los síndromes de Parkinson, p. ej. la clasificación según McKhann et al., "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease, Neurology. 34(7), 939-44 (1984), preferiblemente según la descripción general de Jack Jr et al., "Introduction to revised criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: National Institute on aging and the Alzheimer association workgroups, Alzheimers Dement. 2011 7(3), 257-262, con respecto a EA más preferido según McKhann et al., "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging

- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease", *Alzheimers Dement.* 7(3): 263-269 (2011), con respecto al deterioro cognitivo leve (DCL) debido a EA, preferiblemente según Albert et al., "The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging - Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease", *Alzheimers Dement.* 7(3): 270-279 (2011), con respecto a la EA preclínica preferiblemente según Sperling et al., "Towards defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging - Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease", *Alzheimers Dement.* 7(3): 280-292 (2011) y/o según Jack Jr et al., "An operational approach to NIA-AA criteria for preclinical Alzheimer's disease", *Ann. Neurol.* 71(6): 765-774 (2012), y/o según Eggert K, et al. "Leitlinien: Parkinson-Syndrome - Diagnostik und Therapie", AWMF-Register Nr. 030/010, Stand 09/2012, y/o según Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN), "S3 Praxisleitlinie: Diagnose- und Behandlungsleitlinie 'Demenz'". Preferiblemente, los datos sobre estas cantidades determinada previamente que son específicas para al menos una intensidad de fuerza de cizalla, preferiblemente para al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes y específicas para una muestra de referencia de una fuente específica están contenidas y son proporcionadas en un banco de datos basado en ordenadores, y la comparación es realizada por un ordenador.

La muestra de referencia específica se puede seleccionar, por ejemplo, a partir de una muestra de fluido corporal o tejido de un paciente, vivo o fallecido, con un diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa específica o un subtipo de la misma. Preferiblemente, el banco de datos contiene el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa específica y/o un subtipo de la misma asociado con datos determinados previamente sobre cantidades de proteína priónica de conformación agregada, cada uno generado en una de al menos dos, p. ej. 3, 4, 12, 24 o 36 intensidades de fuerza de cizalla diferentes para cada muestra de referencia. Generalmente, la muestra que se debe analizar y la muestra de referencia se pueden mezclar con la misma proteína priónica de conformación nativa y se pueden someter a las mismas intensidades de fuerza de cizalla.

La amplificación dependiente de la fuerza de cizalla de la conformación agregada se realiza sometiendo la mezcla que comprende o que consiste en la muestra de fluido corporal y al menos una proteína priónica de conformación nativa a al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes. Las intensidades de fuerza de cizalla se controlan para que tengan una intensidad uniforme con un rango de intensidad de máximo 20% o máximo 15% o 12%, p. ej. máximo 10%, preferiblemente máximo 5%, más preferiblemente máximo 2% o máximo 1% de un valor de fuerza de cizalla.

En una primera realización preferida, la mezcla que comprende la muestra de mamífero, p. ej. de fluido corporal y/o tejido, y al menos una proteína priónica de conformación nativa se somete a al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes dividiendo la mezcla en alícuotas (porciones de la mezcla) y sometiendo cada una de las alícuotas a una de las al menos dos intensidades de fuerza de cizalla. Preferiblemente, las alícuotas se someten a una de las intensidades de fuerza de cizalla cada una en paralelo, preferiblemente utilizando dispositivos idénticos o secciones de dispositivos idénticas para generar las intensidades de fuerza de cizalla.

En una segunda realización preferida, la mezcla o una alícuota de la misma se somete a al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes secuencialmente, p. ej. sometido primero a una de las intensidades de fuerza de cizalla y más tarde a otra de las intensidades de fuerza de cizalla. En esta realización, la determinación del contenido de conformación agregada se realiza durante y/o después de la aplicación de una intensidad de fuerza de cizalla y/o después de la aplicación de cada intensidad de fuerza de cizalla.

Las realizaciones primera y segunda se pueden combinar, p. ej., con un procedimiento en el que al menos dos alícuotas de la mezcla se someten cada una secuencialmente a diferentes intensidades de fuerza de cizalla, p. ej., la mezcla o al menos dos alícuotas de la misma se someten a una primera intensidad de fuerza de cizalla y, posteriormente, a una intensidad de al menos una segunda fuerza de cizalla, diferiendo cada intensidad de fuerza de cizalla de la otra.

En el procedimiento, la proteína priónica de conformación nativa se pone en contacto con la proteína priónica de conformación agregada (semilla) en una composición líquida y se somete a al menos un ciclo o a varios ciclos de aplicación de fuerza de cizalla para fragmentar los agregados de proteína priónica, en donde la fuerza de cizalla aplicada se controla con precisión, p. ej. a un rango máximo de 20% o máximo de 15% o 12%, p. ej. máximo de 10%, preferiblemente máximo de 5%, más preferiblemente máximo de 2% o máximo de 1% de un valor de fuerza de cizalla, más preferiblemente a un rango de intensidad de 0,5% alrededor de un valor de intensidad de fuerza de cizalla, en donde opcionalmente cada ciclo contiene al menos una segunda fase de incubación sin agitación y/o al menos una fase de agitación a un valor de intensidad de fuerza de cizalla, que es diferente del primer valor de intensidad de fuerza de cizalla, que es, por ejemplo, cero o de 1 a 50%, preferiblemente cero del primer valor de intensidad de fuerza de cizalla. La segunda fase de incubación, también denominada fase de reposo, se incluye para permitir la agregación de la proteína priónica de conformación nativa con la proteína priónica de conformación agregada. Opcionalmente, el producto obtenido por el procedimiento de la invención se puede utilizar como proteína de conformación agregada, p. ej. como semilla para la determinación previa del contenido de proteína priónica en estado agregado. Para la determinación previa, la semilla mezclada con la proteína priónica de conformación nativa se somete a al menos un ciclo o a varios ciclos de aplicación de fuerza de cizalla para fragmentar agregados de proteína priónica como se describe en la presente memoria.

La proteína priónica de conformación nativa se puede producir, p. ej., mediante expresión en una célula cultivada que se manipula genéticamente para que contenga un casete de expresión que codifica la proteína priónica y aísla la proteína priónica de la célula cultivada y/o del medio de un cultivo de las células. Las células para la expresión de la proteína priónica pueden ser bacterias, preferiblemente *E. coli*, levadura, hongos y células de mamíferos, p. ej. células humanas o células CHO de hámster. La proteína priónica de conformación nativa también se puede producir a partir de tejido de mamífero.

Las intensidades de la fuerza de cizalla se pueden generar como ciclos o repeticiones de una fase de fragmentación con una fase de reposo posterior sin aplicar fuerza de cizalla, p. ej. consistiendo cada fase de fragmentación en 1s a 240s, preferiblemente 30s a 120s y consistiendo cada fase de reposo subsiguiente en 10s a 1080s, preferiblemente 60s a 540s. Los ciclos o repeticiones de la fase de fragmentación y la posterior fase de reposo pueden ser, p. ej. de 1 a 500 ciclos, p. ej. de 5 a 500, preferiblemente de 60 a 280 ciclos, p. ej. de 100 a 140 ciclos. En cada ciclo, se controla que la fuerza de cizalla esté dentro de un rango de intensidad máximo de 10%, preferiblemente máximo de 2%, más preferiblemente máximo de 1%, p. ej. dentro de 0,5% o dentro de 0,1% de una intensidad de fuerza de cizalla.

La fuerza de cizalla que tiene una intensidad que se controla para que tenga una intensidad uniforme que tiene un rango de intensidad máximo de 20% de un valor de fuerza de cizalla se puede generar por un generador de fuerza de cizalla que comprende o consiste en un elemento giratorio dispuesto en un receptáculo de la muestra que tiene una tapa, en donde el elemento giratorio se hace funcionar sobre cojinetes que están dispuestos coaxialmente dentro del receptáculo de la muestra, y en donde el dispositivo giratorio el elemento comprende un primer elemento de acoplamiento de un acoplamiento, p. ej. que comprende o consiste en un imán permanente, que preferiblemente es al menos bipolar o cuadrupolar. El primer elemento de acoplamiento se puede disponer para acoplarse con el segundo elemento de acoplamiento del acoplamiento, p. ej. una disposición de bobina de impulsión que puede disponerse alrededor del primer elemento de acoplamiento. Preferiblemente, la superficie externa del elemento giratorio es paralela a la superficie de la pared interna del receptáculo, p. ej. el elemento giratorio y una sección coaxial de la superficie de la pared interna del receptáculo están separados y son cilíndricos o cónicos. Preferiblemente, el cojinete del elemento giratorio comprende o consiste en un eje, uno de cuyos extremos está dispuesto en contacto con una sección inferior de la superficie interna del receptáculo y el otro extremo del cual se hace funcionar en un cojinete anclado cerca del borde del receptáculo, p. ej. mediante conexión de fricción y/o por ajuste positivo.

Alternativamente, la fuerza de cizalla puede ser generada por un generador de fuerza de cizalla que tiene un elemento giratorio dispuesto coaxialmente en una sección de tubo radialmente espaciada, definiendo el espaciamiento radial del elemento giratorio y el tubo y la sección axial en la que se extienden tanto el elemento giratorio como el tubo un espacio, p. ej. de sección transversal en forma de anillo, en cuyo espacio se genera fuerza de cizalla tras la rotación del elemento giratorio. Preferiblemente, el elemento giratorio a lo largo de su eje longitudinal y giratorio tiene un diámetro externo constante y está dispuesto en una separación constante de la sección del tubo circundante. El elemento giratorio puede adoptar cualquier forma externa, preferiblemente de simetría axial, p. ej. una forma plana o una sección transversal rectangular y preferiblemente tiene una superficie externa cilíndrica. Preferiblemente, el tubo en su sección que rodea el elemento giratorio tiene una sección transversal interna cilíndrica. A lo largo del eje longitudinal común, el tubo preferiblemente en un extremo de la sección que rodea el elemento giratorio se extiende sobre el elemento giratorio, de modo que el elemento giratorio termina a una distancia del extremo del tubo, permitiendo una acción de succión en la rotación del elemento giratorio y en el extremo opuesto de la sección que rodea el elemento giratorio, el elemento giratorio se extiende sobre al menos una abertura de salida en las paredes del tubo, permitiendo que salga el líquido. Preferiblemente, la al menos una abertura de salida en las paredes del tubo tiene una sección transversal de al menos la sección transversal del área entre el tubo y el elemento giratorio, más preferiblemente, la abertura de salida tiene una sección transversal de, o mayor que, la sección transversal interna del tubo, y lo más preferiblemente, la abertura de salida es la sección transversal del tubo.

Este generador de fuerza de cizalla está dispuesto dentro de un receptáculo que contiene una preparación líquida de proteína priónica, ya que la rotación del elemento giratorio además de ejercer una fuerza de cizalla de una intensidad preestablecida, que se controla en un rango estrecho, genera una succión en el extremo que sobresale de la sección del tubo circundante de modo que todos los elementos volumétricos del líquido se mueven a través del espacio entre el elemento giratorio y la sección del tubo circundante, donde los elementos volumétricos se someten consecutivamente a la fuerza de cizalla.

El elemento giratorio está dispuesto en un cojinete, que es preferiblemente coaxial al tubo y al elemento giratorio, p. ej. el cojinete puede estar dispuesto en una sección de tubo adyacente a la al menos una abertura de salida y opuesto a la sección que rodea el elemento giratorio. Preferiblemente, el cojinete comprende o consiste en un tubo de polímero de baja fricción, p. ej. poli tetrafluoroetileno (PTFE), que tiene opcionalmente al menos 2 o al menos 4 pliegues convexos o cóncavos longitudinales, dispuestos en una sección de tubo adyacente a las aberturas de salida, entre el elemento giratorio y el tubo que lo rodea. El tubo de polímero de baja fricción del cojinete está dispuesto preferiblemente entre un hombro circumferencial que se extiende desde el elemento giratorio y un hombro circumferencial que sobresale de la superficie interna del tubo, p. ej. un hombro en uno de los extremos opuestos del cojinete.

La fuerza de cizalla se controla y se ajusta a un valor específico controlando la velocidad de rotación del elemento giratorio, preferiblemente controlando el motor de impulsión acoplado al elemento giratorio.

Preferiblemente, el generador de fuerza de cizalla se controla a una intensidad de fuerza de cizalla preestablecida correspondiente a una velocidad de rotación entre 10 y 10.000 Hz, preferiblemente entre 50 y 5000 o hasta 2000 o 5 1000 Hz, controlada con precisión a un rango máximo de 1% del conjunto de velocidad de rotación, más preferiblemente a una velocidad de rotación con un rango máximo de +/- 2 Hz, más preferiblemente máximo de +/- 1 Hz, con un diámetro externo del elemento giratorio de 1,95 – 2,05 mm dispuesto en una sección de tubo con un diámetro interno de 1,55 - 2,75 mm, en donde el elemento giratorio es un cilindro, que opcionalmente tiene una sección cuadrada de extremo plano.

10 Como alternativa, la fuerza de cizalla que tiene una intensidad de fuerza de cizalla controlada puede ser generada por un generador de fuerza de cizalla que es un sonicador, también denominado emisor de ultrasonido, que tiene un receptáculo para recibir la preparación líquida que contiene la mezcla que se va a someter a la fuerza de cizalla, teniendo el receptáculo un volumen interno que se extiende solo para un elemento de volumen que está dispuesto en la distancia desde la superficie del sonicador (o superficie de sonotrodo) y es paralelo solamente a la sección de la superficie, en el que se posiciona al menos de 75% a 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al 15 menos 99% de la amplitud máxima. Este elemento de volumen está dispuesto, p. ej., dentro de la distancia de 0,5 mm a 50 mm desde la superficie del sonicador y se extiende en paralelo al centro de la fracción de superficie entre los nodos de vibración de la superficie del sonicador, p. ej. para un máximo de 10%, preferiblemente para un máximo de 2% o 1% del área entre nodos de vibración. La posición del elemento de volumen se puede determinar previamente, p. ej. mediante el cálculo de la fracción de superficie de la superficie del sonotrodo y la distancia desde la superficie del sonotrodo en la que se genera la máxima amplitud y, por lo tanto, la fuerza de cizalla máxima. Debido a la disposición específica del elemento de volumen en la intensidad de vibración máxima, la composición líquida en el mismo está sometida a una fuerza de cizalla que tiene una intensidad de rango de intensidad limitado. Para una transferencia eficaz de vibraciones desde la superficie del sonotrodo al elemento de volumen, el 20 receptáculo preferiblemente consiste en un material que es permisivo para el ultrasonido, p. ej. de polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE) u otros tipos de teflón y un líquido de transferencia, p. ej. agua, se dispone entre el receptáculo y la superficie del sonotrodo. Preferiblemente, el sonotrodo forma una pared de un baño de líquido de transferencia, p. ej. una pared lateral y preferiblemente la pared inferior, y la altura del líquido de transferencia en perpendicular a la superficie del sonotrodo se ajusta a una longitud de onda de ultrasonido, p. ej. a la frecuencia de resonancia del sonotrodo, o a un múltiple integral de la longitud de onda del ultrasonido, p. ej. a la frecuencia de resonancia del sonotrodo. El baño de líquido de transferencia se puede adaptar o diseñar para pre establecer la 25 altura del líquido de transferencia, determinándose la altura en perpendicular a la superficie del sonotrodo.

Preferiblemente, los dispositivos están dispuestos en una matriz de dos o más dispositivos, p. ej. 7, 8, 12, 14 o 21 dispositivos, dispuestos con sus ejes longitudinales verticalmente en una carcasa con temperatura controlada. Todos 30 los dispositivos de la matriz se pueden conectar y controlar por medio de un ordenador, que se proporciona para controlar la velocidad de rotación de cada elemento giratorio individualmente. Esta matriz de dispositivos es ventajosa para el tratamiento de alícuotas de una composición líquida de proteína priónica en paralelo, es decir, sin variación de la composición o estado de la composición líquida, como p. ej. podría ocurrir en procedimientos de tratamiento posteriores durante el almacenamiento de alícuotas y variaciones diarias de las condiciones de tratamiento. Utilizando la matriz de dispositivos, el procedimiento de la invención comprende el tratamiento de 35 alícuotas de una composición líquida que comprende la mezcla de proteína priónica de conformación nativa y semilla en dispositivos individuales separados al mismo tiempo, preferiblemente con diferentes fuerzas de cizalla cada una, que se generan por las diferentes velocidades de rotación aplicadas a los elementos giratorios.

En general, el dispositivo contiene una unidad de control que está configurada para controlar el generador de fuerza de cizalla al menos a una intensidad de fuerza de cizalla preestablecida en un rango limitado a un máximo de 10% de un valor de fuerza de cizalla, p. ej. de la fuerza de cizalla máxima, p. ej. configurando o controlando un variador contenido o acoplado al generador de fuerza de cizalla en un rango máximo de 10% de una frecuencia, p. ej. hasta 40 un máximo de 10%, preferiblemente de 1% o 0,1% de una frecuencia, p. ej. de una frecuencia determinada previamente o de la frecuencia de resonancia del generador de fuerza de cizalla.

50 La unidad de control puede ser un ordenador separado del ordenador que controla los generadores de fuerza de cizalla o puede estar contenida en el mismo ordenador. Preferiblemente, tanto la unidad de control como el ordenador que controla los generadores de fuerza de cizalla están configuradas para almacenar las intensidades de fuerza de cizalla para cada generador de fuerza de cizalla y están configurados preferiblemente para almacenar adicionalmente resultados de medición que representan el contenido de la proteína priónica de conformación agregada, cada uno en relación con las intensidades de fuerza de cizalla. Los resultados de medición que representan el contenido de la proteína priónica de conformación agregada pueden ser resultados de medición óptica de la separación del tamaño de la proteína, p. ej. mediante métodos cromatográficos tales como la cromatografía de exclusión por tamaño o la electroforesis, p. ej. SDS-PAGE, opcionalmente de transferencias Western para la mezcla para la densidad óptica de bandas específicas, o resultados de medición óptica para luminiscencia, para absorbancia o para la dispersión de luz generada por un detector óptico dispuesto para recibir 55 irradiación desde el volumen interno del recipiente para la mezcla.

El dispositivo comprende o tiene acceso a un banco de datos que contiene datos sobre cantidades de proteína priónica de conformación agregada, cuyos datos están determinados previamente para una intensidad de fuerza de cizalla específica, preferiblemente para al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes para una muestra de referencia de una fuente específica de diagnóstico conocido. El dispositivo, p. ej. su ordenador está configurado para comparar los datos proporcionados en el banco de datos basados en ordenador con los datos que representan cantidades de proteína priónica de conformación agregada generados a partir de una mezcla de muestra y proteína priónica de conformación nativa, en donde la comparación de las cantidades de proteína priónica de conformación agregada se realiza para la misma intensidad de fuerza de cizalla.

De manera generalmente preferida, todas las mezclas que contienen proteína priónica de conformación nativa y proteína priónica de conformación agregada, p. ej. muestra de referencia o muestra que se va a analizar, están en el mismo tampón acuoso, p. ej. la misma concentración de las mismas sales al mismo valor de pH y a la misma temperatura para todas las mediciones.

La proteína priónica de conformación nativa puede ser producida, p. ej., por expresión en un microorganismo o en una célula cultivada, o ser sintetizada químicamente. Preferiblemente, la proteína priónica de conformación nativa se proporciona en solución acuosa.

Después o durante el sometimiento de la mezcla o alícuotas de la misma al procedimiento, se detecta el contenido o aumento de la proteína priónica de conformación agregada. Generalmente, se prefiere detectar la cantidad de proteína priónica de conformación agregada utilizando un detector óptico, que se puede separar del generador de fuerza de cizalla para que el recipiente que contiene la proteína priónica de conformación agregada se transfiera del generador de fuerza de cizalla al detector, que puede ser, p. ej., un lector de placas. Como alternativa, el detector óptico puede estar dispuesto en el recipiente mientras el recipiente está dispuesto en el generador de fuerza de cizalla, p. ej. para la medición durante las fases de reposo de la aplicación de intensidades de fuerza de cizalla. Además o como alternativa, se puede detectar la proteína priónica en estado agregado obtenida mediante el procedimiento, opcionalmente después del contacto con proteinasa, por separación de tamaño, p. ej. cromatográficamente o electroforéticamente, opcionalmente con detección de anticuerpos, p. ej. en una transferencia Western, y/o por espectroscopía sensible a la estructura, p. ej. por espectroscopía infrarroja (IR), preferiblemente IR con transformada de Fourier (FT-IR), por RMN, especialmente RMN C¹³, y/o espectroscopía de fluorescencia, preferiblemente después de la adición de un colorante de fluorescencia que es específico para la proteína priónica de conformación agregada. Estas etapas de detección tienen la ventaja de proporcionar información relacionada con la estructura sobre la proteína priónica de estado agregado generada, especialmente después de poner en contacto la proteína priónica de conformación agregada con proteinasa debido a las diferencias en la resistencia a la proteinasa de la proteína priónica de conformación agregada.

Preferiblemente, la detección se realiza midiendo el cambio de fluorescencia de un colorante fluorescente añadido a la mezcla, siendo el colorante específico para la proteína priónica de conformación agregada. Los colorantes ilustrativos son los mencionados por Eckroat et al., citados anteriormente, p. ej. Tioflavina T, Tioflavina S, Rojo Congo, ligandos amiloideos con una base de tiofeno, tales como politiofenos conjugados luminiscentes (LCP), ácido politiofenoacético (PTAA) y oligotiofenos conjugados luminiscentes (LCO), compuesto B de Pittsburgh, sondas de 2-cianoacrílato de aminonaftaleno (ANCA), derivados de fenilbenzoxazol pegilado, Pinacianol, Crisamina G y colorantes que contienen al menos uno de los siguientes armazones: Chalcona, Flavona, Aurona, Estilbeno, Difenil-1,2,4-oxadiazol, Difenil-1,3,4-oxadiazol, Benzotiazol, Benzooxazol, Benzofurano, Imidazopiridina, Benzimidazol, Quinolina, Naftaleno.

Como alternativa, la proteína priónica de conformación nativa se puede marcar con un colorante fluorescente, p. ej. mediante la unión de un colorante fluorescente a la proteína priónica de conformación nativa directamente o por medio de un espaciador intermedio, p. ej. derivados de fluoróforos que contienen grupos químicos reactivos tales como isotiocianatos (reactivos con aminas primarias, p. ej. Lisinas), ésteres de succinilimida (reactivos con grupos amino para formar enlaces amido, p. ej. aminoácidos N-terminales), maleimida (reactiva con grupos sulfhidrilo libres, p. ej. cisteína). Tales derivados de fluoróforos incluyen cianinas, fluresceína, rodamina, Alexa Fluor, Dylight Fluor, ATTO-Tec Dyes, BODIPY Dyes, SETA Dyes, SeTau Dyes, DYOMICS Dyes.

Opcionalmente, el procedimiento puede comprender la etapa adicional de poner en contacto la mezcla después de la aplicación de la intensidad de la fuerza de cizalla con al menos un compuesto seleccionado entre Tioflavina T, Tioflavina S, Rojo Congo, ligandos amiloideos basados en tiofeno como politiofenos conjugados luminiscentes (LCP), ácido politiofenoacético (PTAA) y oligotiofenos conjugados luminiscentes (LCO), cuyos compuestos pueden tener conformación específica para la proteína priónica de conformación agregada. Esta etapa adicional opcional permite distinguir las conformaciones agregadas de la proteína priónica midiendo su fluorescencia. Puesto que algunos de estos compuestos pueden interferir con el cambio en la conformación de la conformación nativa a la agregada, al menos uno de ellos se pone en contacto con la mezcla solo después de la aplicación de la intensidad de la fuerza de cizalla. La adición de al menos uno de estos compuestos y la medición de fluorescencia resultante se almacenan en el banco de datos.

En el procedimiento que comprende la detección de la proteína priónica de conformación agregada, el dispositivo según la invención se puede utilizar como un detector de la presencia de semilla en una muestra. El dispositivo

comprende al menos un recipiente para recibir la mezcla que comprende la muestra, estando el recipiente acoplado a, o comprendiendo un generador de fuerza de cizalla, preferiblemente al menos dos recipientes con un generador de fuerza de cizalla para cada recipiente. Para la detección, cada recipiente está provisto de una fuente de irradiación y un detector óptico, preferiblemente un detector de fluorescencia, ambos dirigidos al recipiente proporcionado para recibir la mezcla de semilla y proteína priónica de conformación nativa. Por ejemplo, el dispositivo comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos recipientes para recibir una mezcla de semilla y proteína priónica de conformación nativa, cada recipiente provisto de un generador de fuerza de cizalla que se controla para generar al menos una, opcionalmente secuencialmente al menos dos fuerzas de cizalla diferentes, y provisto de un detector óptico dispuesto para recibir la luz emitida desde el recipiente y una fuente de irradiación dispuesta para irradiar el volumen interno del recipiente. De manera generalmente preferida, los recipientes están sellados. Preferiblemente, la fuente de irradiación, p. ej. un generador láser, está dispuesto con su trayectoria del haz en un ángulo de 0° en el caso del detector de absorbancia o en un ángulo igual o inferior a 180°, p. ej. entre 160° y 10° con respecto a la trayectoria de la luz dirigida al detector, p. ej. en el caso de un detector de fluorescencia o luz de dispersión.

Alternativamente, el dispositivo comprende al menos dos generadores de fuerza de cizalla, y una fuente de irradiación y un detector óptico, ambos dirigidos a un recipiente proporcionado para recibir la mezcla de semilla y proteína priónica de conformación nativa. Preferiblemente, la fuente de irradiación, p. ej. un generador láser, está dispuesto con su trayectoria del haz en un ángulo de 0° o en un ángulo de 180° o inferior a 180°, p. ej. entre 160° y 10° con respecto a la trayectoria de la luz dirigida al detector óptico.

Generalmente, el detector óptico puede ser un detector de fluorescencia o un detector de luz de dispersión o un detector de absorbancia.

Preferiblemente, el detector óptico está acoplado a un ordenador que tiene acceso a un banco de datos que contiene datos sobre cantidades determinadas previamente que son específicas para una sola intensidad de fuerza de cizalla, preferiblemente para al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes y específicas para una semilla de una fuente específica. Estos datos se proporcionan en un banco de datos en un portador de datos, especialmente en un banco de datos basado en un ordenador, y la comparación la lleva a cabo un ordenador. Preferiblemente, el banco de datos contiene el diagnóstico médico para una enfermedad neurodegenerativa específica y/o un subtipo de la misma asociado con los datos determinados previamente sobre cantidades de proteína priónica de conformación agregada, cada cantidad generada en una de al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes para cada proteína priónica de conformación nativa añadida y el diagnóstico asociado con la muestra, y preferiblemente adicionalmente la fuente o muestra específica a la que pertenece el diagnóstico. En cuanto a algunas enfermedades neurodegenerativas, la velocidad de amplificación de la proteína priónica de conformación agregada y/o la cantidad de proteína priónica de conformación agregada pueden diferir en función del momento en que se toma la muestra durante la progresión de la enfermedad, se prefiere que el banco de datos contenga información sobre la edad de inicio de la enfermedad, el sexo del mamífero, la duración de la enfermedad, la progresión y/o la gravedad de la enfermedad, preferiblemente al menos los datos sobre la enfermedad, el subtipo de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad. Esta realización se puede utilizar para generar una predicción o pronóstico de la velocidad de progresión de la enfermedad, basándose en la combinación de tipificación de semilla y cuantificación de semilla combinadas con otros datos del paciente. En consecuencia, esta información se configura en el banco de datos en una disposición de acuerdo con esta información.

La invención también se refiere al banco de datos, basado en ordenador, que contiene el diagnóstico médico para una enfermedad neurodegenerativa específica y/o un subtipo de la misma asociado con los datos determinados previamente sobre cantidades de proteína priónica de conformación agregada, datos sobre cada cantidad generada en una de al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes para cada proteína priónica de conformación nativa añadida a la muestra y al diagnóstico asociado con la muestra, y preferiblemente adicionalmente datos sobre la fuente específica o sobre la muestra a la que pertenece el diagnóstico, p. ej. tipo de material de muestra, condiciones de almacenamiento, soluciones en contacto con la muestra. En cuanto a algunas enfermedades neurodegenerativas, la velocidad de amplificación de la proteína priónica de conformación agregada y/o la cantidad de proteína priónica de conformación agregada pueden diferir en función del momento en que se toma la muestra durante la progresión de la enfermedad, se prefiere que el banco de datos contenga información sobre la edad de inicio de la enfermedad, el sexo del mamífero, la duración de la enfermedad, la progresión y/o la gravedad de la enfermedad, preferiblemente al menos datos sobre la enfermedad, el subtipo de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad. De manera adicionalmente preferida, el banco de datos contiene datos sobre el tipo de generador de fuerza de cizalla, sobre la temperatura durante la aplicación de la fuerza de cizalla, sobre el detector utilizado para detectar la cantidad de proteína priónica agregada. El banco de datos, también descrito en la presente memoria como una Base de Datos de Información de Referencia, debido a que contiene datos sobre las cantidades de proteína priónica agregada generada para las muestras de referencia, para una muestra permite la identificación de un diagnóstico al emparejar las cantidades de proteína priónica de conformación agregada generada a al menos una intensidad específica de fuerza de cizalla con los datos del banco de datos. Puesto que la presencia de un control específico o una sustancia patrón durante la generación de datos sobre las cantidades de proteína priónica agregada de una muestra o muestra de referencia es opcional pero no necesaria, el banco de datos tiene la ventaja de que los datos contenidos en él son preferiblemente datos absolutos, es decir, los datos son independientes de un control específico o sustancia patrón. En consecuencia, el procedimiento de la invención, especialmente cuando se

usa el banco de datos, también genera resultados absolutos.

Preferiblemente, el banco de datos comprende datos obtenidos por análisis secundario de la proteína priónica de conformación agregada obtenida mediante la aplicación de una intensidad de fuerza de cizalla por al menos uno de los siguientes: separación por tamaño, p. ej. cromatográficamente o electroforéticamente, opcionalmente con detección de anticuerpos, p. ej. en una transferencia Western, espectroscopía sensible a la estructura, p. ej. por espectroscopía infrarroja (IR), preferiblemente IR con transformada de Fourier (FT-IR), RMN, especialmente RMN C¹³, y/o espectroscopía de fluorescencia, preferiblemente después de la adición de un colorante de fluorescencia que es específico para la proteína priónica de conformación agregada. Opcionalmente, antes del análisis secundario, la proteína priónica en estado agregado obtenida por medio del procedimiento se puede poner en contacto con proteinasa. En esta realización, el banco de datos tiene la ventaja de contener información relacionada con la estructura sobre la proteína priónica en estado agregado generada.

En una realización preferida, el banco de datos comprende o está presente combinado con las muestras de referencia y/o la proteína priónica de conformación agregada generada a partir de la muestra de referencia, preferiblemente generada a una intensidad de fuerza de cizalla, opcionalmente al menos dos proteínas priónicas de conformación agregada, cada una generada a una intensidad de fuerza de cizalla. Preferiblemente, la proteína priónica de conformación agregada se generó a partir de la muestra de referencia en al menos dos mezclas separadas, cada una de las cuales contiene una proteína priónica de conformación nativa diferente, p. ej. uno de A β , Tau y α -Sinucleína. En esta realización, el banco de datos es adecuado para un procedimiento para analizar o escrutar al menos un compuesto para determinar su efecto sobre la generación de proteína priónica de conformación agregada a partir de una mezcla que contiene el compuesto, al menos una proteína priónica de conformación nativa y la muestra de referencia o proteína priónica de conformación agregada generada a una intensidad de fuerza de cizalla, que actúa como semilla.

El procedimiento analítico comprende la paso de comparación del contenido de la proteína priónica de conformación agregada generada por las diferentes fuerzas de cizalla con datos determinados previamente sobre el contenido de la proteína priónica de conformación agregada producida al someter la proteína priónica de conformación nativa en una mezcla con una semilla a las mismas fuerzas de cizalla. Allí, los datos determinados previamente están contenidos en el banco de datos descrito. El procedimiento para analizar la presencia de proteína priónica de conformación agregada relacionada con enfermedad en una muestra de mamífero biopsiada, que es preferiblemente un procedimiento para un análisis *in vitro* diferencial para la identificación y/o clasificación de una enfermedad relacionada con priones, comprende las etapas de a) añadir a la muestra al menos una proteína priónica de conformación nativa, b) someter la mezcla que comprende la muestra y la al menos una proteína priónica de conformación nativa obtenida en la etapa a) a al menos una intensidad de fuerza de cizalla que está controlada para que tenga una intensidad uniforme que tiene un rango de intensidad máximo de 20% de un valor de fuerza de cizalla para un número de ciclos previamente determinado de un tiempo también previamente determinado de acción de fuerza de cizalla y una fase de reposo previamente determinada, y c) después de la etapa b), determinar el contenido de proteína priónica de conformación agregada para cada una de las intensidades de fuerza de cizalla, que comprende la etapa de d) compara el contenido de proteína priónica de conformación agregada determinada en la etapa c) con los datos determinados previamente sobre el contenido de proteína priónica de conformación agregada, cuyo contenido se determinó para la proteína priónica de conformación nativa en una mezcla con una muestra de referencia sometida a la misma intensidad de fuerza de cizalla que en la etapa b), en donde estos datos se proporcionan en un banco de datos que contiene, asociado con estos datos, el diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa para el paciente del que se origina la muestra de referencia. Allí, la etapa de comparación del contenido de proteína priónica de conformación agregada determinado para la muestra de mamífero biopsiada en una mezcla con al menos una proteína priónica de conformación nativa con los datos del contenido de la proteína priónica de conformación agregada previamente determinado para una muestra de referencia en una mezcla con al menos una proteína priónica de conformación nativa, cada una al mismo valor de fuerza de cizalla controlada, permite asignar el diagnóstico asociado con los datos determinados previamente a la muestra de mamífero biopsiada.

Opcionalmente, tanto para la muestra como para los datos determinados previamente, el contenido de la proteína priónica de conformación agregada generada por la aplicación de una intensidad de fuerza de cizalla se puede determinar como la velocidad de formación de la proteína priónica de conformación agregada. Esta velocidad de generación de proteína priónica de conformación agregada mediante la aplicación de una intensidad de fuerza de cizalla se puede determinar, p. ej. midiendo la proteína priónica de conformación agregada después de la fase de reposo de cada ciclo y/o midiendo continuamente la proteína priónica de conformación agregada durante la aplicación de la fuerza de cizalla. En consecuencia, el detector está preferiblemente acoplado a un ordenador que está configurado para la determinación de la velocidad de generación de proteína priónica de conformación agregada a partir de señales de medición. También en esta realización, el banco de datos está configurado preferiblemente para almacenar datos determinados previamente sobre la velocidad de amplificación de la proteína priónica de conformación agregada en función de la intensidad de la fuerza de cizalla aplicada y para almacenar con respecto a esto, los datos sobre el diagnóstico dado para el paciente del que se origina la muestra utilizada para la determinación previa.

La velocidad de formación de proteína priónica de conformación agregada, el contenido original de proteína priónica

de conformación agregada en la muestra y/o la velocidad de disociación de la proteína priónica de conformación agregada se pueden determinar, especialmente de manera separada para cada intensidad de fuerza de cizalla.

La formación de una proteína priónica de conformación agregada a una intensidad de fuerza de cizalla específica se determina mediante la concentración inicial de proteína priónica de conformación agregada ($p_{t=0}$), la velocidad cinética de incorporación de proteína priónica de conformación nativa a la proteína priónica de conformación agregada (k_+) a una fuerza de cizalla específica, la velocidad cinética de disociación de proteína priónica de conformación nativa (k_d) de la proteína priónica de conformación agregada, y mediante la concentración inicial de la proteína priónica de conformación nativa presente en la mezcla ($m_{t=0}$). La cantidad total de señal de detección determinada para el contenido de proteína priónica en estado agregado (F), p. ej., la fluorescencia total, se determina mediante la señal de detección específica de la proteína priónica de conformación agregada (f_s). El parámetro $p_{t=0}$ se determina mediante la cantidad original de una proteína priónica de conformación agregada presente en una muestra de mamífero y mediante la razón de mezcla de la muestra del paciente con la solución de proteína priónica de conformación nativa. Los parámetros k_+ , k_d y f_s son propiedades químicas de la proteína priónica de conformación agregada. El parámetro $m_{t=0}$ está determinado previamente por las condiciones de los ensayos específicos.

El cambio de contenido de una proteína priónica de conformación agregada (dp) a lo largo del tiempo (dt) a una intensidad de fuerza de cizalla específica y en un punto temporal específico se determina por medio de estos parámetros y por medio de la concentración presente de proteína priónica de conformación agregada (p) y la concentración presente de proteína priónica de conformación nativa (m). Esto se resume por medio de la ecuación 1. (Ec. 1):

$$\frac{dp}{dt} = k_+ \cdot p \cdot m - k_d \cdot p \quad \text{Ec. 1}$$

Por ejemplo, el cambio de Fluorescencia de tioflavina T (dF_{sim}) a lo largo del tiempo (dt) a una intensidad de fuerza de cizalla específica y en un punto temporal específico se determina por medio de los parámetros mencionados anteriormente y por medio de la concentración presente de proteína priónica de conformación agregada (p) y la concentración presente de proteína priónica de conformación nativa (m). Esto se resume por medio de las ecuaciones 2 y 3 (Ec. 2, Ec. 3):

$$\frac{dF_R}{dt} = f_s \cdot (dp/dt) \quad \text{Ec. 2}$$

$$\frac{dF_R}{dt} = f_s \cdot (k_+ \cdot p \cdot m - k_d \cdot p) \quad \text{Ec. 3}$$

Los parámetros $p_{t=0}$, k_+ , k_d y f_s son variables independientes que se utilizan para aproximar la señal observada para el contenido de proteína priónica de conformación agregada, p. ej. la cantidad de fluorescencia, en el momento de inicio de la reacción y en el momento de fluorescencia máxima ($F_{\text{obs}}(t)$) por medio de un análisis de regresión no lineal (R) utilizando soluciones numéricas o explícitas de la Ec. 3. El análisis de regresión no lineal minimiza la desviación de la fluorescencia aproximada ($F_R(t)$) a partir de la fluorescencia observada ($F_{\text{obs}}(t)$). Los resultados del análisis de regresión son valores aproximados para los parámetros $p_{t=0}$, k_+ , k_d y f_s en donde K_+ es específica para una intensidad de fuerza de cizalla. Preferiblemente, los valores obtenidos para $p_{t=0}$, k_+ , k_d y f_s se pueden asociar a estados de enfermedad específicos en el banco de datos, y se pueden utilizar, p. ej. para discriminar las personas sanas de las enfermas. Preferiblemente, los valores $p_{t=0}$, k_+ , k_d y f_s que se determinan a partir de la señal resuelta en el tiempo observada para el contenido de proteína priónica de conformación agregada a al menos una intensidad de fuerza de cizalla son parte del contenido determinado de proteína priónica de conformación agregada para cada una de las intensidades de fuerza de cizalla para la mezcla de la muestra y la al menos una proteína priónica de conformación nativa y para los datos determinados previamente de la mezcla de la muestra de referencia y la al menos una proteína priónica de conformación nativa. Por lo tanto, en el procedimiento, el contenido de proteína priónica de conformación agregada se determina preferiblemente de una manera dependiente del tiempo mientras se somete la mezcla a una intensidad de fuerza de cizalla, p. ej. se determina como el contenido resuelto en el tiempo, y la velocidad de formación de proteína priónica de conformación agregada se determina mediante análisis de regresión no lineal a partir de una aproximación en el contenido resuelto en el tiempo determinado de proteína priónica de conformación agregada para cada una de las intensidades de fuerza de cizalla.

Las proteínas priónicas ilustrativas son las proteínas que en su conformación de estado agregado causan o están presentes en las siguientes enfermedades, indicando las secuencias de aminoácidos preferidas de la proteína priónica: Scrapie en ovejas (proteína priónica celular PrP^C, proteína priónica principal, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P23907>), encefalitis espongiforme bovina en ganado vacuno (proteína celular priónica PrP^C, proteína priónica principal, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P10279>), enfermedad crónica por emaciación en venados y alces (proteína priónica celular PrP^C, proteínas priónicas principales, accesibles en ciervos negros: <http://www.uniprot.org/uniprot/P47852>, ciervos rojos: <http://www.uniprot.org/uniprot/P67987>, ciervo almizclero alpino: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q68G95>), y la enfermedad de Creutzfeld-Jacob, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (proteína priónica celular PrP^C, incluidas las proteínas mutantes de las mismas), insomnio familiar fatal en seres humanos (proteína priónica), en donde la enfermedad priónica en seres humanos, incluida la enfermedad de Creutzfeld Jacob, el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSD), el insomnio familiar fatal (FFI) (proteína priónica principal, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P04156>), GSD y FFI se asocian

exclusivamente con variantes familiares, CJD se puede asociar con variantes familiares, enfermedad de Alzheimer (beta amiloide, A β , especialmente A β de 40 (A β 40) o 42 (A β 42) aminoácidos, incluidas las proteínas mutantes del mismo), especialmente la enfermedad de Alzheimer o la angiopatía amiloide cerebral en seres humanos (proteína beta amiloide (A β) A4, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P05067>, especialmente las secuencias parciales de la proteína beta-amiloide 42, y la proteína beta-amiloide 40, y también variantes familiares de la proteína A4), enfermedad de Alzheimer (tau y/o α -sinucleína de ser humano, ratón o rata, p. ej., alfa-sinucleína humana accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P37840>, alfa-sinucleína de ratón accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/O55042>, alfa-sinucleína de rata accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P37377>, tau humana, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P10636> y las secuencias de tau correspondientes de ratones y ratas, accesibles en <http://www.uniprot.org/uniprot/P35637>), Alzheimer en ratón o rata (A β de ratón accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P12023>; A β de rata accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P08592>, y tau accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P35637> y α -sinucleína de ratón, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/O55042>, alfa-sinucleína de rata accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P37377>), Parkinson (alfa-sinucleína) y α -sinucleopatías en seres humanos (alfa-sinucleína humana) accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P37840>), enfermedad de Parkinson y α -sinucleopatías en modelos de enfermedad murina (alfa-sinucleína accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/O55042>) y enfermedad de Parkinson y sinucleopatías en modelos de enfermedad de rata (alfa-sinucleína accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P37377>), demencia lobular frontotemporal (TDP-43, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13148>), demencia lobular frontotemporal (tau, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P10636>), y las secuencias de tau correspondientes de ratones y ratas, demencia lobular frontotemporal (FUS, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P35637>), y secuencias de FUS correspondientes de ratones y ratas, Esclerosis Lateral Amiotrófica (SOD1, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P00441>), Esclerosis Lateral Amiotrófica (TDP-43, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13148>), Diabetes Mellitus Tipo 2 (amilina, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P10997>), Corea de Huntington (Huntingtina humana accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P42858>, que contiene especialmente expansiones poli-Q entre las posiciones de la secuencia de aminoácidos 18 y 38), carcinoma medular de tiroides (calcitonina, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P01258>), arritmias cardíacas, amiloidosis auricular aislada (factor natriurético auricular, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P01160>), aterosclerosis (apolipoproteína A, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P02647>), artritis reumatoide (amiloide sérico A, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P0DJ18>), amiloide medial aórtico (medina, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/Q08431>), prolactinomas (prolactina), polineuropatía amiloide familiar (transtiretina, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P02766>), amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria (lisozima, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P61626>), amiloidosis relacionada con diálisis (beta-2-microglobulina, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P61769>), amiloidosis de tipo finlandés (gelsolina, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P06396>), distrofia corneal reticular (queratoepitelina, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/Q15582>), angiopatía amiloide cerebral (beta-amiloide), también del tipo islandés (cistatina, accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P01034>), amiloidosis sistémica AL (cadena ligera de inmunoglobulina AL), miositis por cuerpos de inclusión esporádica (S-IBM), tauopatías que implican la aglomeración de la proteína tau (proteína tau humana accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P10636>), Tauopatías que implican la aglomeración de la proteína tau en modelos de enfermedad murina (proteína tau de ratón accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P10637>), Tauopatías que implican aglomeración de proteína tau en modelos de enfermedad de rata (proteína de tau de rata accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P19332>). En la presente memoria, la proteína tau incluye isoformas, especialmente isoformas como las descritas por Barghorn et al. (loc. cit.), tau23 humana de 352 aminoácidos, que carece de los insertos N-terminales I1 e I2 entre E45 y A103 y que carece de R2 entre V275 y V306, tau37 humana de 381 aminoácidos, que carece del inserto N-terminal I2 entre D74 y A103 y que carece de R2 entre V275 y V306, tau39 humana de 410 aminoácidos, que carece de R2 entre V275 y V306, tau24 humana de 383 aminoácidos, que carece de los insertos N-terminales I1 e I2 entre E45 y A103, tau34 humana de 412 aminoácidos, que carece de inserto N-terminal I2 entre D74 y A103, tauK19 humana de 98 aminoácidos que contiene los aminoácidos Q244 a E372, pero que carece de R2 entre V275 y V306, tauK18 humana que contiene los aminoácidos Q244 a E372, cada una en comparación con tau40 humana de 441 aminoácidos (isoforma F de tau humana accesible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P10636#P10636-8>).

Las secuencias de aminoácidos son accesibles en bancos de datos de proteínas, p. ej. en Uniprot. La secuencia de aminoácidos de la proteína priónica utilizada en el procedimiento de la invención puede tener opcionalmente una sección de aminoácidos sintética o natural añadida, p. ej. una etiqueta detectable.

Un dispositivo preferido para su uso en el procedimiento comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos generadores de fuerza de cizalla separados, cada uno controlado para aplicar una intensidad de fuerza de cizalla a la mezcla de muestra y proteína priónica de conformación nativa.

Puesto que el banco de datos contiene las cantidades de proteína priónica de conformación agregada producida a partir de muestras de referencia para al menos dos intensidades específicas de fuerza de cizalla asociadas con al menos la enfermedad, el procedimiento se puede llevar a cabo opcionalmente sin un control positivo que contenga un tipo conocido y/o una cantidad conocida de proteína priónica de conformación agregada, y/o sin un control negativo que no contenga semilla, es decir, solo proteína priónica de conformación nativa.

La invención se describe ahora con mayor detalle a modo de ejemplos con referencia a las figuras que se muestran en

- Figuras 1 a 6, mediciones de fluorescencia específicas para la amplificación de la conformación agregada de la proteína priónica a diferentes intensidades de fuerza de cizalla para muestras de diagnóstico conocido,
- 5 - Figuras 7-10, mediciones de fluorescencia específicas para la amplificación de la conformación agregada de la proteína priónica a diferentes intensidades de fuerza de cizalla para muestras de cerebro post mortem,
- Figura 11, una descripción esquemática de una realización del procedimiento,
- Figura 12, una descripción esquemática de una realización del procedimiento,
- 10 - Figura 13, una sección transversal esquemática de un dispositivo preferido para su uso en el procedimiento,
- Figura 14, una vista esquemática en despiece del dispositivo de la Figura 13,
- Figura 15, una vista esquemática de un dispositivo,
- Figura 16, una vista esquemática de una realización del dispositivo.
- Figura 17, una sección transversal esquemática a lo largo de la línea A1 de la Figura 16, y
- 15 - Figura 18, una sección transversal esquemática a lo largo de la línea A2 de la Figura 17.

Ejemplo: Amplificación de la conformación de estado agregado a diferentes intensidades de fuerza de cizalla

Como muestra, se utilizó una porción de 1:50 volúmenes de producto homogeneizado de cerebro y se mezcló con 2 mg/ml de alfa-sinucleína como proteína priónica de conformación nativa. El producto homogeneizado de cerebro se preparó mediante homogeneización en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría que contenía Triton X-100 al 0,5% y 1 x cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA completo (Roche, Núm. de Cat. 11873580001) utilizando 20 carreras con un homogenizador Dounce en hielo. Las muestras de cerebro eran post mortem de un control sano (NEG.) y cuatro pacientes con enfermedad de sinucleopatía diferentes: Enfermedad de Parkinson Idiopática (IPD), Enfermedad de Parkinson con Demencia (PDD), Demencia con Cuerpos de Lewy (DLB), Atrofia Multisistémica (MSA). La suspensión se aclaró por centrifugación a 2000 x g durante 45 segundos, y se utilizó el sobrenadante.

Como otra muestra, se mezclaron 360 µl de líquido cefalorraquídeo humano (LCR), almacenados a -80°C, con 40 µl de 10 x PBS frío que contenía Triton X-100 al 0,5% y 1 x cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA completo y se aclarificaron por centrifugación a 2000 xg durante 45 s, proporcionando el sobrenadante como extracto de líquido cefalorraquídeo humano (ELCR). En este ejemplo, la muestra de LCR era post-mortem del mismo paciente de enfermedad de Parkinson con demencia (PDD) que se utilizó anteriormente.

La proteína priónica de conformación nativa era alfa-sinucleína humana expresada recombinantemente de aprox. 5,0 mg/ml de agua, almacenada a -80°C y descongelada a 37°C con agitación muy suave. La concentración de proteína se ajustó a 2,22 mg/ml utilizando agua filtrada estéril y 13,5 ml de la misma se mezclaron con 1,5 ml de 10 x PBS concentrado para producir 2,0 mg/ml de alfa-sinucleína humana en PBS.

En hielo, se combinaron 15 ml de alfa-sinucleína humana de 2,0 mg/ml en PBS con 300 µl de sobrenadante de producto homogeneizado de cerebro, o alternativamente con 300 µl de ELCR. De esta mezcla, doce alícuotas idénticas de 1,2 ml cada una se cargaron en tubos de ensayo de polipropileno sellados de 1,5 ml (SureLock, Eppendorf). En cada tubo de ensayo, se insertó un dispositivo de cizalla rotativo que tenía un rotor de 2,00 mm dentro de un tubo con un ancho de espacio de 0,30 mm. Estos conjuntos se incubaron a 37°C durante 15 min. La fuerza de cizalla se aplicó haciendo girar los rotores con control de la velocidad de rotación hasta un máximo de 1% de la velocidad establecida durante 5 s con una fase de reposo posterior de 295 s durante un total de 22 h. Las velocidades de rotación utilizadas se indican en las Figuras 1 a 9. Generalmente, el dispositivo correspondía al documento WO 2012/110570.

Se tomaron muestras de 20 µl de cada mezcla de reacción a tiempo 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, y a las 22 h bajo fuerza de cizalla. La amplificación de la conformación de estado agregado se determinó mediante espectroscopía de fluorescencia de 15 µl de la muestra tomada después de mezclar con 135 µl de solución de partida de tioflavina T (solución de tioflavina 30 µM en tampón PBS) con excitación a 450 nm (ancho de banda 10 nm) y detección a 482 nm (ancho de banda 20 nm).

Las muestras de cerebro provienen de pacientes diagnosticados de los siguientes síndromes de Parkinson:

Enfermedad de Parkinson idiopática (IPD), ICD-10: G20

Demencia en la enfermedad de Parkinson (PDD), ICD-10: G20, F02.3

Atrofia Multisistémica (MSA), ICD-10: G90.3:

Demencia con Cuerpos de Lewy (DLB), ICD-10: G31.8, F02.3

Control Sano (NEG.),

y la muestra de LCR proviene de paciente diagnosticado de

5 Demencia en la enfermedad de Parkinson (PDD), ICD-10: G20, F02.3

Para el diagnóstico, se utilizaron los códigos ICD-10 (disponibles en www.ICD-code.de, en

<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#>, en

<http://www.who.int/classifications/icd/en/>, y en

<http://www.who.int/classifications/icd/en/GRNBOOK.pdf>.

10 En detalle, la demencia F00 en la enfermedad de Alzheimer: la enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad cerebral degenerativa primaria de etiología desconocida con rasgos neuropatológicos y neuroquímicos característicos. El trastorno suele ser de inicio insidioso y se desarrolla de manera lenta pero constante durante un período varios años. Asociado con el depósito de semilla de proteína abeta, proteína tau y, a veces, proteína sinucleína

15 F00.0*, G30.0*: Demencia en la enfermedad de Alzheimer con inicio temprano. Demencia en la enfermedad de Alzheimer con inicio antes de los 65 años, con un curso de deterioro relativamente rápido y con marcados trastornos múltiples de las funciones corticales superiores. Incluye: (i) enfermedad de Alzheimer, tipo 2; (ii) Demencia presenil, tipo Alzheimer; (iii) Demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, inicio presenil.

20 F00.1*, G30.1*: Demencia en la enfermedad de Alzheimer con inicio tardío. Demencia en la enfermedad de Alzheimer con inicio después de los 65 años, generalmente a fines de los 70 o posteriormente, con una progresión lenta y con deterioro de la memoria como característica principal. Incluye (i) enfermedad de Alzheimer, tipo 1; (ii) Demencia degenerativa primaria de tipo Alzheimer, inicio senil; (iii) Demencia senil, tipo Alzheimer.

25 F00.2*, G30.8*: Demencia en la enfermedad de Alzheimer, tipo atípico o mixto. Demencia atípica, tipo Alzheimer

F00.8, G30.9: Demencia en la enfermedad de Alzheimer, no especificada

F02 Demencia en otras enfermedades clasificadas en otra parte. Casos de demencia debidos, o presuntamente debidos, a causas distintas a la enfermedad de Alzheimer o enfermedad cerebrovascular. El inicio puede ser en cualquier momento de la vida.

30 F02.0*, G31.0*: Demencia en la enfermedad de Pick (Demencia lobular Frontotemporal, FTD). Una demencia progresiva, que comienza en la mediana edad, caracterizada por cambios tempranos y lentamente progresivos de carácter y deterioro social, seguidos por deterioro del intelecto, la memoria y las funciones del lenguaje, con apatía, euforia y, en ocasiones, fenómenos extrapiramidales.

35 F02.2*, G10*: Demencia en la enfermedad de Huntington (HD). Una demencia que ocurre como parte de una degeneración generalizada del cerebro. El trastorno se transmite por un solo gen autosómico dominante. Los síntomas suelen surgir en la tercera y cuarta décadas. La progresión es lenta, lo que lleva a la muerte por lo general en el plazo de 10 a 15 años. Incluye: demencia en corea de Huntington

40 F02.3*, G20*: Demencia en la enfermedad de Parkinson (PDD): demencia que se desarrolla en el curso de la enfermedad de Parkinson establecida. Aún no se han demostrado características clínicas distintivas particulares. Incluye (i) Hemiparkinsonismo, (ii) Parálisis agitante, (iii) Parkinsonismo o enfermedad de Parkinson (NOS (no especificada de otra manera), idiopática, primaria)

45 F02.3*, G31.82: Demencia con cuerpos de Lewy (DLB), Enfermedad de cuerpos de Lewy (LBD). Una demencia degenerativa progresiva. Las personas con LBD mostrarán una cognición marcadamente fluctuante. Las alucinaciones visuales persistentes o recurrentes con imágenes vívidas y detalladas son a menudo un síntoma diagnóstico temprano.

A81 Infecciones por virus atípicos del sistema nervioso central. Enfermedades por priones del sistema nervioso central.

50 A81.0*, F02.1*. Demencia en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Una demencia progresiva con signos neurológicos extensos, debido a cambios neuropatológicos específicos que se supone que son causados por un agente transmisible. El inicio suele ser en la mediana edad o más tarde, pero puede ser a cualquier edad

adulta. El curso es subagudo y conduce a la muerte en uno o dos años.

A81.8: Otras infecciones virales atípicas del sistema nervioso central: Kuru

A81.9: infección por virus atípico del sistema nervioso central, sin especificar: enfermedad priónica del sistema nervioso central.

5 Amiloidosis:

168.0* Angiopatía amiloide cerebral (E85.-+)

[Con posibilidad de ampliación]

Síndromes de Parkinson:

G20: Enfermedad de Parkinson Idiopática (IPD)

10 G20, F02.3: Demencia en la enfermedad de Parkinson (PDD)

G90.3: Atrofia Multisistémica (MSA)

G31.8, F02.3: Demencia con cuerpos de Lewy (DLB)

Enfermedad de la neurona motora:

15 G12.2: Enfermedad de la neurona motora: incluye (i) Enfermedad de la neurona motora familiar y (ii) Esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Las Figuras 1-6 muestran la fluorescencia detectada en 3 repeticiones independientes de los ejemplos. En la Fig. 1, la muestra fue BN449-PDD, en la Fig. 2 BN379-IPD, en la Fig. 3 BN175-MSA, en la Fig. 4 BN526-DLB, en la Fig. 5 BN449-PDD LCR total, y en la Fig. 6 BN276 Control Sano.

20 Los resultados muestran que en el control sano (NEG), no se generó proteína priónica de conformación agregada. Todas las muestras de los pacientes diagnosticados de síndromes de Parkinson dieron como resultado la generación de amplificación que dependía de la intensidad de la fuerza de cizalla (velocidad de rotación, tiempo de aplicación, tiempo de descanso y número de ciclos) y dependiente del origen de la muestra. El procedimiento fue altamente reproducible en tres experimentos independientes realizados en los mismos tejidos cerebrales.

25 En las Figuras 1-10, las intensidades de fuerza de cizalla se proporcionan como rpm del generador rotativo de fuerza de cizalla en el eje X, las cantidades de proteína priónica de conformación agregada detectada se proporcionan en el eje Y con las curvas individuales proporcionadas para los puntos temporales indicados a la derecha (h de aplicación de intensidades de fuerza de cizalla).

30 En las Figuras 1-4 y 6, se representa el contenido de la proteína priónica de conformación agregada generada en una aplicación determinada previamente de una intensidad de fuerza de cizalla cada una, mostrando un patrón específico de amplificación para cada muestra para las intensidades de fuerza de cizalla. En la Fig. 5, se representan el contenido de la proteína priónica de conformación agregada a las 0h, y generada a las 3h, 9h y 12h, respectivamente, mostrando las diferentes velocidades de amplificación a diferentes intensidades de fuerza de cizalla. Por lo tanto, para el procedimiento de la invención, generalmente se prefiere que la intensidad de la fuerza de cizalla esté determinada previamente y la sea misma para la muestra y para los contenidos determinados previamente, p. ej. la intensidad de la fuerza de cizalla generalmente se puede determinar previamente para la fuerza de cizalla aplicada, la duración de la aplicación de la fuerza de cizalla, la duración de la fase de reposo para cada ciclo y el número de ciclos de repetición.

35 Los resultados muestran que el procedimiento de la invención diferencia entre muestras de diferentes patologías y entre subtipos, p. ej. presentación de enfermedad específica de pacientes individuales.

40 Las Figuras 7-9 muestran resultados para las mismas condiciones de procedimiento para muestras de cerebro post mortem (BN), en donde los números designan muestras individuales. A diferencia de las muestras de las Figuras 1-6, el estado de enfermedad de los pacientes de quienes se originan las muestras de las Figuras 7-9 es desconocido para las personas involucradas en la realización del procedimiento analítico. En estas Figuras, se indica el contenido de proteína priónica agregada generada en diferentes puntos temporales.

45 Los resultados representados en las Figuras 7-9 muestran que la amplificación varía mucho entre muestras y entre los puntos temporales de aplicación de la fuerza de cizalla.

50 La Figura 10 muestra la cantidad de proteína priónica de conformación agregada de una mezcla de una muestra post mortem de un cerebro determinado histológicamente como Alzheimer y α -sinucleína humana como proteína priónica de conformación nativa. El resultado indica que la muestra de Alzheimer que se diagnosticó que contenía agregados de proteína $\text{A}\beta$ y tau cuando se sometió a intensidades específicas de fuerza de cizalla no indujo

significativamente la generación de proteína priónica de conformación agregada a partir de la sinucleína α de conformación nativa. Estos resultados demuestran que, al menos para esta muestra de Alzheimer, la generación de proteína priónica de conformación agregada a partir de una proteína priónica de conformación nativa es específica para la muestra.

5 Una comparación de la amplificación de la proteína priónica agregada a intensidades de fuerza de cizalla únicas, es decir, para diferentes velocidades de rotación en los mismos ciclos durante un total de 22 h, permite identificar patrones similares de amplificación, preferiblemente una identificación de la muestra desconocida según las similitudes de patrón de amplificación generado a partir de una muestra de diagnóstico conocido. En este procedimiento, la muestra de diagnóstico conocido sirve como muestra de referencia.

10 En detalle, las muestras de las Figs. 8 y 9 muestran un patrón de amplificación similar a intensidades específicas de fuerza de cizalla (22h) como la muestra de IPD de la Fig. 2.

Por lo tanto, se supone que el procedimiento puede diferenciar las muestras según la progresión de la acumulación de proteína priónica agregada durante la enfermedad.

15 La Fig. 11 muestra esquemáticamente una visión general del procedimiento de análisis. Las muestras de referencia, p. ej. muestras de tejido cerebral post mortem, suero, LCR u orina, cada una asociada con el diagnóstico específico de una enfermedad neurodegenerativa, se proporcionan como una biblioteca de semillas de referencia (Biblioteca de Semillas de Referencia). En la biblioteca, las muestras de referencia se pueden asignar a la proteína priónica respectiva, representada por alfa-sinucleína (α -Sin), tau (Tau) o beta amiloide (A β). Para las muestras de referencia, los datos determinados previamente sobre las cantidades de proteína priónica de conformación agregada se generan mediante la aplicación de intensidades específicas de fuerza de cizalla (SSA) a partir de una mezcla que contiene una muestra de referencia y proteína priónica de conformación nativa. La medición puede ser mediante determinación óptica de las cantidades de proteína priónica de conformación agregada en transferencias Western o utilizando un detector óptico que recibe irradiación de la mezcla. Como se indica por medio de las flechas dobles entre la Biblioteca de Semillas de Referencia y la Base de Datos de Información de Referencia del banco de datos, los datos sobre las cantidades detectadas (Perfiles de Amplificación) de la proteína priónica de conformación agregada con respecto a cada intensidad de fuerza de cizalla se almacenan en un ordenador y se almacenan en un banco de datos (Biblioteca de Semillas de Referencia) asociados con el diagnóstico específico respectivo (Enfermedad, IPD, PDD, MSA, DLB, FTD, EA), que preferiblemente incluye al menos un subtipo (G20, F02.3, G90.3, G31.82, G31.0, F00.0, G30.0, G30.1, G30.8, G30.9) según una clasificación (ICD10). Por lo tanto, el banco de datos (Base de Datos de Información de Referencia) para cada muestra de referencia (Información de Muestra) asociado con la enfermedad específica, preferiblemente su subtipo, para la proteína priónica de conformación nativa utilizada (A β , Tau, α -Sin) contiene las cantidades de proteína priónica de conformación agregada para cada intensidad de fuerza de cizalla (Perfiles de Amplificación).

30 Como se indica mediante las flechas dobles entre el Proceso de Diagnóstico y la Biblioteca de Semillas de Referencia, las muestras de pacientes se pueden integrar en las muestras de referencia (Biblioteca de Semillas de Referencia) una vez que se conoce el diagnóstico asociado a la muestra.

35 Como se prefiere generalmente, la muestra que se va a analizar (Muestra del Paciente) mezclada con la misma proteína priónica de conformación nativa (mezclas separadas para cada una de α -Sin, Tau y A β) como al menos una muestra de referencia de la Biblioteca de Semillas de Referencia se somete a la misma al menos intensidad de fuerza de cizalla (SSA) y se miden las cantidades de proteína priónica de conformación agregada. De manera generalmente preferida, la muestra que se va a analizar es del mismo tipo que la muestra de referencia, p. ej. suero sanguíneo, líquido linfático, orina, LCR o una muestra de tejido.

40 La cantidad de proteína priónica de conformación agregada generada a intensidades específicas de fuerza de cizalla generada para una muestra (muestra de paciente) se compara con la cantidad de proteína priónica de conformación agregada generada a las mismas intensidades de fuerza de cizalla para la misma proteína priónica de conformación nativa (A β , Tau, α -Sin) cada una (Ordenador), lo que permite la identificación (Diagnóstico) del diagnóstico asociado a la muestra de referencia en el banco de datos (Base de Datos de Información de Referencia) mediante esta comparación.

45 La Fig. 12 además de la Fig. 11 muestra que, preferiblemente para cada aplicación de una intensidad de fuerza de cizalla además de una muestra que se va a analizar (Paciente), solo se puede utilizar opcionalmente proteína priónica nativa, es decir, sin semilla (Control negativo) y una muestra de referencia (Semilla de Referencia) como control positivo en el procedimiento en paralelo a la muestra. La muestra de referencia puede tomarse, p. ej. de la Biblioteca de Semillas de Referencia. En general, la muestra de referencia puede ser una proteína priónica de conformación agregada producida mediante la aplicación de una intensidad de fuerza de cizalla a una mezcla de una muestra de paciente de enfermedad conocida con proteína priónica de conformación nativa, preferiblemente seguida de al menos una aplicación adicional de la misma intensidad de fuerza de cizalla a una mezcla de una alícuota del producto resultante con la misma proteína priónica de conformación nativa.

50 Adicionalmente, la Fig. 12 muestra que preferiblemente para cada aplicación de una intensidad de fuerza de cizalla a

una muestra o muestra de referencia, se almacena al menos uno de los siguientes datos: el generador de fuerza de cizalla específico o su impulsor D, que incluye preferiblemente la frecuencia generada por su impulsor D, el tipo de tapa L, el tipo de compartimento de muestra S, p. ej. que comprende la tapa L, el termostato T y el detector óptico O, la temperatura actual y/o el elemento de control de temperatura específico T y/o el tipo y/o el detector óptico específico O, incluidos los datos de medición óptica, se almacenan, p. ej. utilizando una interfaz (Interfaz de ordenador) acoplada a cada generador de fuerza de cizalla del dispositivo y acoplada al ordenador (ordenador) para transmitir los datos. Como se prefiere adicionalmente, la Fig. 12 muestra que para medir la cantidad de proteína priónica de conformación agregada, el ordenador está configurado para almacenar la temperatura, el curso del tiempo (Temporización, t), el generador de fuerza de cizalla (Impulsor, D) y el detector óptico (Óptico, O) para cada aplicación de una intensidad de fuerza de cizalla, que incluye preferiblemente el almacenamiento del curso temporal de las cantidades detectadas de proteína priónica de conformación agregada, p. ej. en forma de perfiles de amplificación para cada proteína priónica de conformación nativa en una mezcla utilizando, p. ej. un programa para almacenar estos datos (Soporte Lógico del Dispositivo). Adicionalmente, el dispositivo comprende opcionalmente un programa (Soporte Lógico de Evaluación) para generar a partir de estos datos, que se miden y almacenan durante la aplicación de al menos una intensidad de fuerza de cizalla, las cantidades de proteína priónica de conformación agregada, cada una para la combinación de proteína priónica de conformación nativa específica de la mezcla ($\text{A}\beta$, Tau, α -Sin), con los valores medidos para la intensidad de la fuerza de cizalla, la temperatura, el curso de tiempo de aplicación de la intensidad de la fuerza de cizalla, el generador específico de la fuerza de cizalla y/o la óptica específica, p. ej. detector. El soporte lógico de evaluación tiene acceso al banco de datos. El dispositivo contiene o tiene acceso al banco de datos que comprende cantidades determinadas previamente de proteína priónica de conformación agregada generada al menos a una intensidad de fuerza de cizalla para las muestras de referencia (Base de Datos de Información de Referencia), y el ordenador está configurado para comparar los perfiles de amplificación generados para muestras para cada intensidad de fuerza de cizalla (flechas dobles entre el Ordenador y la Base de Datos de Información de Referencia), lo que permite la asociación de una enfermedad, preferiblemente incluyendo su subtipo, almacenada para una muestra de referencia a la muestra analizada. El ordenador está configurado opcionalmente para editar este diagnóstico (Diagnóstico).

Las Figuras 13 y 14 muestran secciones transversales de un generador de fuerza de cizalla preferido para su uso en la invención. Por medio de una conexión 1, p. ej. una línea de transferencia de datos a un ordenador (no mostrado), una unidad de control de impulsión 2 es controlada por el ordenador. La unidad de control de impulsión 2 controla el motor de impulsión 3 a una frecuencia de rotación uniforme. La unidad de control de impulsión 2 y el motor de impulsión 3 también se pueden denominar impulsor D. El rotor 9 está dispuesto en un eje 9a que está conectado al motor de impulsión 3 por medio de un acoplamiento 4, que preferiblemente es un acoplamiento magnético. El rotor 9 está dispuesto dentro de un recipiente 8 y un estator 10 está dispuesto entre el rotor 9 y el recipiente 8. El estator 10 está dispuesto con un espacio para el rotor 9, que preferiblemente es un espacio uniforme para la superficie radial exterior del rotor 9, p. ej. formando un canal de sección transversal en forma de anillo, y el estator 10 está dispuesto con una separación del recipiente 8. Preferiblemente, el estator 10 está montado sobre la sección de tapa L, que también contiene un cojinete para el eje 9a. Opcionalmente, la sección de tapa L contiene el motor de impulsión 3 y la unidad de control de impulsión 2. El estator 10 tiene preferiblemente extensiones 10e opuestas al eje 9a que porta el rotor 9, cuyas extensiones 10e forman un embudo que tiene una entrada 10i y reduce el volumen interior libre del recipiente 8 en la región entre el extremo del rotor 9 opuesto al eje 9a y el recipiente 8. La entrada 10i del estator 10 está preferiblemente dispuesta coaxialmente al rotor 10 y forma la salida estrecha del embudo formado por las extensiones 10e, que guían el líquido a la sección de la superficie frontal de rotor 9, que permite una acción de bombeo por el rotor 9 para mover el líquido dentro del espacio entre la superficie radial del rotor 9 y el estator 10. Frente a la entrada 10i, la abertura de salida 10o tiene al menos la sección transversal del espacio entre el rotor 9 y estator 10.

El recipiente 8 proporcionado para recibir una muestra 20 está dispuesto dentro de una carcasa 7, que preferiblemente al menos en sección es un termostato T, preferiblemente que tiene forma ajustada al recipiente 8. Preferiblemente, el termostato T para cada recipiente 8 tiene un sensor de temperatura y es controlado independientemente por ordenador. El extremo abierto del recipiente 8 está cerrado por una tapa 6 y un sello 5. Como se muestra, se proporciona la sección de la carcasa 7 que abarca la sección del recipiente 8 entre las extensiones 10e del estator 10 y el fondo del recipiente 8 opuesto a su abertura con una fuente de luz 17 dispuesta para irradiar el volumen interno del recipiente 8 y un detector óptico 14 dispuesto para recibir radiación que sale del volumen interno del recipiente 8, en donde preferiblemente la trayectoria del haz de la fuente de luz 17 cruza la trayectoria del haz del detector óptico 14 en el área entre la entrada 10i y el fondo del recipiente 8. La trayectoria del haz 19 generado por la fuente de luz 17 puede cruzar la trayectoria del haz de salida 11 hacia el detector óptico 14, p. ej. en un ángulo de 90°. Tanto la fuente de luz 17 como el detector óptico 14 están acoplados a un ordenador para controlar la fuente de luz 17 y para recibir señales de medición desde el detector 14. En la trayectoria del haz de salida 11, un discriminador de longitud de onda 13, p. ej. se puede disponer un filtro óptico. En la trayectoria del haz 19 generado por la fuente de luz 17, se puede disponer un discriminador de longitud de onda 18, p. ej. un filtro óptico. La carcasa 12 para el detector 14 y/o para la fuente de luz 17 tiene una línea de datos 16 para transmitir datos sobre radiación y señales de medición a un ordenador. Opcionalmente, se dispone una unidad de control 15 para controlar el termostato T y/o la fuente de luz 17 en la carcasa 12.

Preferiblemente, la carcasa 12 que contiene la fuente de luz 17, opcionalmente provista de un discriminador de

longitud de onda 18, y el detector óptico 14, opcionalmente provisto de un discriminador de longitud de onda 13, forman una unidad óptica integrada O. La unidad óptica O se puede montar de manera liberable en el termostato T y en la sección de tapa adyacente L, en donde estos elementos forman una concavidad para recibir una porción del recipiente 8.

- 5 La escala indicada en las Figuras 13 y 14 es una escala ilustrativa, que indica que preferiblemente cada recipiente 8 está provisto de un generador de fuerza de cizalla controlado individual que comprende un rotor 10 dentro de un estator 9, un termostato T, una fuente de luz 17 y un detector 14 y un motor de impulsión controlado 3 dentro de una escala de 7 a 12 mm, preferiblemente 9 mm, para su disposición en una fila o rejilla. La Fig. 15 muestra una disposición generalmente preferida de al menos dos, p. ej. de 8 o 12 recipientes que están conectados entre sí, cada uno provisto de un generador de fuerza de cizalla separado que comprende un impulsor D y una sección de tapa L, en donde los impulsores D y las secciones de tapa L, así como los termostatos T y las unidades ópticas O, respectivamente, son conectados entre sí en el mismo espacio para su disposición alrededor de recipientes 8 acoplados separados.

10 15 La Fig. 16 muestra otra realización, en donde el generador de fuerza de cizalla está formado por un rotor 9 y un estator 10 que consta de una sección de pared del recipiente 8. La sección de pared del recipiente 8 que forma el estator 10 está dispuesta, p. ej. para una porción, p. ej. de al menos 1° a 270°, p. ej. de 30° a 180° alrededor de la circunferencia del rotor 9 a una distancia constante. Como se muestra en la Figura 16, el rotor 9 está dispuesto preferiblemente de forma asimétrica dentro del recipiente 8, dejando una sección de volumen interno libre para la detección óptica.

20 25 El recipiente 8 puede tener, p. ej. una sección transversal circular, ovalada o en forma de huevo, y el rotor 9 puede estar dispuesto dentro de una parte de la sección transversal que tiene un diámetro menor o mayor.

Las Figuras 17 y 18 muestran que el recipiente 8 forma preferiblemente un estator 10 dispuesto a una distancia constante del rotor 9 para una porción alrededor de la circunferencia del rotor 9, en donde esta distancia forma la etapa más pequeño entre el rotor 9 y el estator 10. Por consiguiente, la superficie del rotor 9 es preferiblemente paralela al estator 10 para una porción de la circunferencia del rotor 9.

Referencias numéricas

1	conexión	12	carcasa que contiene detector óptico y fuente de luz
2	unidad de control de impulsión	13	discriminador de longitud de onda
3	motor de impulsión	14	detector óptico
4	acoplamiento	15	unidad de control
5	sello	16	línea de datos
6	tapa	17	fuente de luz
7	carcasa	18	discriminador de longitud de onda
8	recipiente	19	trayectoria del haz desde la fuente de luz
9	rotor	20	muestra
9a	eje	D	impulsor
10	estator	L	sección de tapa
10e	extensiones	T	termostato
10o	abertura de salida	S	compartimento de muestras
10i	entrada	O	unidad óptica
11	trayectoria de luz que sale		

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el análisis de la presencia de proteína priónica de conformación agregada relacionada con enfermedad en una muestra de mamífero biopsiada, que comprende las etapas de

- a) añadir a la muestra al menos una proteína priónica de conformación nativa,
- 5 b) someter la mezcla que comprende la muestra y al menos una proteína priónica de conformación nativa obtenida en la etapa a) a al menos una intensidad de fuerza de cizalla que se controla para que tenga una intensidad uniforme que tenga un rango de intensidad máximo de 20% de un valor de fuerza de cizalla para un número de ciclos determinado previamente de un tiempo determinado previamente de acción de fuerza de cizalla y una fase de reposo determinada previamente,

10 c) después de la etapa b), determinar el contenido de proteína priónica de conformación agregada para cada una de las intensidades de fuerza de cizalla, caracterizado por

- d) comparar el contenido de proteína priónica de conformación agregada determinada en la etapa c) con datos determinados previamente sobre el contenido de proteína priónica de conformación agregada, cuyo contenido se determinó para la proteína priónica de conformación nativa sometida a la misma intensidad de fuerza de cizalla que en la etapa b), en donde los datos determinados previamente del contenido de proteína priónica de conformación agregada se determinaron previamente en una proteína priónica de conformación nativa mezclada con una muestra de referencia y estos datos se proporcionan en un banco de datos que asociados con estos datos contiene el diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa para el paciente del que origina la muestra de referencia.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que antes de la etapa b) la mezcla se divide en alícuotas y en la etapa b) al menos dos alícuotas se someten a una intensidad de fuerza de cizalla diferente cada una y en la etapa c) se determina el contenido de proteína priónica de conformación agregada para cada alícuota y en la etapa d) el contenido de la proteína priónica de conformación agregada determinada en la etapa c) para cada alícuota se compara con los datos sobre un contenido determinado previamente de proteína priónica de conformación agregada.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que en la etapa b) la mezcla se somete a una sucesión de al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes y el contenido de proteína priónica de conformación agregada se determina durante o después de someter la mezcla a cada una de las intensidades de fuerza de cizalla.

30 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la adición a la mezcla de al menos un colorante luminiscente que es específico para la proteína priónica de conformación agregada antes de la etapa de someter la mezcla a al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes y medir la luminiscencia del colorante.

35 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que la irradiación de la mezcla con luz que tiene una longitud de onda para excitar la luminiscencia en el colorante y la medición de la luminiscencia del colorante durante la acción de fuerza de cizalla de la etapa b) o durante una fase de reposo de la etapa b), sin mover el volumen ocupado por la mezcla con respecto al generador de fuerza de cizalla que genera la fuerza de cizalla en la etapa b).

40 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la irradiación de la mezcla con luz que tiene una longitud de onda que es dispersada por la proteína priónica de conformación agregada y la medición de la luz dispersada que sale de la mezcla durante la etapa b), o durante una pausa de la etapa b), con o sin mover el volumen ocupado por la mezcla con respecto al generador de fuerza de cizalla que genera la fuerza de cizalla en la etapa b).

45 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en la etapa b) la velocidad de formación de priónica de conformación agregada se determina a partir del contenido de proteína priónica en estado agregado determinado a la al menos una intensidad de fuerza de cizalla y los datos determinados previamente contienen la velocidad de formación a la misma intensidad de fuerza de cizalla.

50 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el contenido de proteína priónica de conformación agregada se determina como el contenido resuelto en el tiempo y porque la velocidad de formación de proteína priónica de conformación agregada se determina mediante un análisis de regresión no lineal de una aproximación del contenido resuelto en el tiempo determinado de proteína priónica de conformación agregada para cada una de las intensidades de fuerza de cizalla.

55 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la adición de al menos una proteína priónica de conformación agregada a al menos una alícuota de la mezcla que comprende la muestra y al menos una proteína priónica de conformación nativa, en donde la al menos una proteína priónica de conformación agregada se produce sometiendo una proteína priónica de conformación nativa a una fuerza de cizalla

uniforme controlada a un rango de intensidad máximo de 1% de una intensidad de fuerza de cizalla.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el tratamiento en paralelo al menos una proteína priónica de conformación nativa sin la adición de una muestra de fluido corporal.

5 11. Uso de un dispositivo en un procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el dispositivo un generador de fuerza de cizalla controlado para ejercer una fuerza de cizalla de un máximo de 10% de una intensidad de fuerza de cizalla en cada elemento de volumen de una mezcla de una muestra biopsiada de fluido corporal o tejido y una proteína priónica de conformación nativa dispuesta en un recipiente (8), caracterizado por que una fuente de luz (17) cuya trayectoria del haz (19) se dirige al recipiente (8) y que tiene un detector óptico (14) dispuesto en la trayectoria de luz (11) de la luz que emana del recipiente (8), en donde el detector óptico (14) es un detector de luminiscencia, un detector de luz de dispersión o un detector de absorbancia.

10 12. Uso de un dispositivo según la reivindicación 11, caracterizado por que el detector (14) que está acoplado a un ordenador que está configurado para determinar la luz (11) que emana del recipiente (8) como una medida del contenido de proteína priónica agregada, en donde el ordenador tiene acceso a un banco de datos (Base de Datos de Información de Referencia) que contiene datos determinados previamente sobre el contenido de la proteína priónica de conformación agregada en relación con las intensidades específicas de la fuerza de cizalla y en relación con el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa perteneciente a una muestra de referencia utilizada para generar los datos determinados previamente.

20 13. Uso de un dispositivo según una de las reivindicaciones 11 a 12, que comprende al menos dos recipientes (8), cada uno dispuesto en una concavidad formada por una carcasa (12) que contiene el detector óptico (14) y la fuente de luz (17), un termostato (T) y una sección de tapa (L) que comprende un cojinete para un eje (9a) que porta el rotor (9), en donde las carcasas (12) están conectadas entre sí y las secciones de tapa (L) están conectadas entre sí.

25 14. Uso de un dispositivo según una de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el generador de fuerza de cizalla comprende un rotor (9) dispuesto a una separación de un estator (10), caracterizado por que el estator tiene extensiones (10e) que forman un embudo que se estrecha a una entrada (10i) que es coaxial con respecto al rotor (9).

30 25. 15. Uso de un dispositivo según una de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el generador de fuerza de cizalla tiene un estator (10) formado por una porción de la pared del recipiente (8) que en una porción de la circunferencia del rotor (9) es paralela al rotor (9) a una separación constante.

35 30. 16. Banco de datos basado en ordenador en un portador de datos para su uso en un procedimiento para analizar la presencia de proteína priónica de conformación agregada relacionada con enfermedad en una muestra de mamífero biopsiada y/o para analizar una muestra de mamífero biopsiada para determinar una enfermedad neurodegenerativa que está relacionada con la proteína priónica de conformación agregada, conteniendo el banco de datos el diagnóstico médico para una enfermedad neurodegenerativa específica y/o un subtipo de la misma asociada con los datos determinados previamente de las cantidades de proteína priónica de conformación agregada, cuyos datos se generaron por separado para cada una de al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes para cada proteína priónica de conformación nativa añadida a la muestra en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10.

40 40. 17. Banco de datos basado en ordenador en un portador de datos según la reivindicación 16, para su uso en un procedimiento para analizar la presencia de proteína priónica de conformación agregada relacionada con enfermedad en una muestra de mamífero biopsiada y/o para analizar una muestra de mamífero biopsiada para determinar una enfermedad neurodegenerativa que está relacionada con la proteína priónica de conformación agregada, caracterizado por que los datos incluyen la velocidad de formación de la proteína priónica de conformación agregada para cada una de al menos dos intensidades de fuerza de cizalla diferentes, la velocidad de disociación de la proteína priónica de conformación agregada y/o la cantidad original de proteína priónica de conformación agregada en la muestra.

ES 2 781 104 T3

Fig. 1

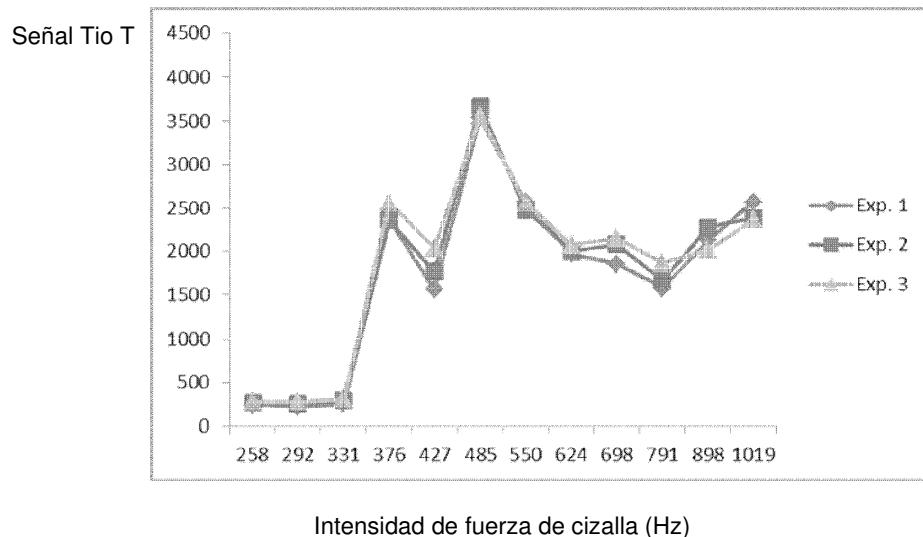


Fig. 2

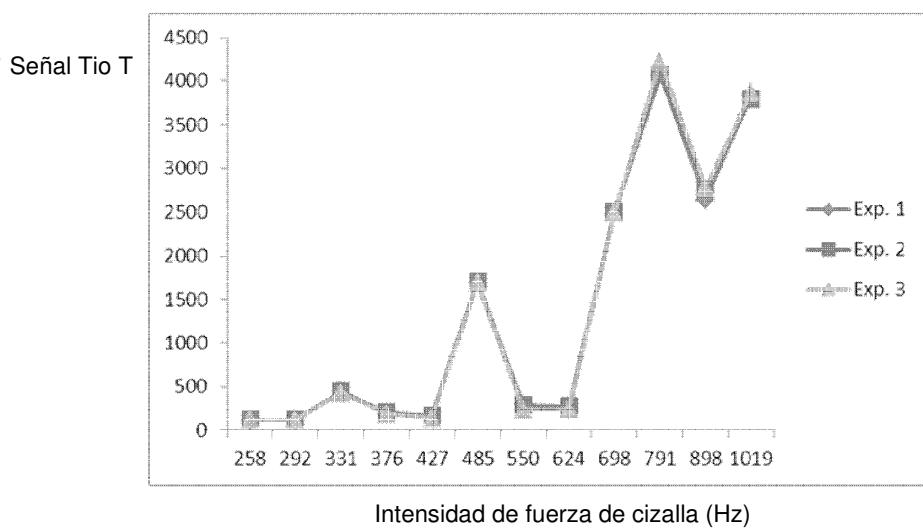


Fig. 3

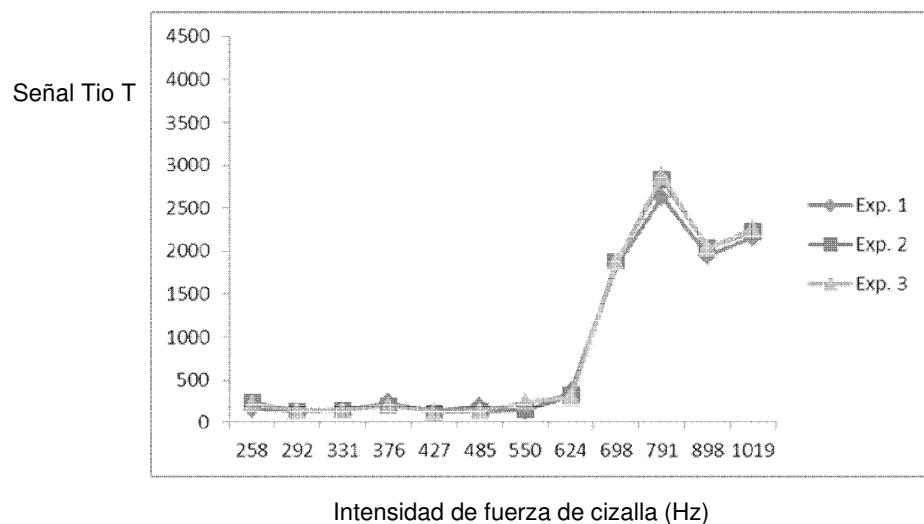


Fig. 4

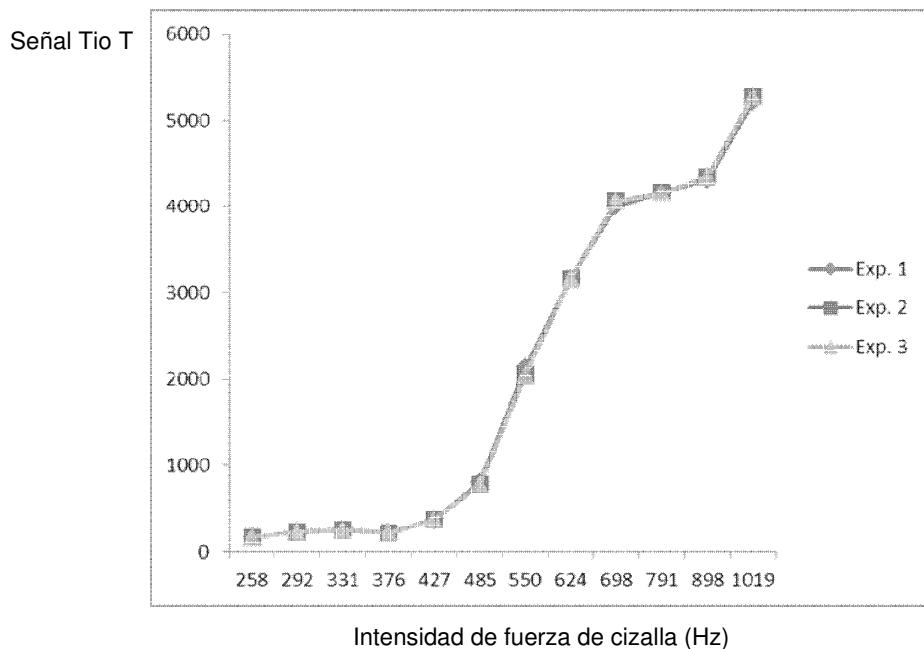


Fig. 5

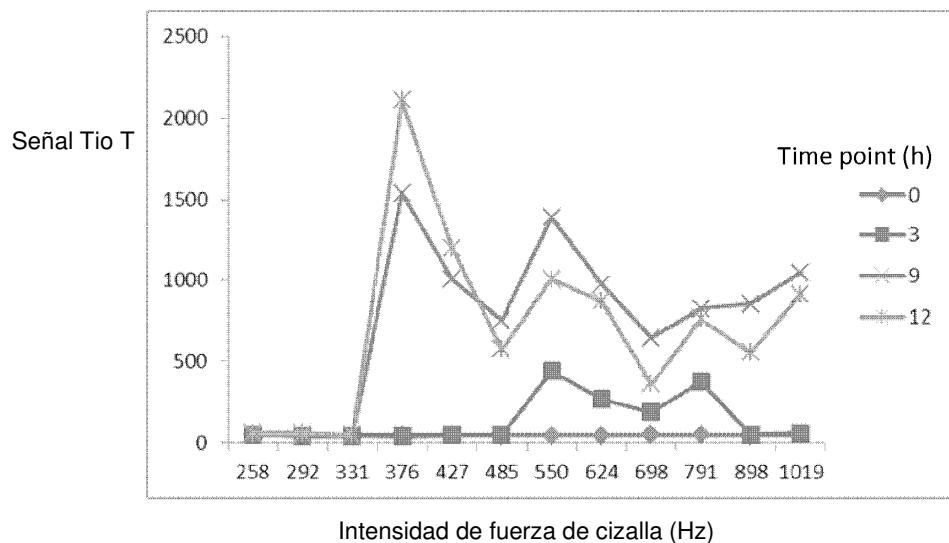


Fig. 6

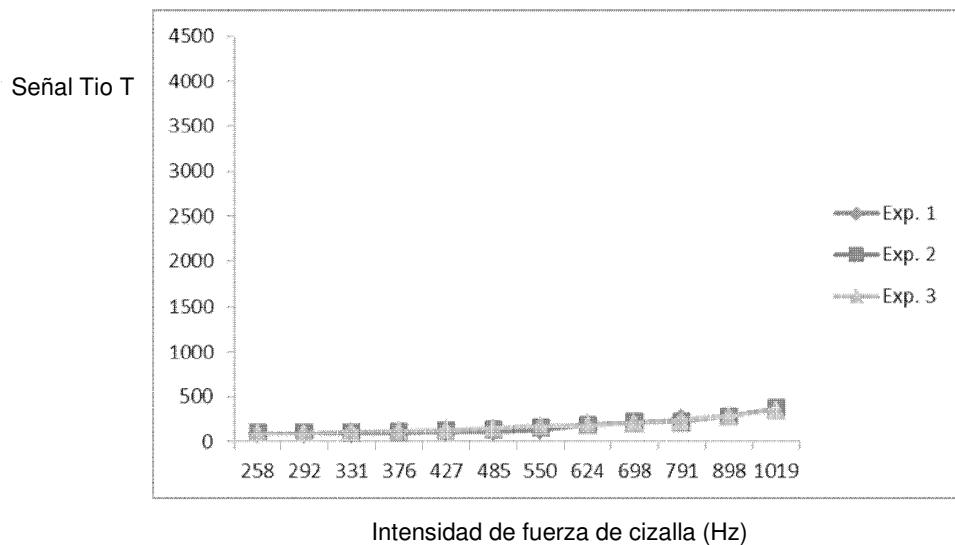


Fig. 7

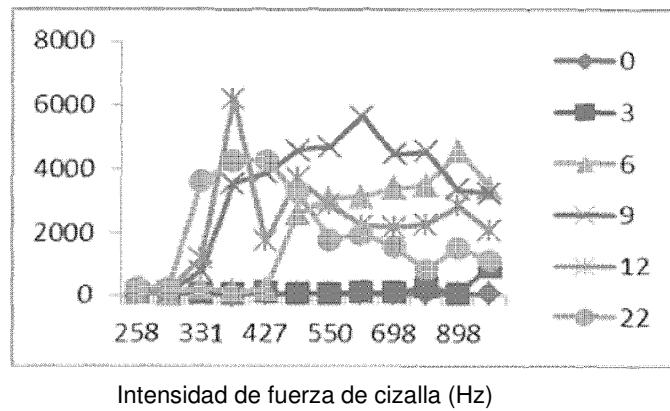


Fig. 8

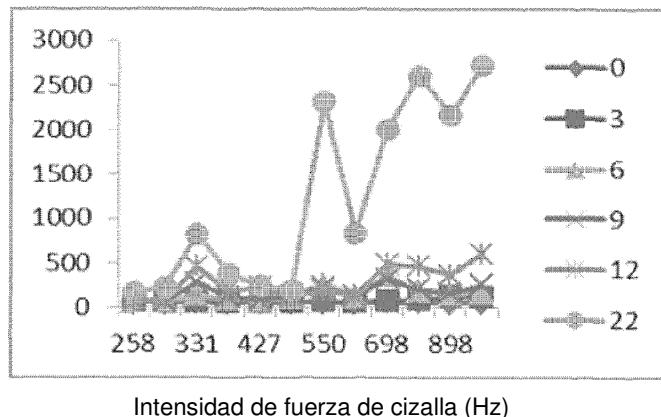
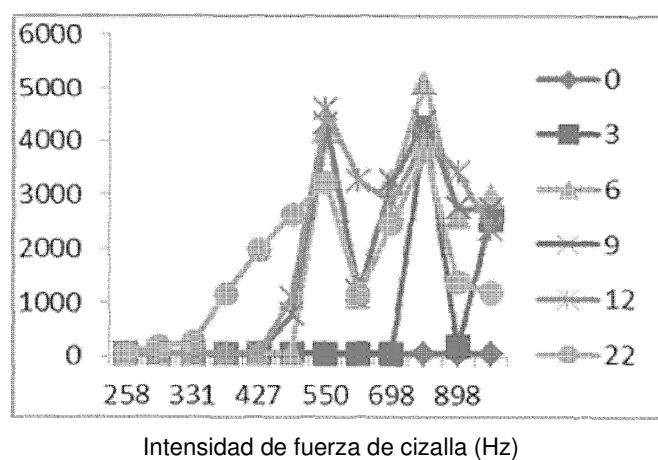


Fig. 9



ES 2 781 104 T3

Fig. 10

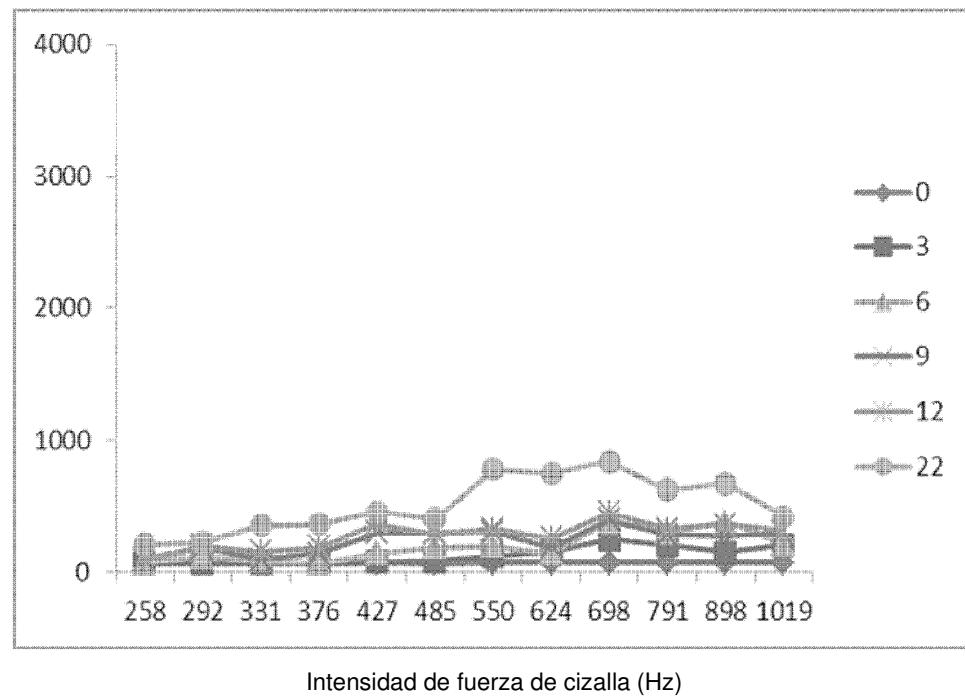


Fig. 11

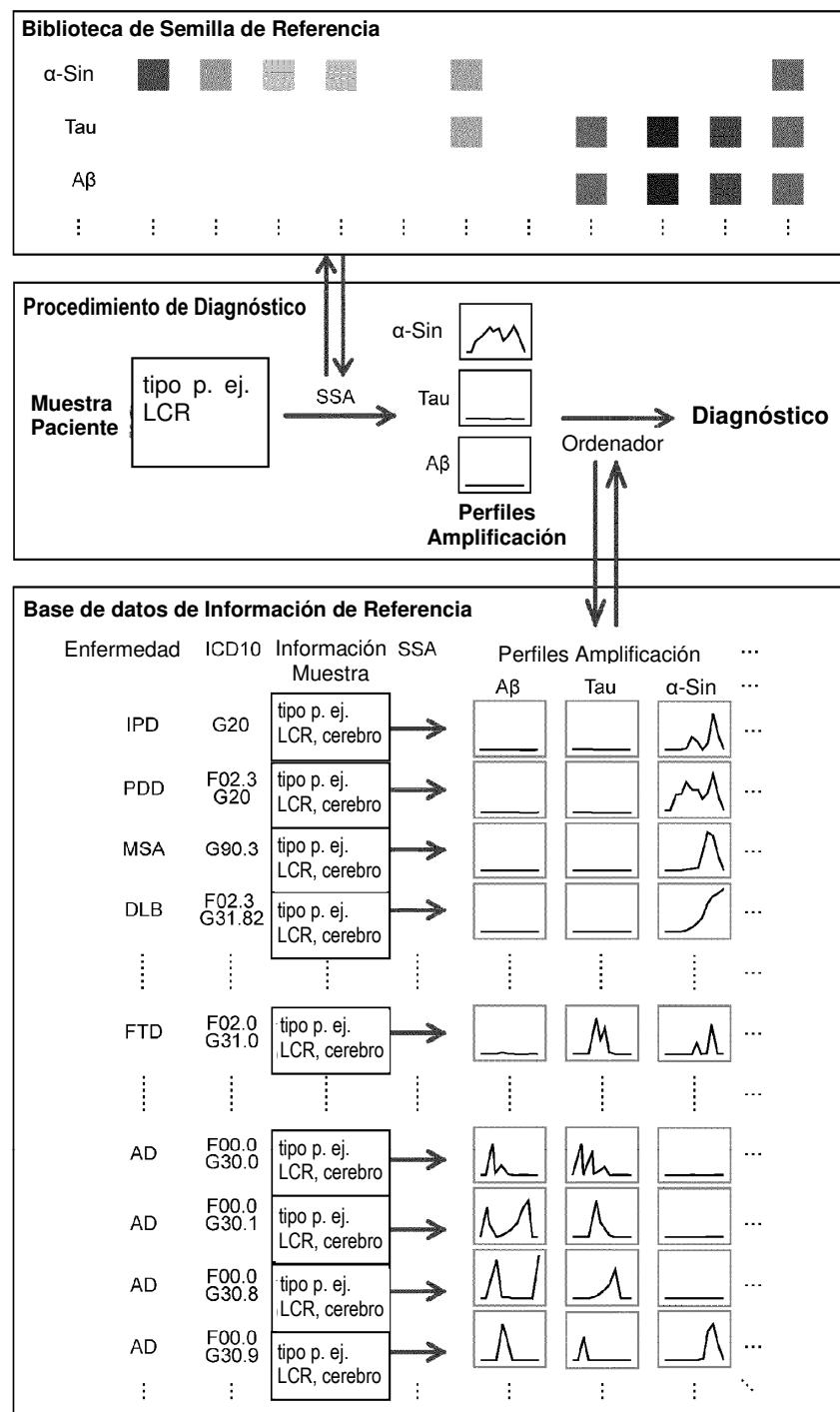


Fig. 12

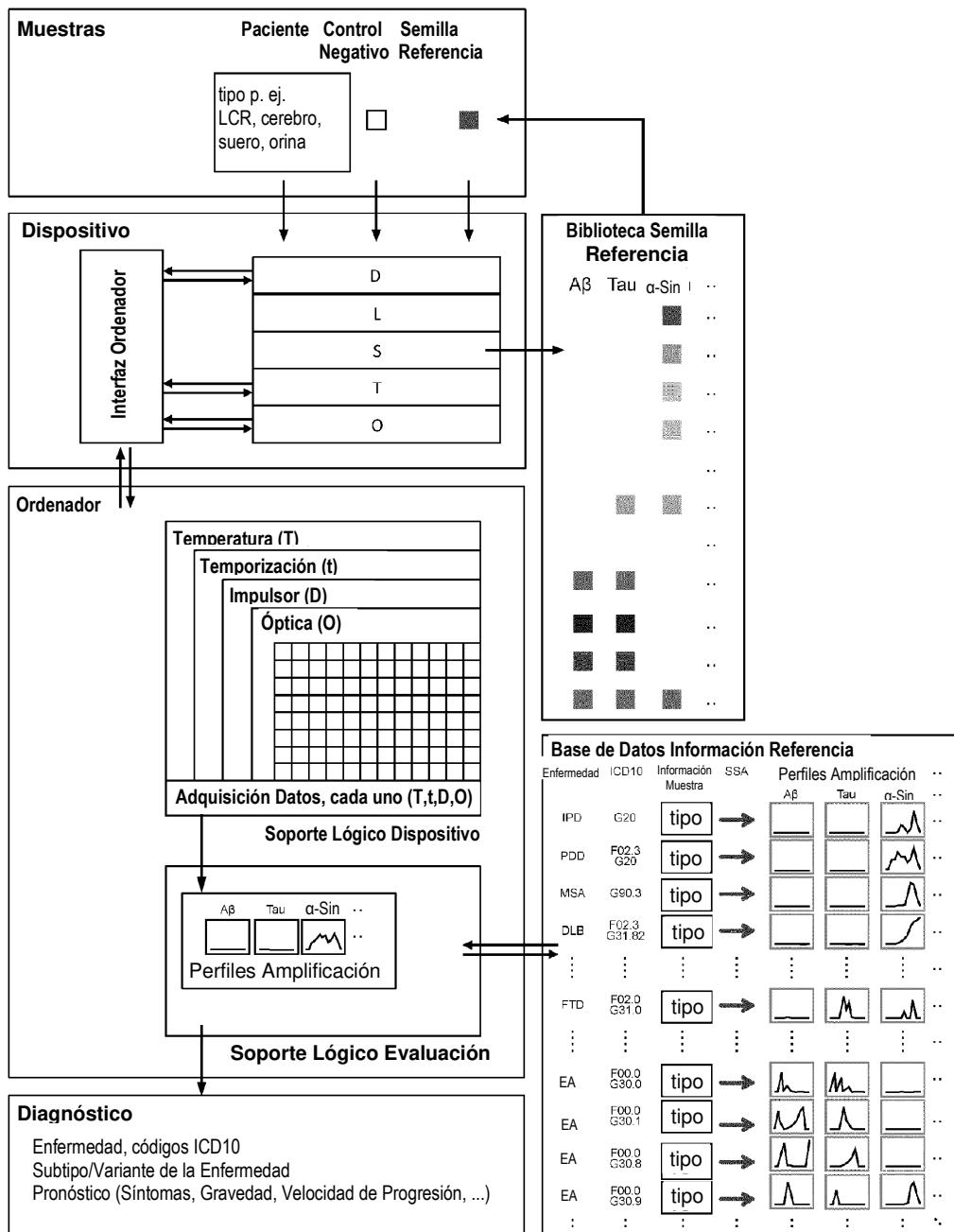


Fig. 13

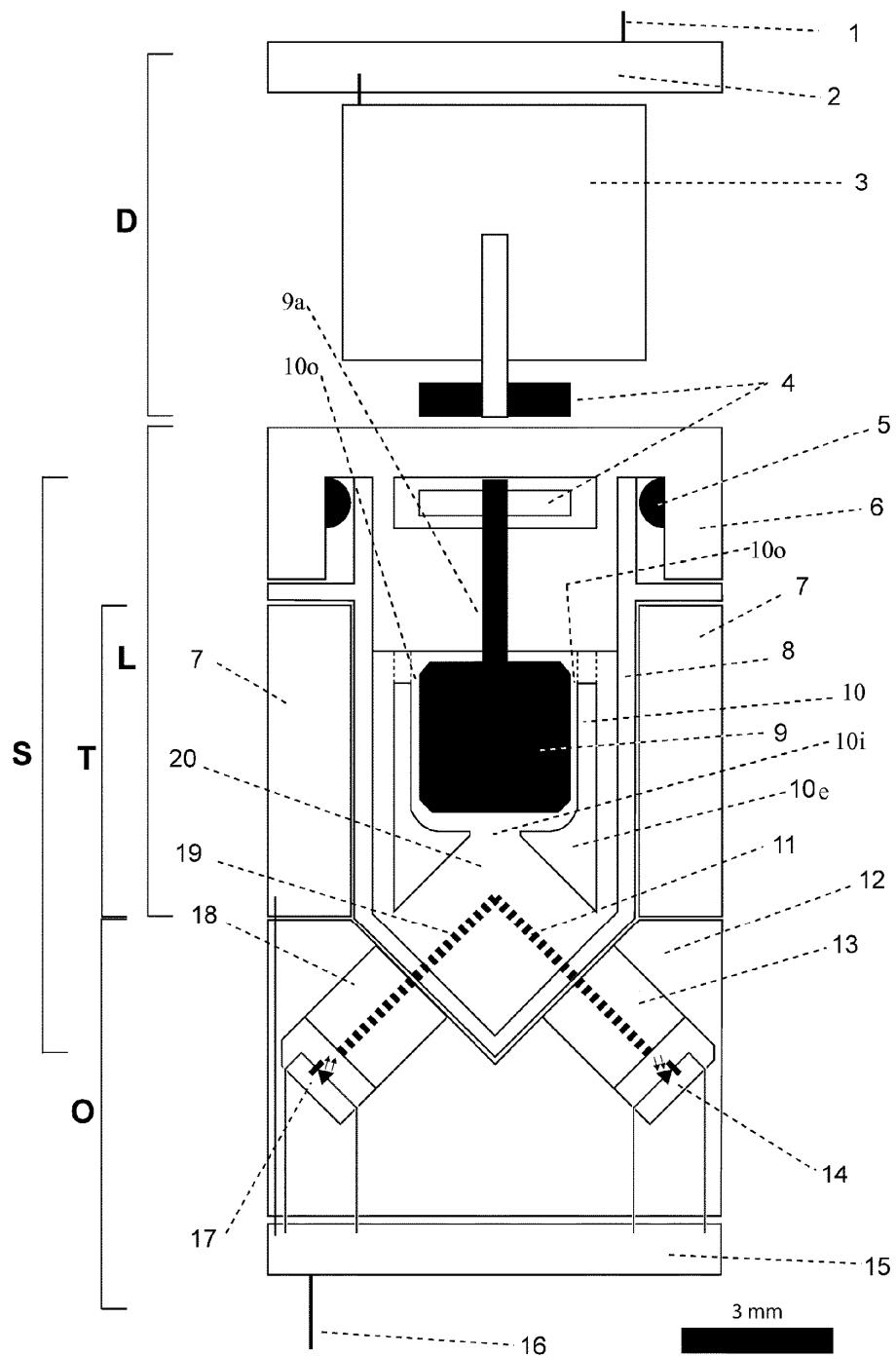
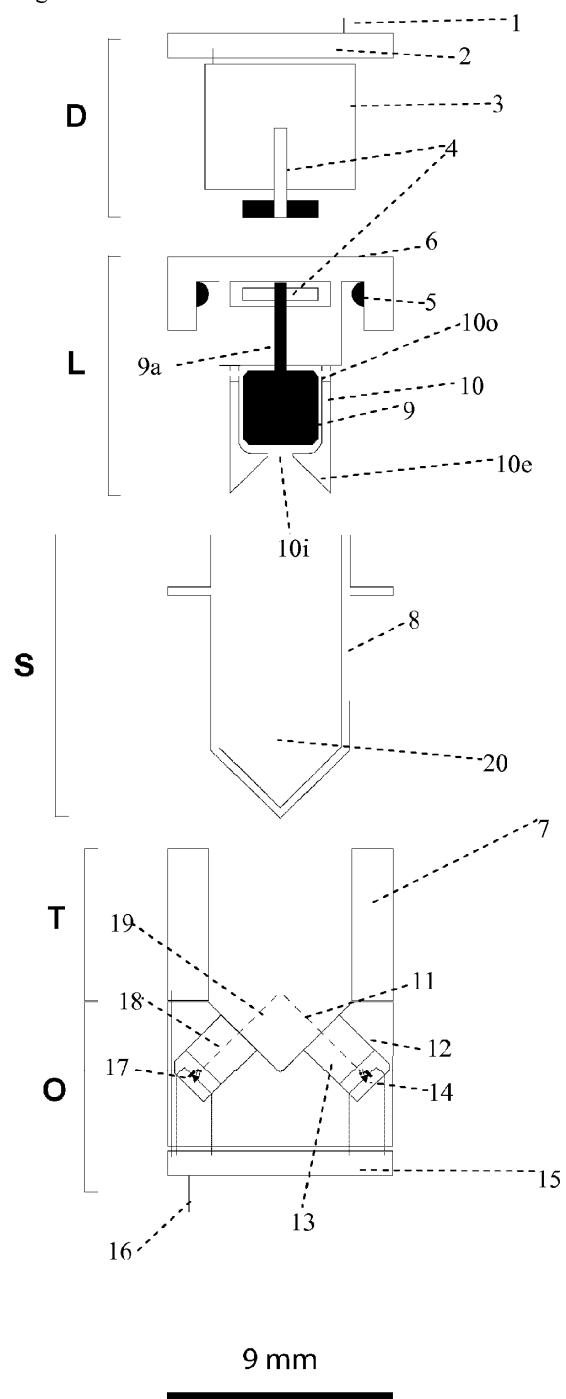


Fig. 14



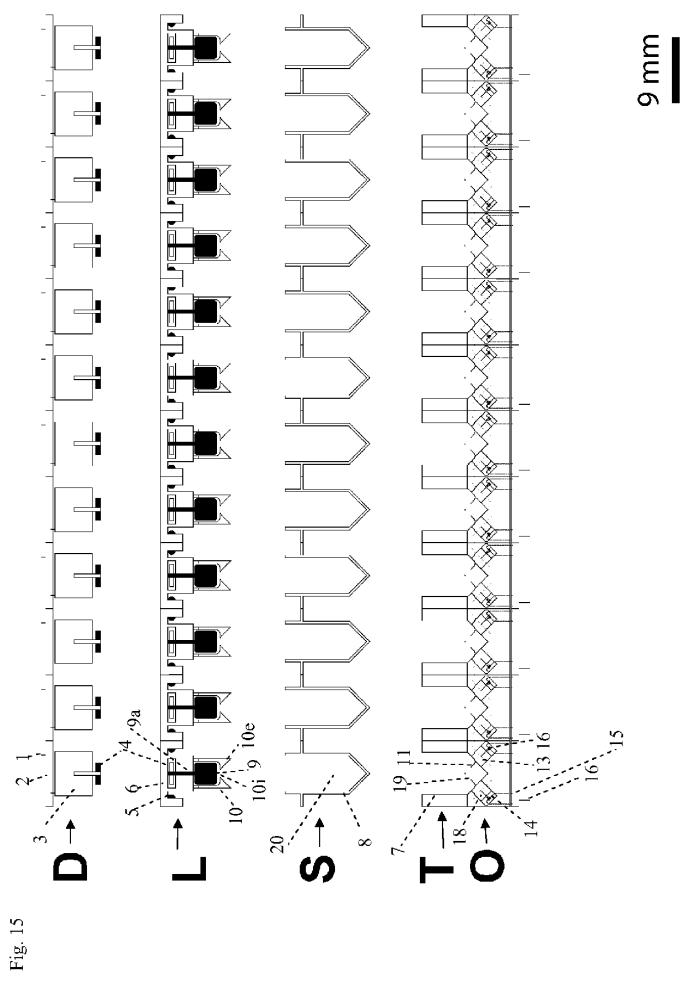


Fig. 15

Fig. 16

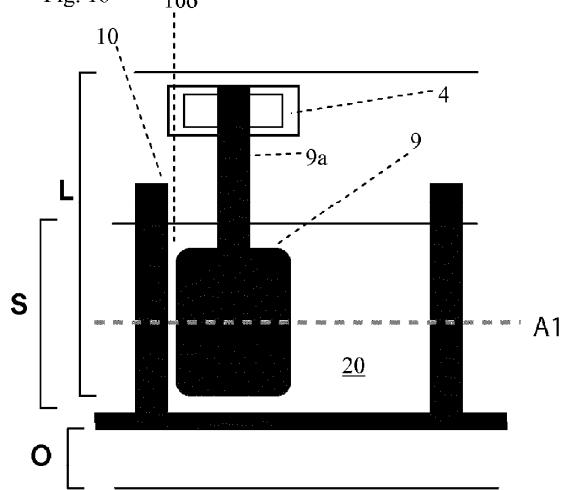


Fig. 17

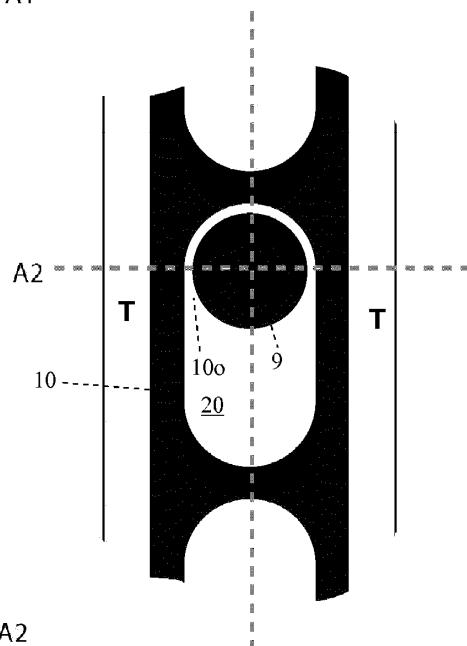
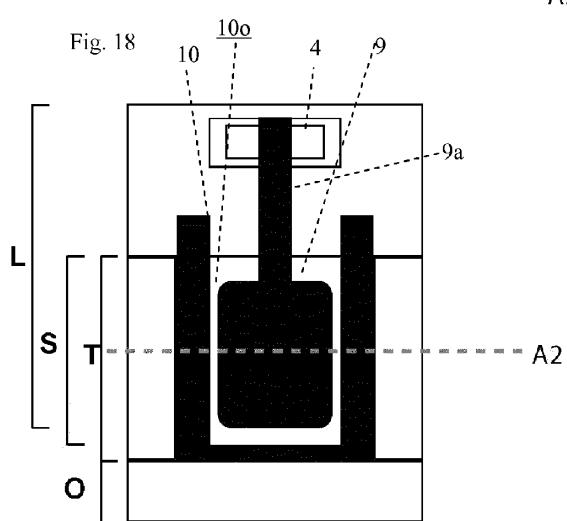


Fig. 18



3 mm