

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 962**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/552 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2016** **E 16199805 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** **EP 3324187**

54 Título: **Ensayo combinado para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Alzheimer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2020

73 Titular/es:

RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM (100.0%)
Universitätsstrasse 150
44801 Bochum, DE

72 Inventor/es:

GERWERT, KLAUS;
NABERS, ANDREAS y
SCHARTNER, JONAS

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 791 962 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

Ensayo combinado para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Alzheimer

5 La invención da a conocer un ensayo inmunoinfrarrojo para el diagnóstico diferencial y la sub-clasificación de la enfermedad de Alzheimer en diferentes estadios. El método se puede aplicar para asegurar el diagnóstico de la enfermedad y la estratificación de los pacientes. El ensayo considera la detección sin etiquetas del cambio dentro del péptido amiloide-beta y la distribución de la estructura secundaria de la proteína Tau en los fluidos corporales. Este cambio de la estructura secundaria de isoformas naturales a enriquecidas con láminas β ocurre con demoras para $A\beta$ y Tau, pero aparece años antes de la manifestación clínica de la enfermedad. Ahora, el método combinado utiliza este cambio para el diagnóstico basado en biopsias de líquido.

Antecedentes de la invención

15 La enfermedad de Alzheimer (AD) es una de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes que afecta a más de 35 millones de personas en todo el mundo (Prince et al., Londres, Reino Unido doi:10.1111/j.0963-7214.2004.00293.x (2015)). El diagnóstico diferencial y la sub-clasificación de la AD, especialmente en estadios tempranos de la enfermedad todavía es problemático en la rutina clínica. Actualmente existe la necesidad de biomarcadores fiables para la detección temprana de la AD. Pero el diagnóstico diferencial temprano y asegurado es fundamental para las intervenciones terapéuticas futuras (Chiba, *Neurodegenerative Diseases*, editado por Uday Kishore, 181-225. InTech doi:10.5772/55293 (2013); Thorsett and Latimer, *Current Opinion Chem. Biol.* 4(4):377-82 (2000)). Por lo tanto, los institutos de investigación científica se están centrando en pruebas diagnósticas simples preferiblemente basadas en biopsias de líquido (Doecke, *Arch. Biol.* 69(10):1318 doi:10.1001/archneurol.2012.1282 (2012); Andreasen et al., *J. Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 64(3):298-305 (1998); Fiandaca et al., *Frontiers in Neurology* 6(Nov):1-13 doi: 10.3389/fneur.2015.00237 (2015); Mapstone et al., *Nature Medicine* 20(4):415-18. doi: 10.1038/nm.3466 (2014)).

En la enfermedad de Alzheimer, se analiza un cambio de estructura secundaria del péptido amiloide-beta ($A\beta$) y de la proteína Tau más intrínsecamente alterados a las isoformas enriquecidas con láminas β , como un evento iniciador durante la progresión de la enfermedad (Sarroukh et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 68(8):1429-38 doi:10.1007/s00018-010-0529-x (2011); Cerf et al., *Biochem. J.* 421(3):415-23 doi:10.1042/BJ20090379 (2009); Fändrich, et al., *Prion* 3(2):89-93 (2009); Sachse et al., *PNAS* 105(21):7462-66 doi:10.1073/pnas.0712290105 (2008); Glabe, *J. Biol. Chem.* 283(44):29639-43 doi:10.1074/jbc.R800016200 (2008); Cavallucci et al., *Mol. Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-012-8251-3 (2012); Haass y Selkoe, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8(2):101-12 doi:10.1038/nrm2101 (2007); Kolarova et al., *Int. J. Alzheimer's Disease* doi:10.1155/2012/731526 (2012); Yang et al., *Devel. Brain Res.* 156(2):127-38 doi:10.1016/j.devbrainres.2005.02.004 (2005)). Por consiguiente, se sugiere que la agregación y deposición de Tau en ovillos neurofibrilares (NFT) acompaña la agregación de $A\beta$ (Lo et al., *Arch. Neurol.* 68(10):1257-66 doi:10.1001/archneurol.2011.123 (2011); Bennett et al., *Arch. Neurol.* 61(3):378-84 doi:10.1001/archneur.61.3.378 (2004); Coomaraswamy et al., *PNAS* 107(17):7969-74 doi:10.1073/pnas.1001056107 (2010); Braak y Braak, *Acta Neuropathologica* 82(4):239-59 doi:10.1007/BF00308809 (1991); Thal et al., *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 59(8):733-48. (2000); Thal et al., *Science of Aging Knowledge Environment* 2006(6):re1 doi:10.1126/sageke.2006.6.re1 (2006)).

En la rutina clínica se utilizan pruebas neuropsicológicas y resultados cuantitativos neuroquímicos de niveles de diversos biomarcadores en el fluido cefalorraquídeo (CSF) para diagnóstico diferencial de avanzada. Pero las concentraciones del biomarcador propiamente dicho, como $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$, nivel de Tau total o Tau hiperfosforilada, podrían no correlacionarse con la progresión de AD (Wiltfang et al., *J Neurochem.*, 101(4):1053-59 doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04404.x (2007), Gabelle et al., *J Alzheimers Dis.*, 26(3):553-63 doi:10.3233/JAD-2011-110515 (2011), Blennow et al., *J Nutr Health Aging*, 13(3):205-8 doi:10.1007/s12603-009-0059-0 (2009)). Asimismo, en base a la cuantificación de biomarcadores, el diagnóstico diferencial sigue siendo problemático. No obstante, la tomografía por emisión de positrones (PET) y la resonancia magnética (MRT) detectan agregados (acumulados de proteínas enriquecidas con láminas β) tales como placas en el cerebro humano. No obstante, las técnicas de PET y MRT son muy costosas y consumen mucho tiempo, lo que las hace no aplicables para la detección de estadios tempranos de AD y por lo tanto solamente proporcionan una determinación de los estadios/moderados/tardíos de la enfermedad. Otra desventaja en el caso de PET es el uso de agentes de contraste, que también estresa a los pacientes. Además de las técnicas ya mencionadas, los inmunoensayos basados en fluorescencia son un campo emergente, especialmente el ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) y el análisis de distribución de intensidad de la fluorescencia (sFIDA). Pero estas técnicas necesitan anticuerpos de detección marcados por fluorescencia, que pueden influir en la estructura secundaria del biomarcador analizado. A su vez, ELISA y sFIDA no revelaron ninguna información directa sobre la estructura secundaria de la proteína o la distribución de la estructura secundaria. Asimismo, la estructura secundaria de la proteína Tau nunca se usó para diagnóstico o propósitos diferenciales hasta la fecha debido a la ausencia de sensibilidad conformacional de las técnicas mencionadas.

Con el fin de determinar dicho cambio de la estructura secundaria, la herramienta de espectroscopia de diferencia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) es una herramienta potente (Kötting y Gerwert, *Chemphyschem* 6(5):881-888 doi: 10.1002/cphc.200400504 (2005)). La frecuencia de la banda de amida I causada por la vibración C=O del

enlace peptídico es indicativa de la estructura secundaria del esqueleto de la proteína. Especialmente, el incremento de las isoformas del biomarcador enriquecido con láminas β en los fluidos corporales se detecta confiablemente con un desplazamiento hacia debajo de la frecuencia hasta 1630 cm^{-1} monitoreado por la técnica de reflexión total atenuada de sondeo superficial (ATR). Con el fin de analizar la distribución de la estructura secundaria de una proteína específica en los fluidos corporales, la proteína de interés debe unirse selectivamente dentro de la capa superficial, lo cual se logra con un elemento de reflexión interna funcionalizado con anticuerpos (IRE) (Schartner et al., JACS 135(10):4079-87 doi:10.1021/ja400253p (2013)). Este método se aplicó para la extracción y determinación de la distribución de la estructura secundaria de la fracción de A β soluble de CSF y plasma sanguíneo para AD moderada y diferenciación del control de la enfermedad (Nabers et al., J. Biophotonics 9(3):224-34 doi:10.1002/jbio.201400145 (2016); Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016)).

En contraste, se emplean técnicas como la resonancia de plasmones superficiales (SPR), ondas acústicas superficiales o microequilibrio cristalino de cuarzo para analizar las interacciones proteína-ligando o proteína-fármaco. No obstante, dado que estas técnicas ofrecen solamente información cinética, pero ninguna resolución espectral, no son capaces de revelar un cambio estructural secundario directo dentro de una proteína. Otras técnicas como la espectroscopia de absorción infrarroja potenciada superficial (SEIRA) en teoría proporcionarían resolución espectral, pero la reproducibilidad de la medición es muy problemática debido a la preparación de superficies de oro ásperas, y por lo tanto no proporciona una plataforma robusta para el análisis de transición estructural secundaria de proteínas.

El documento WO 2015/121339 da a conocer un biosensor para análisis de conformación y de estructura secundaria, notablemente para el análisis de estructura secundaria cualitativo no invasivo directo de una proteína individual seleccionada dentro de una mezcla compleja, como p. ej., un fluido corporal, por métodos espectroscópicos vibracionales. Para el análisis, no se requiere que la sustancia seleccionada se aisle, concentre o pre-trate con un procedimiento preparativo especial. El biosensor es adecuado para la determinación de progresión de una enfermedad, en donde una transición conformacional de una proteína biomarcadora candidata se asocia con progresión de la enfermedad, en donde un desplazamiento de la posición máxima de la banda de amida de la proteína biomarcadora es un clasificador indicativo de progresión de la enfermedad. Considerando las enfermedades de pliegue incorrecto, como p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o enfermedad de Huntington, esta información está crucialmente conectada con la progresión de la enfermedad.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico diferencial y la sub-clasificación de la enfermedad de Alzheimer y los correspondientes kits, dispositivos y usos como se define en las reivindicaciones.

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una proteopatía multifactorial que incluye el pliegue erróneo de dos candidatos biomarcadores prominentes. Ambos, el péptido amiloide-beta (A β) y la proteína Tau, demostraron isoformas potenciadas de láminas β durante la progresión de la enfermedad. Previamente, un aumento en el contenido de las isoformas A β de láminas β en la fracción de A β total en el líquido cefalorraquídeo (CSF) y en el plasma sanguíneo podían aplicarse para la detección de AD mediante un sensor inmunoinfrarrojo. Aquí se analizaron 300 muestras de pacientes con control de la enfermedad (DC) y demencia de tipo Alzheimer (DAT), con respecto a la distribución de la estructura secundaria de A β soluble (CSF, plasma sanguíneo) y proteína Tau (CSF), respectivamente. Se comprobó que la distribución de la estructura secundaria de la proteína Tau es un marcador general de demencia, no específicamente para DAT, pero un análisis de datos combinados de A β y Tau produjo un ensayo diagnóstico para diferenciación de DC/DAT con una precisión de 93 %. Asimismo, la evaluación de datos combinados demostró el potencial de subdividir pacientes DAT en estadios tempranos y tardíos de DAT, y puede proporcionar un diagnóstico diferencial de sujetos con DC. Por consiguiente, la descripción da a conocer

(1) un método para el diagnóstico diferencial y la sub-clasificación de la enfermedad de Alzheimer en diferentes estadios de la enfermedad por análisis directo de la distribución de la estructura secundaria de la fracción del péptido amiloide-beta (A β) soluble y de la fracción de proteína Tau soluble en los fluidos corporales, que comprende las etapas de

(a) conducir, en una primera celda IR que comprende un primer elemento sensor infrarrojo que tiene un elemento de reflexión interno con un núcleo de un material transparente infrarrojo y por lo menos un receptor para el péptido A β directamente injertado a por lo menos una superficie de dicho núcleo, por lo menos un flujo de un fluido corporal con un péptido A β soluble, emitiendo un haz IR a través de dicha primera celda IR y obteniendo un espectro infrarrojo a partir de allí;

(b) conducir, en una segunda celda IR que comprende un segundo elemento sensor infrarrojo que tiene un elemento de reflexión interno con un núcleo de un material transparente infrarrojo y por lo menos un receptor para la proteína Tau directamente injertada a por lo menos una superficie de dicho núcleo, por lo menos un flujo de un fluido corporal con una proteína Tau soluble, emitiendo un haz IR a través de dicha segunda celda IR y obteniendo un espectro infrarrojo a partir de allí;

y

5 (c) analizar los espectros infrarrojos obtenidos para determinar la distribución de la estructura secundaria del péptido A β soluble y de la proteína Tau soluble en los fluidos corporales para el diagnóstico diferencial, preferiblemente un desplazamiento campo abajo de la banda de la amida I del péptido A β y/o de la proteína Tau es indicativo del estadio de la enfermedad.

10 (2) una realización preferida del aspecto (1) anterior, en donde dichos primero y segundo elementos sensores infrarrojos comprenden un elemento de reflexión interno de germanio que tiene forma de trapecoide o paralelogramo y que es transparente en el infrarrojo con una relación señal a ruido suficiente para detectar la banda de amida I, y por lo menos un receptor para el péptido A β o para la proteína Tau que son anticuerpos capaces de unirse en forma específica e independiente desde el punto de vista conformacional al péptido A β o a la proteína Tau, respectivamente, e injertarse directamente a por lo menos una superficie de dicho elemento de reflexión interno de germanio por silanización con enlazadores cortos de silano, o por tiolación con enlazadores cortos de tiol, sometiendo a reacción grupos amina libremente accesibles de dicho por lo menos un receptor con grupos reactivos de amina en los enlazadores cortos de silano/tiol, y bloquear el resto de los grupos reactivos de amina en los enlazadores cortos de silano/tiol con una sustancia bloqueante que no reacciona en forma cruzada con el péptido A β ni con la proteína Tau, respectivamente,

20 (3) un kit para el diagnóstico diferencial y la sub-clasificación de la enfermedad de Alzheimer en diferentes estadios de la enfermedad, que comprende un primero y un segundo elemento sensores infrarrojos como se definió anteriormente en (1) o (2),

25 (4) un dispositivo para el diagnóstico diferencial y la sub-clasificación de la enfermedad de Alzheimer en diferentes estadios de la enfermedad, en donde dicho dispositivo comprende un primero y un segundo elementos sensores infrarrojos como se definió anteriormente en (1) o (2), y

30 (5) el uso del primero y el segundo elementos sensores infrarrojos como se definió anteriormente en (1) o (2), el kit como se definió en (3) anterior o el dispositivo que se definió anteriormente en (4) para el análisis directo de la distribución de la estructura secundaria de una fracción del péptido soluble amiloide-beta (A β) y una fracción de la proteína Tau soluble en los fluidos corporales.

35 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esquema del ensayo inmunoinfrarrojo combinado y principio del análisis. (A) La fracción total de A β (1) y Tau (2) presente en CSF y/o plasma se extrajo separadamente usando un sensor inmunoinfrarrojo funcionalizado con anticuerpos. La distribución de la estructura secundaria de A β y Tau detectada se indica con la posición máxima de amida I infrarroja.

40 Figura 2: Distribución de la posición máxima de la amida I según lo exhibido en diagramas de cajas para discriminación de DC y DAT en base al análisis de A β en CSF y plasma, y Tau en CSF. Ambos grupos diagnósticos exhibieron una diferencia altamente significativa en la posición máxima de amida I de A β de CSF ($p=2,5 \times 10^{-11}$, Kruskal-Wallis ANOVA, nivel de confianza $\alpha=0,05$) y EDTA-plasma ($p=3,4 \times 10^{-9}$), y una significación moderada para Tau de CSF ($p=1,6 \times 10^{-3}$). En los diagramas de cajas, se exhiben cantidades de 25/50/75% como líneas horizontales, la posición de la banda promedio como cuadrado, \pm desviación típica como márgenes escasos y valores mínimos/máximos observados como cruces.

50 Figura 3: Diagrama de dispersión tridimensional de la posición máxima de la amida I según lo determinado para Tau en CSF, A β en CSF y A β en EDTA-plasma para 61 muestras DC (gris) y 39 DAT (negro). Los puntos de datos dentro del recuadro negro transparente indican sujetos identificados como DAT en los tres ensayos.

55 Figura 4: Análisis de curva ROC para diferenciación de DC ($n=61$) y DAT ($n=39$) basada en la determinación de la distribución de la estructura secundaria de A β en CSF (A), A β en EDTA-plasma (B) y proteína Tau en CSF (C). En este orden, se alcanzó un ABC de 0,90, 0,85 y 0,67. Por lo tanto, se calculó una precisión del diagnóstico de 92 % (A β , CSF), 85 % (A β , plasma) y 68 % (Tau, CSF) (D). En base a estos datos, la distribución de la estructura secundaria de Tau sola parece más un marcador general para demencia que para la detección de DAT específica.

60 Figura 5: Diagrama del procedimiento para el diagnóstico diferencial y la clasificación del estadio de enfermedad de DAT y otros tipos de demencia mediante el ensayo inmunoinfrarrojo combinado. El ensayo se basa en la determinación de la distribución de la estructura secundaria del péptido A β y la proteína Tau en los fluidos corporales. Esta distribución se representa con la posición máxima de la banda de la amida I sensible de conformación infrarroja de la fracción del biomarcador extraído. Una posición máxima debajo de la banda del marcador discriminador de 1643 cm^{-1} se define como patológica. Este procedimiento se aplica a la fracción de A β extraída de CSF y plasma y a la fracción de proteína Tau de CSF. No se asigna demencia cuando los tres valores de los biomarcadores están encima o igual que 1643 cm^{-1} . En cambio, los valores de los biomarcadores debajo de

1643 cm⁻¹ indican DAT severa. Otros tipos de demencia se identificarán cuando solamente la posición máxima de amida I de Tau esté por debajo de la banda del marcador.

Figura 6: La determinación de la posición máxima de amida I que representa la distribución de la estructura secundaria de Aβ (CSF/plasma) y Tau (CSF) se usó para la diferenciación de 61 pacientes DC y 39 DAT. Por consiguiente, un voto mayoritario (negro = máxima < 1643 cm⁻¹ y gris = máxima ≥ 1643 cm⁻¹) representó DC y DAT. Por lo tanto, se observaron solamente 3 falsos positivos para el grupo DC y 4 para el grupo DAT. Esto resulta en una especificidad de 95 %, sensibilidad de 90 %, y por ende una precisión del diagnóstico total de 93 % para el análisis de datos combinados en comparación con la evaluación clínica por parte de gerontopsiquiatras y neurólogos.

Descripción detallada de la invención

Los sensores inmunoinfrarrojos y su producción se describen en la solicitud de patente anterior del solicitante WO 2015/121339 y que ahora se aplica para la detección de la distribución de la estructura secundaria tanto de Aβ como de Tau en los fluidos corporales. La producción de los sensores IR incluye la inmovilización directa e íntima de receptores para Aβ o Tau, respectivamente, es decir, anticuerpos, en la superficie del material transparente infrarrojo mediante química de silano o tiol con un protocolo optimizado y simplificado. Para analizar el líquido (p. ej., sangre o CSF), se alimenta al sensor en un sistema de flujo. La sustancia macromolecular es inmovilizada por el anticuerpo en la superficie del sensor funcionalizado. Los elementos del sensor óptico son particularmente adecuados para análisis infrarrojo y opcionalmente además para el análisis paralelo o alternativo por otro método óptico, incluida la detección de fluorescencia a distintas longitudes de onda.

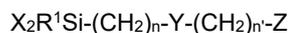
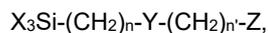
De acuerdo con la invención, el material transparente infrarrojo de la primera y la segunda celdas IR se selecciona en forma independiente entre silicio, germanio, seleniuro zinc, seleniuro de galio y diamante, y preferiblemente es germanio.

En una realización preferida de la invención, los elementos del sensor óptico tienen un elemento de reflexión interno que comprende un cristal de germanio que tiene forma de trapecoide o paralelogramo, fibra o forma de varilla. Se prefiere que el cristal de germanio sea un monocristal de germanio, mientras que se prefiere particularmente un monocristal de germanio de corte trapecoide.

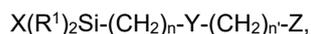
Se prefiere también que el cristal de germanio permita una, más de una, o más de tres reflexiones de luz infrarroja a través del elemento de reflexión, se prefieren particularmente más de cinco reflexiones o incluso más de veinte reflexiones (se prefieren 25 reflexiones con 13 reflexiones activamente detectadas). Para permitir el contacto con la proteína biomarcadora candidata en dichas reflexiones múltiples, el receptor para la proteína biomarcadora se injerta al número apropiado de superficies de dicho elemento de reflexión de germanio interno.

Los enlazadores de silano y tiol que se utilizan para acoplar el receptor y, en consecuencia, la macromolécula al elemento de reflexión de germanio interno incluye enlazadores de silano y tiol homogéneos, mezclas de enlazadores de silano y mezclas de enlazadores de tiol. Para permitir un enlace firme y estrecho de los enlazadores de cadena corta al receptor/macromolécula, se utilizan preferiblemente enlazadores que tienen una longitud de la cadena del enlazador eficaz (incluidos átomos de carbono y heteroátomos) de no más de 20 átomos o no más de 15 átomos.

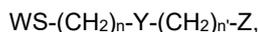
Dichos enlazadores de cadena corta incluyen enlazadores de silano que tienen una de las siguientes fórmulas:



o



y los enlazadores de tiol tienen la siguiente fórmula:



en donde W es R¹S- o H, X en cada caso se selecciona en forma independiente entre halógeno y alcoxi C₁₋₆, n es un número entero entre 1 y 10, n' es un número entero entre 1 y 5, R¹ en cada caso se selecciona en forma independiente entre alquilo C₁₋₆, Y se selecciona entre un enlace químico, -O-, -CO-, -SO₂-, -NR²-, -S-, -SS-, -NR²CO-, -CONR²-, -NR²SO₂- y -SO₂NR²- (en donde R² es H o alquilo C₁₋₆), y Z es un grupo reactivo de amina que incluye -CO₂H, -SO₃H y sus derivados de éster.

El halógeno dentro de la presente invención incluye un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo. Alquilo C₁₋₆ y alcoxi C₁₋₆ incluyen grupos alquilo o alcoxi lineales, ramificados o cíclicos que tienen 1 a 6 átomos de carbono que pueden estar saturados o insaturados. En el caso de grupos alquilo y alcoxi cíclicos, esto se refiere a aquellos que tienen 3 a 6

átomos de carbono. Los grupos alquilo C₁₋₆ y alcoxi C₁₋₆ adecuados incluyen, entre otros, metilo y metoxi, etilo y etoxi, n-propilo y n-propoxi, iso-propilo e iso-propoxi, ciclopropilo y ciclopropoxi, n-butilo y n-butoxi, terc-butilo y terc-butoxi, ciclobutilo y ciclobutoxi, n-pentilo y n-pentoxi, ciclopentilo y ciclopentoxi, n-hexilo y n-hexoxi, ciclohexilo y ciclohexoxi, etc. El grupo reactivo de amina Z incluye todos los tipos de grupos funcionales que son reactivos con un grupo amino libre. Entre estos, se prefieren particularmente CO₂H, -SO₃H y sus derivados de éster (incluidos ésteres activos).

Los elementos estructurales -(CH₂)_n- y -(CH₂)_n- en las fórmulas anteriores pueden también contener uno o más dobles y/o triples enlaces y pueden sustituirse con uno o más átomos de halógeno tales como fluoro o con deuterio.

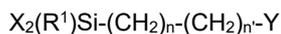
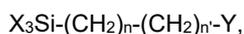
En una realización preferida de la invención, los elementos del sensor óptico se obtienen por silanización y en los enlazadores de las fórmulas (i) a (iii) X se selecciona en forma independiente entre grupos alcoxi C₁₋₆, preferiblemente entre grupos metoxi y etoxi, Y es -NHCO-, Z es -CO₂H o su derivado de éster, y n es un número entero entre 1 y 5, y n' es un número entero entre 1 y 3, preferiblemente n es 3 y n' es 2.

En otra realización, los elementos del sensor óptico se obtienen por tiolación y en los enlazadores de fórmula (iv) W es H, Y es un enlace químico, Z es -CO₂H o su derivado de éster, y n es un número entero de 1 a 8 y n' es un número entero de 1 a 5, preferiblemente n es 8 y n' es 4. Particular y preferiblemente es un éster NHS de ácido 12-mercaptododecanoico.

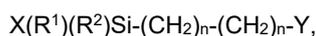
En otra realización preferida del elemento sensor óptico, los receptores para el péptido Aβ y la proteína Tau son anticuerpos específicos. En el caso del péptido Aβ, el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente al epítipo central del péptido Aβ, tal como un anticuerpo A8978 (Sigma Aldrich) y en el caso de la proteína Tau, el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo presente en todas las variantes Tau (incluidas las variantes fosforiladas y truncadas, variantes con 3 a 4 regiones de repetición, o isoformas), como el anticuerpo Tau-5 (AHB0042, Thermo Fisher Scientific).

La sustancia bloqueante que no reacciona en forma cruzada con la proteína biomarcadora candidata incluye caseína, etanolamina, L-lisina, polietilenglicoles, albúminas y sus derivados, y preferiblemente caseína.

En el método para preparar los elementos sensores, la oxidación se realiza por tratamiento con H₂O₂/ácido oxálico. Además, en el método, la silanización con enlazadores cortos de silano preferiblemente se realiza con un derivado de silano que tiene las siguientes fórmulas:

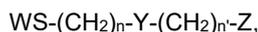


o



en donde las variables son como se definió anteriormente. Se prefiere particularmente que se use un derivado de éster del resto CO₂H o SO₃H en la definición de Y, en donde puede ser un éster alquílico C₁₋₆ simple, pero puede ser también un éster activado tal como un éster N-hidroxisuccinimido o cualquier derivado de éster activado. Se prefiere también en el método que el receptor sea un anticuerpo. Se prefiere además que la sustancia bloqueante sea caseína.

En el método para preparar los elementos sensores, la activación de la superficie se efectúa por tratamiento con HF (49%). Además, en el método, la tiolación con los enlazadores cortos de tiol preferiblemente se efectúa con enlazadores de tiol que tienen la siguiente fórmula:



en donde las variables son como se definió anteriormente. Se prefiere particularmente que se use un derivado de éster del resto CO₂H o SO₃H en la definición de Y, que puede ser un éster alquílico C₁₋₆ simple, pero también puede ser un éster activado tal como un éster de N-hidroxisuccinimida o cualquier otro derivado de éster. Se prefiere además en el método que el receptor sea un anticuerpo. Se prefiere además que la sustancia bloqueante sea caseína.

En el método para preparar los elementos sensores, los elementos sensores ópticos se acumulan a temperatura ambiente. Cada etapa se puede evaluar en función de los espectros IR. Esta etapa de validación es esencial para la detección específica y la determinación precisa de la estructura secundaria del analito.

El dispositivo del aspecto (4) de la invención posee los elementos sensores incorporados en una celda IR adecuada (cámara). Puede además incluir un elemento emisor de luz (IR), un elemento detector de luz (IR) y una unidad

procesadora de datos. Para la detección paralela mediante un método óptico adicional, el dispositivo puede además incluir fuente de luz y un elemento detector para dicho método óptico adicional tal como una fuente de luz y elementos detectores para UV/Vis-fluorescencia, a distintas longitudes de onda.

5 El método del aspecto (1) de la invención comprende las etapas de:

(a) conducir, en una primera celda de IR que comprende un primer elemento sensor infrarrojo que tiene un elemento de reflexión interno con un núcleo de un material transparente infrarrojo y por lo menos un receptor para el péptido A β directamente injertado a por lo menos una superficie de dicho núcleo, por lo menos un flujo de un fluido corporal con un péptido A β soluble, emitiendo un haz de IR a través de dicha primera celda de IR y obteniendo un espectro infrarrojo a partir de allí;

(b) conducir, en una segunda celda de IR que comprende un segundo elemento sensor infrarrojo que tiene un elemento de reflexión interno con un núcleo de un material transparente infrarrojo y por lo menos un receptor para la proteína Tau directamente injertado a por lo menos una superficie de dicho núcleo, por lo menos un flujo de un fluido corporal con proteína Tau soluble, emitiendo un haz de IR a través de dicha segunda celda de IR y obteniendo un espectro infrarrojo a partir de allí; y

(c) analizar los espectros infrarrojos obtenidos para determinar la estructura secundaria del péptido A β soluble y de la proteína Tau soluble en los fluidos corporales por diagnóstico diferencial.

En una realización preferida, el método comprende además, antes de las etapas (a) y (b): instalación de dicho elemento sensor óptico en la celda de IR. Adicional/alternativamente, el método puede además comprender la etapa (a') y (b'): regenerar de la superficie del elemento óptico por aplicación de una disolución de ligando libre para el receptor.

El espectro obtenido en las etapas (a) y (b) tiene suficiente relación señal a ruido para resolver la banda de amida I. Esto permite el análisis del desplazamiento de la posición máxima de la banda de amida I de la proteína biomarcadora en la etapa (c) para determinar la estructura secundaria de las proteínas biomarcadoras candidatas y permite efectuar el diagnóstico diferencial.

En otra realización de la etapa (c) el método comprende además comparar el espectro infrarrojo obtenido con un espectro del péptido A β soluble y/o la proteína Tau soluble con estructura secundaria conocida y/o con concentración conocida.

En otra realización, el método puede comprender, alternativo o paralelo al análisis infrarrojo, la detección mediante otro método óptico, incluida UV/Vis-fluorescencia, a diferentes longitudes de onda. Cabe destacar que se prefiere un método que combine espectroscopia vibracional inmuno-ATR-FTIR con espectroscopia de fluorescencia paralela.

El método de los aspectos (1) permite/es adecuado para determinar el péptido A β soluble y la proteína Tau soluble en los fluidos corporales, notablemente para determinarlos directamente en los fluidos corporales de origen mamífero (humano, animal), incluido líquido cefalorraquídeo, sangre o suero, sin pretratamiento (es decir, sin una etapa de enriquecimiento o purificación precedente separada). El método es adecuado para determinación de la proteína biomarcadora candidata en un modo separado (*in-vitro*) o en línea (determinación directa del fluido corporal en el paciente). En ambos casos, el método puede además comprender el diagnóstico diferencial y la evaluación de los estadios de la enfermedad de Alzheimer.

El método del aspecto (1) es particularmente adecuado para la determinación de la progresión de la enfermedad de Alzheimer con amiloide-beta y Tau como proteínas biomarcadoras candidatas, en donde un desplazamiento de la posición máxima de la banda de amida I del péptido A β de 1647 cm^{-1} a 1640 cm^{-1} , preferiblemente con un valor umbral de 1643 cm^{-1} +/- 5 cm^{-1} , (o 1643 cm^{-1} +/- 3 cm^{-1} , o 1643 cm^{-1} +/- 1 cm^{-1} , o aproximadamente 1643 cm^{-1}), y un desplazamiento de la posición máxima de la banda de amida I de la proteína Tau de 1647 cm^{-1} a 1640 cm^{-1} , preferiblemente con un valor umbral de 1643 cm^{-1} +/- 5 cm^{-1} , (o 1643 cm^{-1} +/- 3 cm^{-1} , o 1643 cm^{-1} +/- 1 cm^{-1} , o aproximadamente 1643 cm^{-1}) son indicativos de la enfermedad de Alzheimer. El método es también particularmente adecuado para la determinación de la progresión de la enfermedad de Alzheimer con amiloide-beta y Tau como proteínas biomarcadoras candidatas. Aquí el diagnóstico diferencial proporciona un perfil clínico asegurado del tipo de demencia, preferiblemente el método comprende la detección de la distribución de la estructura secundaria de A β de CSF (A), A β de plasma sanguíneo (B), y Tau de CSF (C). En particular, el método de la invención permite el diagnóstico diferencial de demencia de tipo Alzheimer (DAT) y (control de la enfermedad), pacientes DAT que son sub-clasificados por DAT temprana, moderada y severa, y pacientes DC separados en controles de salud, otras enfermedades y demencia debida a otro origen distinto de la enfermedad de Alzheimer. Cabe destacar que ambos biomarcadores, (A)/(B) para A β y (C) para Tau, un umbral discriminativo (1643 cm^{-1} \pm 5 cm^{-1}) separan a los pacientes con enfermedad de Alzheimer y DC; y/o la combinación de (A), (B) y (C) ofrece un panel de biomarcadores aplicable para un diagnóstico de DAT asegurado.

Se establece un clasificador de umbral simple para ambos biomarcadores similares a aquel descrito en Nabers et

al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016) y en el documento WO 2015/121339. Por consiguiente, usando una banda marcadora espectral discriminativa para el control de la enfermedad (DC) y diferenciación de demencia de tipo Alzheimer (DAT), ambos grupos diagnósticos podrían separarse con una precisión diagnóstica de 90 % en base al análisis de CSF A β . La precisión predictiva observada a partir del análisis de A β en plasma sanguíneo solamente fue inferior (84 %). Asimismo, una separación de ambos grupos solamente basada en la distribución secundaria de la proteína Tau permaneció insuficiente con una precisión de 68 %. Pero combinando las frecuencias de amida I de A β CSF y plasma sanguíneo con aquellas de Tau a un panel marcador, un simple clasificador de voto mayoritario demostró valores predictivos significativamente superiores. Ahora, podría alcanzarse una precisión de 93 % y una especificidad de 95 %. Una gran especificidad es crucial, especialmente para enfermedades incurables tales como AD, ya que un diagnóstico falso positivo puede tener consecuencias psicológicas graves para la parte involucrada. Pero el análisis de datos combinados demostró una segunda gran ventaja. Al combinar los datos de A β y Tau, se puede proporcionar más información sobre el estadio de enfermedad e indicaciones para otros tipos de demencia. El principio para el diagnóstico diferencial es simple. En una primera etapa, la posición máxima de amida I de la fracción soluble extraída de A β de CSF se determinó como se describe en Nabers et al., en Anal. Chem Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016) y WO 2015/121339. Por consiguiente, una posición máxima superior o igual a 1643 cm⁻¹ fue indicativa de DC, una posición máxima debajo de esta frecuencia fue indicativa de DAT. En una segunda etapa, se aplicó el mismo procedimiento a muestras de plasma sanguíneo. Nuevamente, se determinó las posiciones máximas de la amida I de A β para cada muestra. Ahora, si ambos valores posiciones estuvieron consistentemente encima o debajo de la frecuencia del marcador, podría efectuarse una diferenciación entre DC y DAT con una gran precisión. Pero para resultados de A β inconsistentes (CSF y plasma), la distribución de la estructura secundaria de la proteína Tau podría usarse como soporte de la decisión. Por otra parte, la distribución de la estructura secundaria de la proteína Tau también demostró el potencial de sub-clasificar el grupo DC y DAT en demencia debido a otro origen distinto de Alzheimer o en un estadio temprano, moderado o severo de la enfermedad. Con esto, los pacientes con enfermedad de Parkinson o demencia vascular podrían identificarse con el grupo DC (A β CSF \geq 1643 cm⁻¹; A β plasma \geq 1643 cm⁻¹; Tau CSF <1643 cm⁻¹). Por otra parte, el grupo DAT podría diferenciarse en estadios de enfermedad temprano (f.e. A β CSF <1643 cm⁻¹; A β plasma <1643 cm⁻¹; Tau CSF \geq 1643 cm⁻¹), moderado (A β CSF <1643 cm⁻¹; A β plasma \geq 1643 cm⁻¹; Tau CSF <1643 cm⁻¹) o (A β CSF \geq 1643 cm⁻¹; A β plasma <1643 cm⁻¹; Tau CSF <1643 cm⁻¹), y severo (A β CSF <1643 cm⁻¹; A β plasma <1643 cm⁻¹; Tau CSF <1643 cm⁻¹).

La invención se describe en más detalle con los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Materiales y métodos: Los mismos esquemas experimentales que se usaron en el documento WO 2015/121339.

Muestreo y pretratamiento: Se extrajo CSF por punción lumbar y se dividió en alícuotas en el hospital universitario Essen, se congeló en nitrógeno líquido, se envió y se almacenó a -80 °C. Las muestras no fueron pre-tratadas antes de la medición, solamente se descongelaron a 37 °C durante 30 segundos y se mantuvieron en hielo hasta el uso.

Grupos de pacientes: Los detalles de la adquisición de muestras y diagnóstico de pacientes para control de la enfermedad (DC) y con demencia de tipo Alzheimer (DAT) se han descrito en detalle previamente (Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016)). En el estudio anterior, se analizaron muestras de 141 pacientes usando el sensor inmunoinfrarrojo. De este grupo, 100 pacientes se seleccionaron aleatoriamente para el presente estudio. Los datos de la amida I infrarroja de A β extraído de CSF y plasma sanguíneo se adoptaron de (Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016)).

Disoluciones y reactivos: disolución salina tamponada con fosfato (tampón PBS): cloruro de sodio 137 mM (NaCl), cloruro de potasio 2,7 mM (KCl), fosfato total 12 mM (en la forma de Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄), pH 7,4.

Disolución bloqueante de caseína: hidróxido sódico 200 mM (NaOH), 1 % (p/v) caseína de leche bovina (polvo), pH ajustado con H₃PO₄ hasta 7,4.

Disolución de silanización: La disolución de NHS-silano ácido (N-(4,4,4-trietoxisilanobutil)succinámico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster) utilizada se sintetizó y caracterizó como se describe (Schartner et al., JACS 135(10):4079-4087 (2013)).

Anticuerpo: Para la extracción de A β del respectivo fluido corporal, se empleó el anticuerpo A8978 (lote núm: 061M4773, Sigma Aldrich). En el caso de la detección de la proteína Tau, se utilizó el anticuerpo Tau-5 (AHB0042, Thermo Fisher Scientific).

Medición: El procedimiento general es idéntico al descrito en el documento WO 2015/121339. Las mediciones de IR se efectuaron en un espectrómetro Vertex 70V (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemania) con un detector de cadmio-telurio con nitrógeno líquido (MCT). Se registraron interferogramas de ambos lados en el movimiento del interferómetro regresivo-progresivo a una tasa de datos de 80 kHz con una resolución espectral de 2 cm⁻¹, apodización Blackman-Harris de tres términos, corrección de fase Mertz y relleno de ceros 4 veces. Los

espectros de referencia se registraron como un promedio de 1000, los espectros de muestras de 200 interferogramas. Al registrar los espectros de canales simples de referencia del sensor blanco, sensor con 2-propanol, la superficie silanizada, los tampones, superficie recubierta con anticuerpo o caseína en estados de equilibrio se permitió una espectroscopia de diferencia de gran sensibilidad basada en la ley de Lambert-Beer ($E = -\log(I/I_0)$). La absorbancia del cambio de estado es el logaritmo decádico negativo de la relación de intensidad antes y después del cambio.

Flujo de trabajo: Los detalles de la preparación del sensor para el análisis espectroscópico de FTIR de la proteína Tau en CSF se publicaron anteriormente (WO 2015/121339; Nabers et al., Anal. Chem. Doi:10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016); Nabers et al., Journal of Biophotonics 9(3):224-34 doi:10.1002/jbio.201400145 (2016)). En síntesis, el volumen total de la celda de flujo, incluidos los tubos de conexiones, ascendió a 400 μ l. Para cada análisis, se funcionalizó con silano fresco un elemento sensor por muestra (Schartner et al., JACS 135(10):4079-87 doi: 10.1021/ja400253p (2013)) y anticuerpo. Antes del análisis, se saturó la superficie con una disolución bloqueante de caseína. Para detección de A β en CSF y plasma sanguíneo, se utilizó el anticuerpo monoclonal A8978 (Sigma Aldrich, aa 13-28). La captura de Tau fue provista por el anticuerpo Tau-5 monoclonal (Life Technology, aa 210-230). Para el análisis, se añadieron 50 μ l CSF o 150 μ l de EDTA-plasma al tampón circulante con un caudal de 1 ml/min, respectivamente.

Pretratamiento de los espectros: Por sustracción gradual de espectro de referencia se eliminó el vapor del agua. Los espectros fueron corregidos de la situación inicial.

Ejemplo 1: Distribución de la estructura secundaria de A β y proteína Tau para diferenciación precisa de DC y DAT.

El estudio realizado incluyó 300 muestras de 61 pacientes DC y 39 pacientes DAT. Los detalles sobre el diagnóstico diferencial de los pacientes se describieron previamente (Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016)). En general, el grupo de pacientes se separó en sujetos DC y DAT. El grupo DAT se sub-clasificó además en estados temprano, moderado y severo de la enfermedad de Alzheimer. Para un pequeño número de pacientes DC, se puso a disposición un diagnóstico diferencial que incluyó a pacientes que sufrían demencia no a causa de la enfermedad de Alzheimer, como enfermedad de Parkinson o demencia vascular. Para el análisis de la distribución de la estructura secundaria de A β y Tau en CSF y/o plasma, ambos biomarcadores se extrajeron del fluido respectivo con un sensor inmuno-infrarrojo, como lo describen Nabers et al. (Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016)). Por consiguiente, A β y Tau fueron capturados por separado del CSF o el plasma por el anticuerpo monoclonal inmovilizado en la superficie A8978 (aa13-28 de A β) y Tau-5 (aa210-230), respectivamente. La distribución de la estructura secundaria se indicó por la frecuencia máxima de la amida I registrada de A β y Tau. En el estudio anterior, se estableció un solo clasificador de umbral con una frecuencia del marcador discriminativo de 1643 cm^{-1} para diferenciación de DC y DAT. La misma banda del marcador se usó dentro del estudio actual. Primero se determinó la posición máxima de la amida I de A β de CSF para la muestra de cada paciente. Por lo tanto, una posición máxima debajo de 1643 cm^{-1} fue indicativa de DAT. Luego se identificó la posición máxima de la amida I de A β de EDTA-plasma sanguíneo. Finalmente, se detectó la posición máxima de la fracción de proteína Tau extraída en CSF. La banda del marcador discriminativo se definió de manera idéntica para ambos biomarcadores y ambos fluidos corporales a $<1643 \text{ cm}^{-1}$ indicativos de DAT. La distribución de la posición máxima de la amida I de los grupos DC y DAT demostró diferencias altamente significativas para A β de CSF (Kruskal-Wallis ANOVA; $p=2,5 \cdot 10^{-11}$; nivel de confianza $\beta=0,05$) y plasma sanguíneo ($p=3,4 \cdot 10^{-9}$) y difirió significativamente para Tau ($p=1,6 \cdot 10^{-3}$) de CSF (Fig. 2). Por lo tanto, se observó un desplazamiento más pequeño de la posición máxima de la amida I de Tau para sujetos DAT en comparación con A β . La posición máxima de la amida I media de Tau fue 1644 cm^{-1} para DC y 1642 cm^{-1} para el grupo DAT en comparación con A β de CSF con 1645 cm^{-1} para DC y 1641 cm^{-1} para sujetos DAT. El A β del plasma sanguíneo reveló un valor máximo medio de 1648 cm^{-1} para el grupo DC y 1641 cm^{-1} para el grupo DAT. En base a estas distribuciones, también se muestra en un gráfico de dispersión tridimensional de la Fig. 3 con un recuadro negro transparente que indica DAT, que el desempeño diagnóstico de cada biomarcador propiamente dicho se calculó otorgando precisión, sensibilidad y especificidad. Además, los análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC) se realizaron explorando el umbral entre 1630,5 cm^{-1} y 1660,5 cm^{-1} y determinando la sensibilidad y especificidad en cada número de onda. Similar a los resultados de Nabers et al., la precisión diagnóstica del análisis basado en A β fue la más alta con 90 % para CSF (Fig. 4A,D; especificidad 89 %, sensibilidad 92 %, AUC 0.90) según lo comparado con el análisis de la distribución de la estructura secundaria de A β en el plasma sanguíneo con 85 % (Fig. 4B,D; especificidad 90 %, sensibilidad 77 %, 0,85). En contraste, la diferenciación de DC y DAT basada en la distribución de la estructura secundaria de la proteína Tau en CSF solamente reveló una precisión diagnóstica de 68 % (Fig. 4C,D; especificidad 67 %, sensibilidad 69 %, AUC 0,67), indicando que la Tau sola no es un biomarcador apropiado para detección de DAT. Pero sumando los valores de los tres biomarcadores a un clasificador de voto mayoritario, es decir tomando una decisión diagnóstica basada en el panel de biomarcadores presentado (dos valores máximos debajo del umbral = enfermedad, dos valores máximos encima del umbral = sin DAT), el desempeño diagnóstico podría incrementarse a una especificidad de 95 %, sensibilidad de 90 %, y por lo tanto a una precisión total de 93 % en comparación con el diagnóstico clínico. Por consiguiente, se identificaron solamente 3 falsos positivos de 61 DC y 4 falsos negativos de 31 DAT.

Ejemplo 2: Un ensayo combinado para diagnóstico diferencial de DC y DAT.

5 El análisis de datos combinado proporcionó también el potencial de sub-clasificar ambos grupos diagnósticos. Esto se muestra esquemáticamente en la Fig. 5. Por ejemplo, A β de CSF y plasma demuestra una posición máxima de amida I superior o igual a 1643 cm⁻¹, pero la posición máxima de amida I en Tau es inferior a 1643 cm⁻¹, en este caso otro tipo de demencia podría potencialmente indicarse por el ensayo inmunoinfrarrojo combinado (Fig. 5). En contraste, cuando la posición máxima de la amida I de A β de CSF y plasma es inferior a la banda del marcador pero la posición máxima de Tau es superior, se exhibirá un estado temprano de DAT. Este procedimiento se aplicó a ambos grupos diagnósticos dentro de nuestro estudio. La posición máxima de la amida I de A β de CSF demostró en 10 69 % de todos los casos de DC una posición máxima superior que Tau de CSF. Este efecto se puede explicar por propiedades con mayores trastornos de la proteína Tau en comparación con A β . Por otra parte, en 25 % de todos los casos DC, la posición máxima fue inferior para A β y solamente en 6 % de todos los casos las posiciones máximas fueron idénticas. Esta relación cambió por completo para el grupo DAT. Allí solamente 31 % de todos los pacientes DAT produjeron una posición máxima de la amida I para A β superior a la de Tau, 62 % demostraron una 15 posición máxima de A β inferior (Fig. 6). Esto soporta la hipótesis de que la acumulación de A β es un evento temprano e iniciador en la progresión de la enfermedad de Alzheimer y está acompañado por la agregación de la proteína Tau.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico diferencial y la sub-clasificación de la enfermedad de Alzheimer en diferentes estadios de la enfermedad por análisis directo de la distribución de la estructura secundaria de una fracción del péptido amiloide-beta (A β) soluble y una fracción de la proteína Tau soluble en los fluidos corporales, que comprende las etapas de:

(a) conducir, en una primera celda de IR que comprende un primer elemento sensor infrarrojo que tiene un elemento de reflexión interno con un núcleo de un material transparente infrarrojo y por lo menos un receptor para el péptido A β directamente injertado a por lo menos una superficie de dicho núcleo, en donde dicho por lo menos un receptor para el péptido A β consiste en anticuerpos capaces de unirse en forma específica y conformacional independiente al péptido A β , y directamente injertado a por lo menos una superficie de dicho elemento de reflexión interno por silanización con enlaces cortos de silano o por tiolación con enlaces cortos de tiol, sometiendo a reacción grupos amina libremente accesibles de dicho por lo menos un receptor con grupos reactivos de amina en los enlaces cortos de silano/tiol, y bloqueando el resto de los grupos reactivos de amina en los enlaces cortos de silano/tiol con una sustancia bloqueante que no reacciona en forma cruzada con el péptido A β , por lo menos un flujo de un fluido corporal con un péptido A β soluble, emitir un haz de IR a través de dicha primera celda de IR y obtener un espectro infrarrojo a partir de allí;

(b) conducir, en una segunda celda de IR que comprende un segundo elemento sensor infrarrojo que tiene un elemento de reflexión interno con un núcleo de un material transparente infrarrojo y por lo menos un receptor para la proteína Tau directamente injertado a por lo menos una superficie de dicho núcleo, en donde dicho por lo menos un receptor para la proteína Tau consiste en anticuerpos capaces de unirse en forma específica y conformacional independiente a la proteína Tau, y directamente injertado a por lo menos una superficie de dicho elemento de reflexión interno por silanización con enlaces cortos de silano o por tiolación con enlaces cortos de tiol, sometiendo a reacción grupos amina libremente accesibles de dicho por lo menos un receptor con grupos reactivos de amina en los enlaces cortos de silano/tiol, y bloqueando el resto de los grupos reactivos de amina en los enlaces cortos de silano/tiol con una sustancia bloqueante que no reacciona en forma cruzada con la proteína Tau, por lo menos un flujo de un fluido corporal con la proteína Tau soluble, emitir un haz de IR a través de dicha segunda celda de IR, y obtener un espectro infrarrojo a partir de allí; y

(c) analizar los espectros infrarrojos obtenidos para determinar la distribución de la estructura secundaria del péptido A β soluble y de la proteína Tau soluble en los fluidos corporales para el diagnóstico diferencial, en donde un desplazamiento campo abajo de la banda de amida I del péptido A β y de la proteína Tau es indicativo del estadio de la enfermedad.

2. El método según la reivindicación 1, en donde:

(i) el material transparente infrarrojo de la primera y la segunda celdas IR se selecciona en forma independiente entre silicio, germanio, seleniuro de zinc, seleniuro de galio y diamante, y preferiblemente es germanio; y/o

(ii) la sustancia bloqueante que no reacciona en forma cruzada con el péptido A β o la proteína Tau se selecciona entre caseína, etanolamina, L-lisina, polietilenglicoles, albúminas y sus derivados.

3. El método según la reivindicación 1, en donde dichos primero y segundo elementos sensores infrarrojos comprenden un elemento de reflexión interno de germanio que tiene forma de trapecoide o paralelogramo.

4. El método según la reivindicación 3, en donde el elemento de reflexión interno:

(i) es un monocristal de germanio, preferiblemente un monocristal de germanio de corte trapecoide; y/o

(ii) proporciona más de un pasaje de luz infrarroja a través del elemento de reflexión; y/o

(iii) es además adecuado para el análisis alternativo o paralelo por otro método óptico, incluida la detección de fluorescencia a distintas longitudes de onda.

5. El método según la reivindicación 3 o 4, en donde los enlaces de silano y tiol incluyen enlaces de silano y tiol homogéneos, mezclas de enlaces de silano y mezclas de enlaces de tiol, y tienen una longitud de cadena del enlazador eficaz de no más de 20 átomos o no más de 15 átomos, preferiblemente:

los enlaces de silano tienen una de las siguientes fórmulas:

(i) $X_3Si-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-Z$,

(ii) $X_2R^1Si-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-Z$ o

(iii) $X(R^1)_2Si-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_{n'}-Z$,

y los enlazadores de tiol tienen la siguiente fórmula:

5 (iv) $WS-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_{n'}-Z$,

en donde W es R'S- o H, X en cada caso se selecciona en forma independiente entre halógeno y alcoxi C₁₋₆, n es un número entero entre 1 y 10, n' es un número entero entre 1 y 5, R¹ en cada caso se selecciona en forma independiente entre alquilo C₁₋₆, Y se selecciona entre un enlace químico, -O-, -CO-, -SO₂-, -NR²-, -S-, -SS-, -NR²CO-, -CONR²-, -NR²SO₂- y -SO₂NR²- (en donde R² es H o alquilo C₁₋₆), y Z es un grupo reactivo de amina incluidos -CO₂H, -SO₃H y sus derivados de éster.

6. El método según la reivindicación 5, en donde el elemento sensor infrarrojo es obtenible por:

15 (i) silanización y en los enlazadores de fórmulas (i) a (iii) X se selecciona en forma independiente entre grupos alcoxi C₁₋₆, preferiblemente entre grupos metoxi y etoxi, Y es -NHCO-, Z es -CO₂H o su derivado de éster, y n es un número entero entre 1 y 5 y n' es un número entero entre 1 y 3, preferiblemente n es 3 y n' es 2; o

20 (ii) tiolación y en los enlazadores de fórmula (iv) W es H, Y es un enlace químico, Z es -CO₂H o su derivado de éster, y n es un número entero entre 1 y 8 y n' es un número entero entre 1 y 5, preferiblemente n es 8 y n' es 4.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde:

25 (i) el receptor que se une al péptido Aβ es un anticuerpo que se une específicamente al epítipo central del péptido Aβ, incluido el anticuerpo A8978; o

(ii) el receptor que se une a la proteína Tau es un anticuerpo que se une específicamente al epítipo medio de Tau y a un epítipo presente en todas las variantes de Tau, incluido el anticuerpo Tau-5.

30 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el método da a conocer la diferenciación de la enfermedad de Alzheimer en los estadios de la enfermedad temprano/prodromal moderado y severo, y en donde:

35 (i) las posiciones máximas de amida I de los biomarcadores mencionados, Aβ de CSF, Aβ de plasma sanguíneo y Tau de CSF, están todas debajo del umbral discriminativo ($1643\text{ cm}^{-1} \pm 5\text{ cm}^{-1}$), lo cual es indicativo de un estadio de enfermedad severo,

40 (ii) las posiciones máximas de amida I de dos biomarcadores, una es Aβ de CSF o plasma sanguíneo, y la otra es Tau de CSF, debajo del umbral discriminativo ($1643\text{ cm}^{-1} \pm 5\text{ cm}^{-1}$), son indicativas de un estadio de enfermedad moderado,

45 (iii) las posiciones máximas de amida I de uno o dos biomarcadores (Aβ de CSF y/o plasma sanguíneo), pero no Tau de CSF, debajo del umbral discriminativo ($1643\text{ cm}^{-1} \pm 5\text{ cm}^{-1}$) es indicativa de un estadio de la enfermedad temprano.

50 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el diagnóstico diferencial proporciona un perfil clínico asegurado del tipo de demencia, preferiblemente el método comprende la detección de la distribución de la estructura secundaria de Aβ de CSF (A), Aβ del plasma sanguíneo (B), y Tau de CSF (C), lo más preferiblemente el método permite el diagnóstico diferencial de demencia de tipo Alzheimer (DAT) y (control de enfermedad), en donde los pacientes DAT se sub-clasifican en pacientes con DAT temprana, moderada y severa, y pacientes con DC separados en controles de salud, otras enfermedades y demencia por una causa distinta de la enfermedad de Alzheimer.

55 10. El método según la reivindicación 9, en donde:

(i) para ambos biomarcadores, (A) y (B) para Aβ y (C) para Tau, un umbral discriminativo ($1643\text{ cm}^{-1} \pm 5\text{ cm}^{-1}$) separa a pacientes con enfermedad de Alzheimer y DC; y/o

60 (ii) la combinación de (A), (B) y (C) proporciona un panel biomarcador aplicable para un diagnóstico DAT asegurado.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que proporciona información sobre el estado de enfermedad en base al análisis de los fluidos corporales, en donde un desplazamiento de la posición máxima de la banda de amida I de la proteína biomarcadora es un clasificador indicativo de la progresión de la enfermedad.

65 12. El método según la reivindicación 11, en donde un clasificador umbral con un valor de $1638\text{--}1648\text{ cm}^{-1}$ es un clasificador indicativo de la progresión de la enfermedad.

13. Un kit para el diagnóstico diferencial y la sub-clasificación de la enfermedad de Alzheimer en distintos estadios de enfermedad, que comprende un primero y un segundo elemento sensor infrarrojo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 5
14. Un dispositivo para el diagnóstico diferencial y la sub-clasificación de la enfermedad de Alzheimer en distintos estadios de enfermedad, en donde dicho dispositivo comprende un primero y un segundo elementos infrarrojos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 10
15. Uso del primero y el segundo elementos sensores infrarrojos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el kit según la reivindicación 13 o el dispositivo según la reivindicación 14 para el análisis directo de la distribución de la estructura secundaria de una fracción del péptido amiloide-beta ($A\beta$) soluble y una fracción de la proteína Tau soluble en los fluidos corporales.

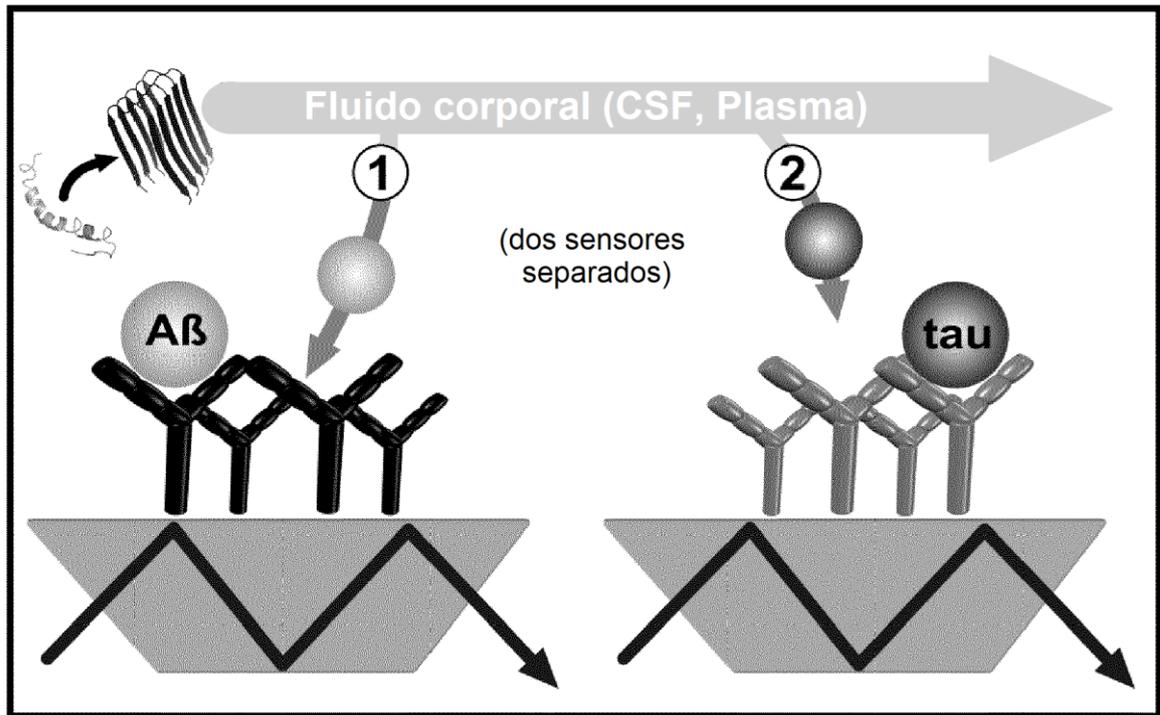


Fig. 1

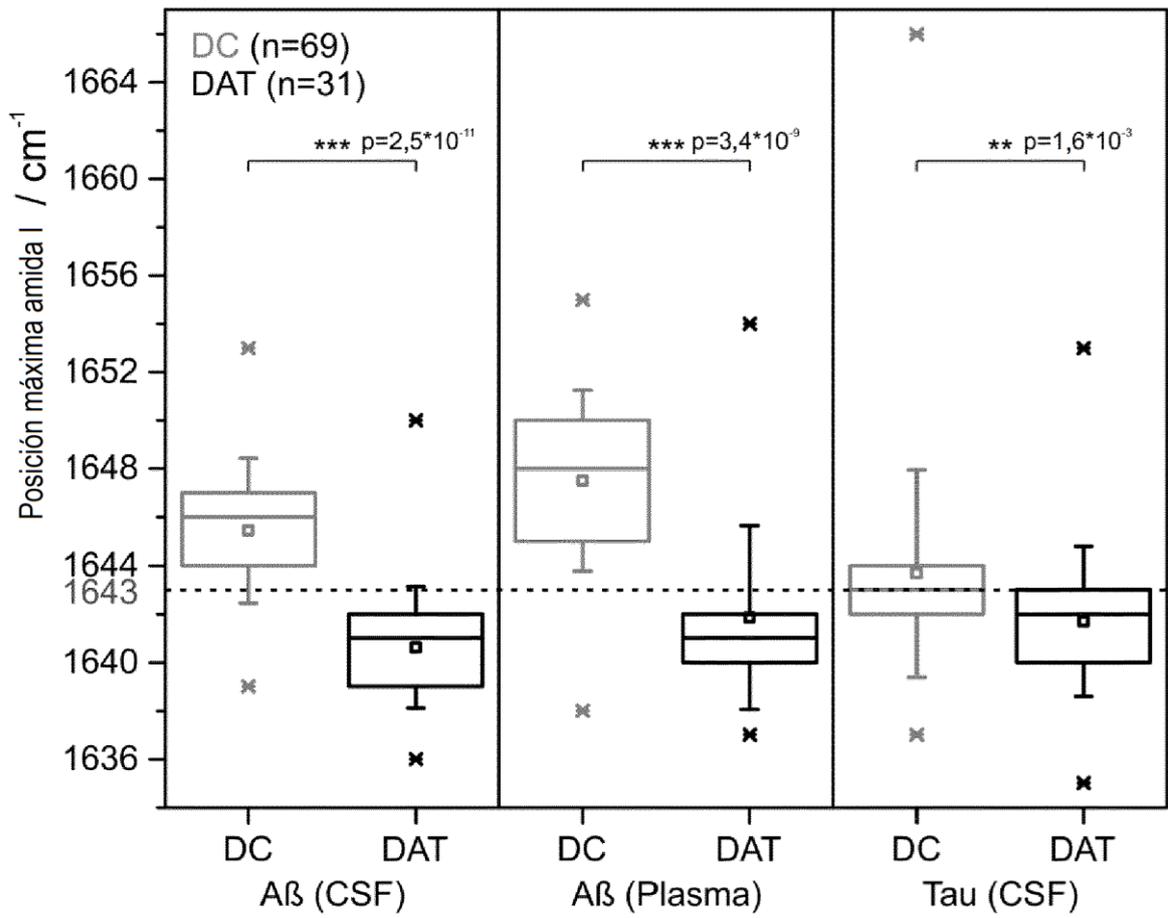


Fig. 2

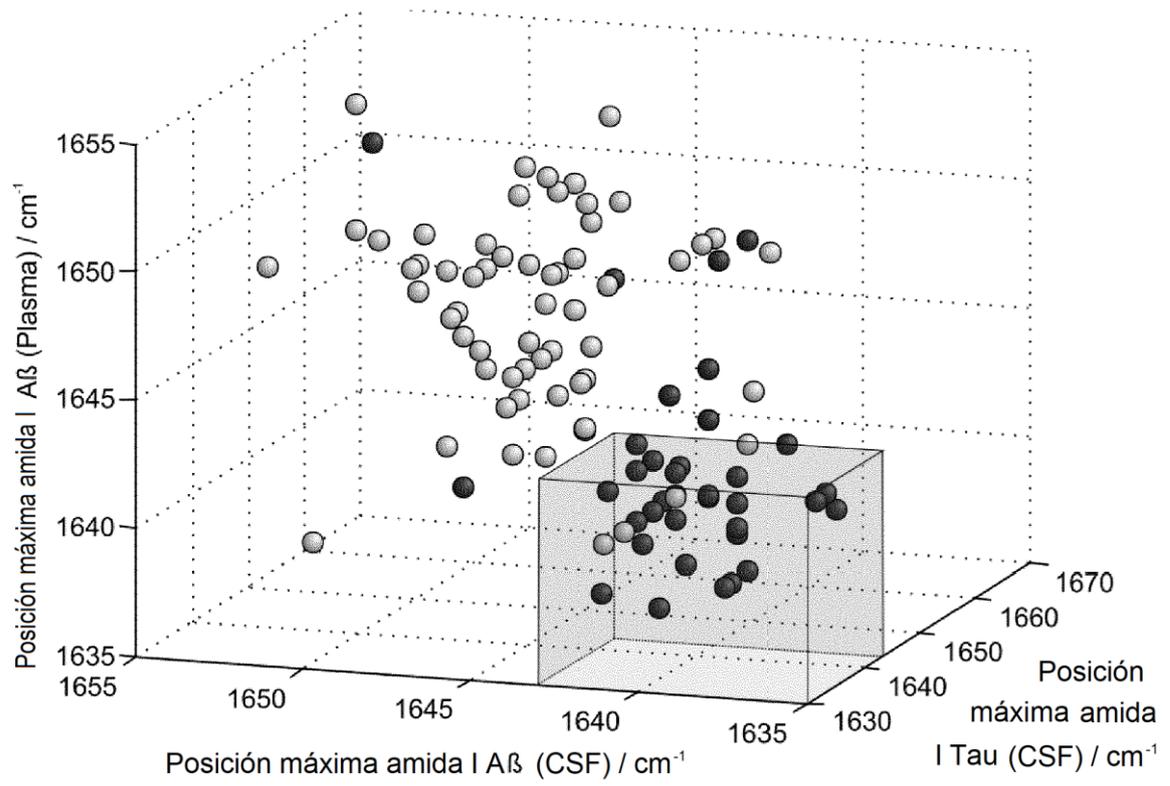


Fig. 3

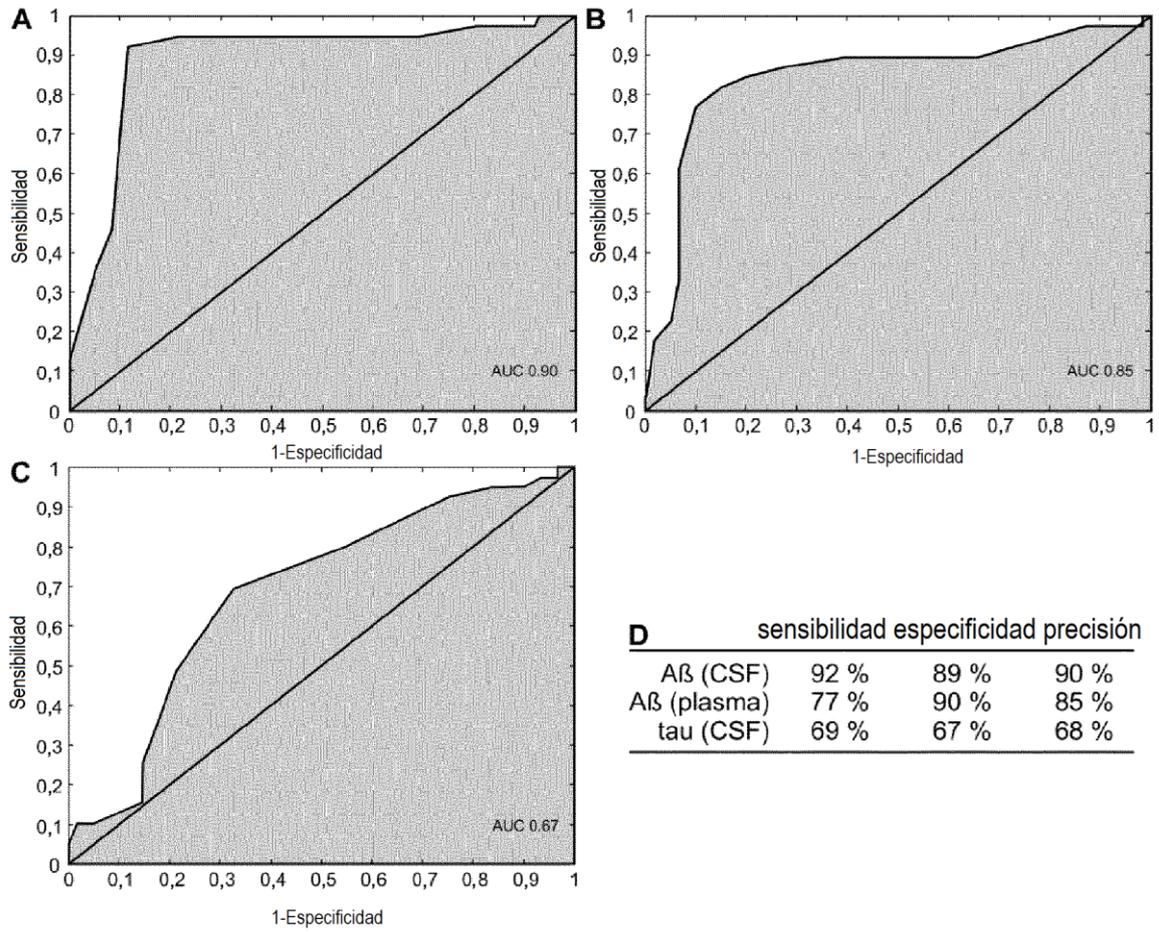


Fig. 4

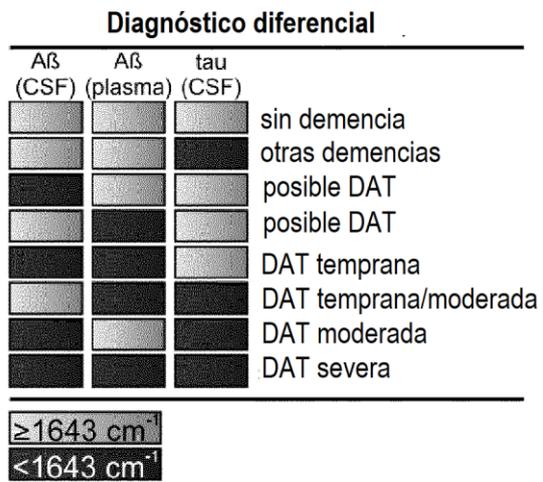


Fig. 5

