

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 106**

21 Número de solicitud: 201131370

51 Int. Cl.:

G01N 21/35 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

08.08.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.02.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
Serrano, 117
28006 Madrid ES;
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (25.0%);
FUNDACIÓN CIÉN (5.0%) y
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE
(20.0%)**

72 Inventor/es:

**CARMONA HERNÁNDEZ, Pedro;
TOLEDANO GASCA, Adolfo;
CALERO LARA, Miguel;
MARTÍNEZ MARTÍN, Pablo y
BERMEJO PAREJA, Félix**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **ANÁLISIS INFRARROJO DE FRACCIONES DE SANGRE PERIFÉRICA OBTENIDA PARA INDICAR DESARROLLO COGNITIVO ASOCIADO A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

57 Resumen:

Análisis infrarrojo de fracciones de sangre periférica obtenida para indicar desarrollo cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se refiere a un método de análisis espectroscópico infrarrojo de transmisión para determinar el grado de deterioro global cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer basado en analizar la región $3100-1300 \text{ cm}^{-1}$ del espectro infrarrojo de una muestra de sangre previamente obtenida y fraccionada. Preferentemente, la muestra de sangre fraccionada a analizar es una fracción de leucocitos.

Asimismo, es también objeto de la presente invención el empleo de dicho método para obtener una indicación de una condición de enfermedad de Alzheimer y/o una indicación del grado de deterioro cognitivo asociado a dicha enfermedad.

ES 2 396 106 A1

DESCRIPCIÓN

Análisis infrarrojo de fracciones de sangre periférica obtenida para indicar desarrollo cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La invención se refiere a un nuevo método de determinación de estructura proteica de lámina- β en leucocitos de sangre periférica obtenida mediante espectroscopía infrarroja de transmisión, y el sector principal de aplicación es el de la salud, y puede interesar también al sector comercial de la instrumentación espectroscópica infrarroja. Más concretamente, la invención se refiere a un método indicativo de la presencia o ausencia de la enfermedad de Alzheimer (EA) y/o su grado de desarrollo, basado en la espectroscopía infrarroja de transmisión.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 En los próximos 50 años se espera que la enfermedad de Alzheimer (EA) afecte a 100 millones de personas en el mundo. Es de sobra conocido que las características patofisiológicas más importantes de la enfermedad de Alzheimer son las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. El componente mayoritario de dichas placas es el péptido β -amiloide ($A\beta$). Este péptido de 39-43 aminoácidos es muy hidrofóbico, se libera en la escisión proteolítica de la proteína precursora amiloidea (APP), y se agrega para formar oligómeros. Estos oligómeros a su vez se agregan para formar fibras, que se depositan en el parénquima cerebral y originan las placas seniles (Haass 2004). Los efectos neurotóxicos del péptido $A\beta$ implican también cambios en la composición y estructura de las membranas neuronales, afectando a sus propiedades fisicoquímicas. Uno de los mayores retos respecto a esta enfermedad neurodegenerativa reside en la consecución de un método de diagnóstico precoz con vistas a la administración de un tratamiento adecuado. En la actualidad el diagnóstico definitivo más eficaz está limitado a un examen *post-mortem*, y el diagnóstico clínico se hace por exclusión tras estudiar el especialista si existe una demencia y no encontrar ningún síntoma o signo que explique la causa de la misma. Los métodos inmunoquímicos que utilizan anticuerpos, como se sabe son laboriosos y además no tienen una sensibilidad del 100% debido a la posible existencia de varias isoformas estructurales de los biomarcadores. Muchos son los problemas que plantea esta enfermedad, entre ellos el diagnóstico precoz y el seguimiento de la evolución de los enfermos, así como el diagnóstico definitivo *post-mortem* y la caracterización de los cambios neuropatológicos. Todos ellos requieren desarrollo de métodos sensibles y fiables, fáciles de realizar y repetir, y de bajo costo.

En relación con ello la espectroscopía infrarroja es una técnica bien establecida en los ámbitos industriales y de la investigación científica desde hace varias décadas. Sus ventajas frente a otras técnicas usuales son:

- 30 a. Se pueden analizar muestras en cualquier estado físico con una preparación sencilla y relativamente rápida, a diferencia de otras técnicas analíticas.
- b. Se precisan cantidades de muestra relativamente pequeñas.

Recientemente se ha aplicado esta técnica espectroscópica al análisis de fluido cerebroespinal para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (Griebe y cols. 2007), con sensibilidad y especificidad de aproximadamente 85 y 75% respectivamente. Sin embargo, la extracción de este fluido biológico no es tan fácil de realizar como una extracción sanguínea, aparte de las connotaciones psicológicas de la extracción de fluido cerebroespinal. La espectroscopía infrarroja se ha aplicado asimismo al análisis de tejido cerebral obtenido de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Rak y cols., 2007; Choo y cols., 1996; Fabian y cols., 1993), obteniéndose espectros con bandas características de péptidos amiloides situadas en el intervalo espectral de 1635-1624 cm^{-1} . No aparecen por tanto en la literatura trabajos de investigación en los que se aplique la espectroscopía infrarroja al análisis de componentes o fracciones de la sangre como criterio de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Por la posibilidad que tiene esta técnica de determinar la composición y estructura de componentes celulares y acelulares de la sangre, que es un fluido biológico de fácil extracción, y poseer las ventajas mencionadas anteriormente sobre otras técnicas, se ha aplicado en esta invención como método de diagnóstico de esta enfermedad.

Bibliografía

1. Choo, L.P.; Wetzel, D.L.; Halladay, W.C.; Jackson, M.; LeVine, S.M.; Mantsch, H.H. In situ characterization of β -amyloid in Alzheimer's diseased tissue by synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biophysical Journal* **71**, 1672-1679 (1996).
- 50 2. Fabian, H.; Choo, L.P.; Szendrei, G.I.; Jackson, M.; Halladay, W.C.; Otvos, L., J.; Mantsch, H.H. Infrared spectroscopic characterization of Alzheimer plaques. *Applied Spectroscopy* **47**, 1513-1518 (1993).
3. Griebe, M.; Daffertshofer, M.; Stroick, M.; Syren, M.; Ahmad-Nejad, P.; Neumaier, M.; Backhaus, J.; Hennerici, M.G.; Fatar, M. Infrared spectroscopy: A new diagnostic tool in Alzheimer disease. *Neuroscience Letters* **420**, 29-33 (2007).

4. Haass, C. Take five-Bace and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. *EMBO Journal*. **23**, 483-488 (2004).
5. Rak, M.; Del Bigio, M.R.; Mai, S.; Westaway, D.; Gough, K. Dense-core and diffuse A β plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy. *Biopolymers* **78**, 207-217 (2007).

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve Descripción de la Invención

La presente invención se refiere a un método de aplicación de la espectroscopía infrarroja de transmisión al análisis de muestras de sangre obtenida, preferentemente sangre periférica humana obtenida, para determinar el deterioro global cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer, y por tanto, para su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. El método requiere un fraccionamiento previo de muestras de sangre obtenida, que se recogen en tubos BD Vacutainer CPT con citrato sódico y se someten a centrifugación-filtración.

De la suspensión acuosa leucocitaria se depositan varios microlitros sobre un cristal por ejemplo de seleniuro de cinc, soporte de muestras para espectroscopía infrarroja, con el fin de obtener una película de estas células y medir su correspondiente espectro. También se pueden utilizar otros soportes de muestras insolubles en agua tales como fluoruro cálcico, sulfuro de cinc, fluoruro bórico. El espectro medido se trata matemáticamente para determinar la correspondiente concentración de estructura proteica en lámina- β , que está asociada a la EA, y someterlo además a análisis estadístico multivariante (PLS). Por razones de sensibilidad la determinación de la referida estructura proteica se ha realizado mediante los espectros infrarrojos expresados en segundas derivadas. El análisis PLS está basado en correlacionar el parámetro o escala que define los diferentes estadios de la enfermedad de Alzheimer (escala de deterioro global, GDS) con regiones espectrales que tienen relación con esta enfermedad, a saber, la región amida I (1700-1600 cm^{-1}), amida II (1600-1500 cm^{-1}), la comprendida entre 1500-1300 cm^{-1} (que incluye bandas de deformación angular C-H y de tensión de grupos carboxilato) y la de tensión C-H comprendida entre 3100 y 2800 cm^{-1} . Finalmente se mide el porcentaje de predicción en muestras de controles sanos y de pacientes para obtener la sensibilidad y especificidad del método. Un conocimiento más detallado de la invención se adquiere a continuación, donde se describen algunas figuras y ejemplos ilustrativos.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se basa en que los autores han observado, por una parte, que la estructura proteica en lámina- β es más abundante en leucocitos obtenidos de pacientes con la EA que de controles y, por otra parte, que existe cierta correlación entre la escala de deterioro global (GDS) de esta enfermedad y los perfiles espectrales de las regiones amida I (1700-1600 cm^{-1}), amida II (1600-1500 cm^{-1}), la comprendida entre 1500-1300 cm^{-1} (que incluye bandas de deformación angular C-H y de tensión de grupos carboxilato) y la de tensión C-H comprendida entre 3100 y 2800 cm^{-1} .

En el ámbito de la presente invención, la escala de deterioro global cognitivo (también referida en esta memoria como GDS) se refiere a la escala de deterioro global definida por Reisberg para describir detalladamente los estadios de la evolución de la enfermedad de Alzheimer. Dicha escala se compone de siete niveles, y en el ámbito de la presente invención se definen como:

- GDS-1: que corresponde a un individuo normal sin déficit cognitivo y una fase clínica normal;
- GDS-2: que corresponde a un individuo con un nivel de déficit cognitivo muy leve (deterioro cognitivo subjetivo) y una fase clínica de olvido;
- GDS-3: que corresponde a un individuo con un nivel de déficit cognitivo leve y una fase clínica de confusión precoz;
- GDS-4: que corresponde a un individuo con un nivel de déficit cognitivo moderado y una fase clínica de confusión tardía;
- GDS-5: que corresponde a un individuo con un nivel de déficit cognitivo moderadamente-grave y una fase clínica de demencia inicial;
- GDS-6: que corresponde a un individuo con un nivel de déficit cognitivo grave y una fase clínica de demencia leve;
- GDS-7: que corresponde a un individuo con un nivel de déficit cognitivo muy grave y una fase clínica de demencia grave.

A efectos de esta memoria, el grado GDS-3 se considera un nivel de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer leve (EA leve), los grados GDS-4 y GDS-5 se consideran un nivel de desarrollo de la enfermedad de

Alzheimer moderado (EA moderada) y los grados GDS-6 y GDS-7 se consideran un nivel de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer avanzado, severo o grave (EA grave).

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método espectroscópico infrarrojo para determinar deterioro global cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. registrar un espectro infrarrojo de transmisión a una primera muestra de sangre obtenida;
- b. obtener al menos un primer parámetro numérico a partir de al menos una señal del espectro de la región comprendida entre 1300 y 3100 cm^{-1} , incluidos ambos límites;
- c. comparar dicho al menos primer parámetro numérico de la etapa b con al menos un segundo parámetro numérico de referencia;
- 10 d. determinar, a partir de la comparación de la etapa anterior, si la muestra de sangre de la etapa a corresponde a una clase definida por:
 - I. no deterioro cognitivo,
 - II. deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer.

15 En un modo de realización, la muestra de sangre analizada es una muestra de sangre periférica humana. De manera preferida, dicha muestra es una fracción de sangre derivada del fraccionamiento de dicha sangre obtenida, y más preferentemente, una fracción celular (como por ejemplo eritrocitos, leucocitos o trombocitos) o una fracción acelular (plasma sanguíneo) de sangre periférica humana. En una realización aún más preferida, es una fracción de leucocitos de sangre periférica humana.

20 De manera general, y sin carácter limitante, la muestra de la fracción de sangre obtenida, apta para el análisis espectroscópico infrarrojo de la presente invención, se puede preparar previamente a la adquisición de los datos espectroscópicos de acuerdo a un procedimiento que comprende los siguientes pasos:

- a. preparar una suspensión acuosa de una fracción de sangre obtenida por centrifugación-filtración,
- 25 b. depositar y extender sobre un cristal de seleniuro de cinc, un volumen de la anterior suspensión acuosa comprendido entre 5 y 125 μL , incluidos ambos límites, y más preferiblemente entre 75 y 125 μL , incluidos ambos límites;
- c. evaporar completamente la suspensión depositada a baja temperatura, de manera preferida a temperaturas comprendidas entre 2 y 20 $^{\circ}\text{C}$, incluidos ambos límites, y más preferiblemente entre 2 y 10 $^{\circ}\text{C}$, incluidos ambos límites.

30 En una realización preferida diferente, el primer parámetro de la región espectral comprendida entre 3100 y 1300 cm^{-1} es un porcentaje del contenido de estructura β peptídica de la muestra de sangre obtenida a analizar.

Para calcular el porcentaje del contenido de estructura β peptídica, el procedimiento general puede comprender los siguientes pasos:

- 35 (a) expresar en segunda derivada en el dominio de frecuencias la región del espectro de infrarrojo 1700-1600 cm^{-1} (incluidos ambos límites) de la muestra de sangre obtenida problema;
- (b) identificar en el espectro de infrarrojo cada una de las bandas asociadas a estructura de tipo β peptídica en la región comprendida entre 1639-1623 cm^{-1} (incluidos ambos límites), cuyos valores de frecuencia coinciden con aquellos donde aparecen mínimos locales en dicho espectro expresado en segunda derivada; y
- 40 (c) multiplicar por cien la suma de las áreas de cada una de las bandas asociadas a estructura de tipo β peptídica en la región del espectro de infrarrojo comprendida entre 1639 y 1623 cm^{-1} (incluidos ambos límites), y dividir por el área total de dicho espectro en la región comprendida entre 1680 y 1623 cm^{-1} (incluidos ambos límites).

45 De modo alternativo y con la misma finalidad se puede proceder también como en las etapas (a), (b) y (c) anteriormente descritas, pero considerando en la etapa (a) el espectro infrarrojo resultante de una deconvolución de Fourier con el factor $\gamma = 10$.

Dicho porcentaje del contenido de estructura β -peptídica de la muestra problema de sangre obtenida puede servir como valor discriminante para clasificar dicha muestra en una clase I o en una clase II, según se definieron anteriormente, por comparación con un parámetro numérico de referencia, que sirve de valor límite entre ambas clases. Este parámetro numérico de referencia límite, es fruto de nuestros estudios estadísticos experimentales (como se describe en el ejemplo 3). De tal manera, que si el porcentaje del contenido de estructura β -peptídica es igual o inferior al 12%, la muestra de sangre obtenida problema pertenece a una clase I (sin deterioro cognitivo), y si es superior al 12% dicha muestra de sangre pertenece a una clase II (deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer). De acuerdo a esta clasificación del primer espectro infrarrojo, se obtiene un resultado con un 80% de sensibilidad y un 75% de especificidad, aproximadamente. Esta sensibilidad se refiere a la probabilidad de que una muestra de clase II sometida a un análisis por este método conduzca a un resultado positivo de clase II, y en términos porcentuales se calcula multiplicando por cien el cociente entre el número de aciertos de muestras de clase II y el número total de muestras de clase II analizadas. En cuanto a la especificidad, se refiere a la probabilidad de que una muestra de clase I sometida a dicho análisis conduzca a un resultado positivo de clase I, y en términos porcentuales se calcula multiplicando por cien el cociente entre el número de aciertos de muestras de clase I y el número total de muestras de clase I analizadas.

En otra realización preferida distinta de las anteriores, dicho al menos segundo parámetro numérico de referencia se obtiene en las mismas condiciones que el primer parámetro numérico del primer espectro, correspondiente a la muestra de sangre problema, a partir de un segundo espectro de infrarrojo registrado de al menos una segunda muestra de sangre de referencia obtenida de cada una de las clases definidas en I y II.

- 5 En una realización más preferida de la anterior:
- la clase I de dicha segunda muestra de sangre de referencia, comprende al menos la subclase definida por I-a, que corresponde con una subclase de no deterioro cognitivo, sin la enfermedad de Alzheimer, con un valor de GDS-1 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg,
 - y la clase II de dicha segunda muestra de sangre de referencia comprende al menos las subclases definidas por:
 - 10 II-a. deterioro cognitivo leve asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-3 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg,
 - II-b. deterioro cognitivo moderado asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-4 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg,
 - 15 II-c. deterioro cognitivo moderadamente grave asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-5 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg,
 - II-d. deterioro cognitivo grave asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-6 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg,
 - II-e. deterioro cognitivo muy grave asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-7 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg.

20 Mas preferiblemente, dicho primer parámetro numérico son los valores de las absorbancias de cada una de las frecuencias de las regiones comprendidas entre 1500-1300 cm^{-1} , 1600-1500 cm^{-1} , 1700-1600 cm^{-1} , y 3100-2800 cm^{-1} del espectro de la primera muestra de sangre, y dicho segundo parámetro numérico de referencia de cada una de las subclases definidas en I-a, II-a, II-b, II-c, II-d y II-e son los valores de las absorbancias de cada una de las frecuencias de las regiones comprendidas entre 1500-1300 cm^{-1} , 1600-1500 cm^{-1} , 1700-1600 cm^{-1} , y 3100-2800 cm^{-1} del espectro de cada muestra de sangre de referencia. En una realización aún más preferida, dichos valores de las absorbancias se determinan a partir del espectro previamente normalizado respecto a la absorbancia de la banda amida I en la región 1700-1600 cm^{-1} , y referido a un mismo valor de absorbancia en la frecuencia de 1800 cm^{-1} .

- 30 Aún más preferiblemente, la etapa de comparación comprende un análisis multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS) que utiliza:
- como variables independientes los valores de las absorbancias de cada una de las frecuencias de las regiones comprendidas entre 1500-1300 cm^{-1} , 1600-1500 cm^{-1} , 1700-1600 cm^{-1} , y 3100-2800 cm^{-1} del espectro de la primera muestra de sangre obtenida y los valores de las absorbancias de cada una de las frecuencias de las regiones comprendidas entre 1500-1300 cm^{-1} , 1600-1500 cm^{-1} , 1700-1600 cm^{-1} , y 3100-2800 cm^{-1} del espectro de cada muestra de sangre obtenida de referencia;
 - y como variable dependiente el valor de GDS numérico en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg que corresponde a la subclase según se define en I-a, II-a, II-b, II-c, II-d y II-e de dicha segunda muestra de sangre de referencia.

40 Sin limitar el ámbito de la invención y a modo de ejemplo, el procedimiento de la invención puede comprender los siguientes pasos:

- 1) Obtención de una fracción de leucocitos de sangre periférica mediante centrifugación-filtración.
- 2) Obtención de una película de leucocitos sobre un cristal de seleniuro de cinc apta para medida de espectros infrarrojos de transmisión.
- 45 3) Medida de espectros infrarrojos de la película leucocitaria y subsiguiente tratamiento matemático de espectros para: (a) la determinación de estructuras proteicas en lámina- β ; y (b) la realización de análisis PLS que correlaciona los valores GDS de las muestras con sus perfiles espectrales.

50 La determinación de estructuras proteicas en lámina- β se basa en la presencia de péptidos amiloideos, y que aparecen en diversos tejidos biológicos de pacientes con la EA. Por su predominante estructura en lámina- β , que es característica de ellos, se puede determinar por espectroscopía infrarroja por dos procedimientos: i) cualitativamente y ii) cuantitativamente, como sigue:

- i. *Cualitativamente*. Las proteínas y polipéptidos con estructura β generan bandas de absorción infrarroja en el intervalo 1640-1623 cm^{-1} , lo que se ha demostrado mediante espectros sobre patrones de este tipo de biomoléculas (Barth, *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 1073-1101 (2007); Barth y Zscherp, *Quart. Rev. Biophysics*, 35, 369-430 (2002); Haris y Chapman, *Biopolymers*, 37, 251-263 (1995)). Por consiguiente, dado que los péptidos amiloideos asociados a la EA poseen estructura β polipeptídica (Rak y cols., *Biopolymers*, 78, 207-217 (2007); Choo y cols., *Biophys. J.*, 71, 1672-1679 (1996); Fabian y cols., *Appl. Spectrosc.*, 47, 1513-1518 (1993)), la detección de un aumento relativo de esta estructura respecto a los controles hay que atribuirla a la presencia de estos biomarcadores de la EA. Sobre la base de las señales espectroscópicas medidas y cantidades de muestras obtenidas, mediante esta técnica infrarroja se pueden detectar cantidades de estos

péptidos en sangre menores que 10 µg/ml, que es del mismo orden de magnitud que la sensibilidad de la espectroscopía de fluorescencia y ultravioleta (Brown y cols., *J. Lab. Clin. Med.*, 137, 5-13 (2001)). Este nivel de detección es debido, por una parte, al procedimiento de obtención de la fracción celular leucocítica, y por otro lado a que los péptidos amiloideos adoptan una estructura predominantemente β (Hiramatsu y Kitagawa, *Biochim. Biophys. Acta*, 1753, 100-107 (2005); Zandomenighi y cols., *Protein Science*, 13, 3314-3321 (2004); Choo y cols., *Biophys. J.*, 71, 1672-1679 (1996); Fabian y cols., *Appl. Spectrosc.*, 47, 1513-1518 (1993)). Aunque estos péptidos se hacen visibles con una intensidad débil en forma de hombro, el uso de la espectroscopía de segundas derivadas en el dominio de frecuencias espectrales revelan inequívocamente la presencia de estructura polipeptídica β, como se ilustra más adelante.

- ii. *Cuantitativamente*. Consiste en medir los porcentajes de estructura β existentes en muestras de sangre obtenida procedentes de pacientes con la EA (y que se corresponderían con muestras de sangre obtenida conocidas de clase II) y comparar dichos porcentajes con los obtenidos de muestras negativas controles (es decir, muestras de sangre obtenida conocidas de clase I). Con este fin, y por razones de sensibilidad, se ha considerado en esta invención la región amida I (1700-1600 cm⁻¹) expresada en su espectro de segunda derivada. El porcentaje de estructura β se determina como porcentaje de área de las bandas situadas en el intervalo 1639-1623 cm⁻¹ respecto al área total del perfil espectral entre aproximadamente 1680-1623 cm⁻¹. Las áreas de las bandas individuales se pueden calcular mediante los conocidos métodos de ajuste de perfiles por mínimos cuadrados o mediante integración de área encerrada por un perfil espectral entre dos frecuencias determinadas y una línea de base que corta a dicho perfil en esas dos frecuencias. Se trata de métodos relativamente simples que están incluidos en los programas informáticos de la instrumentación espectroscópica comercial actual. Se ha de señalar que, dada la posible interferencia del vapor de agua atmosférico en la región amida I de las muestras proteicas, es necesario restar a éstos el espectro del vapor de agua medido en las mismas condiciones instrumentales que las muestras de leucocitos. Asimismo, y para eliminar posible influencia del ruido en los perfiles espectrales a medir, es necesario obtener espectros con buena relación señal/ruido resultantes de promediar al menos 32 barridos espectrales.

Un segundo aspecto de la invención se refiere al método de la presente invención para obtener una indicación de la presencia o ausencia de una condición de enfermedad de Alzheimer en una muestra de sangre obtenida, en base a la clasificación de dicha muestra en las clases o subclases definidas en esta memoria. De manera que, si una muestra de sangre analizada por este método es clasificada como clase I o subclase I-a es indicativo de una condición de ausencia de EA. Del mismo modo, si dicho análisis espectroscópico clasifica una muestra de sangre como clase II, o cualquiera de sus subclases II-a, II-b, II-c, II-d y II-e, dicho análisis es indicativo de una condición de presencia de EA.

Es asimismo objeto de la presente invención, el método basado en análisis estadístico multivariante PLS para obtener una indicación del grado de deterioro global cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer en una muestra de sangre obtenida. En este caso, el grado de deterioro global cognitivo está directamente correlacionado con la clasificación en subclases I-a, II-a, II-b, II-c, II-d y II-e, permitiendo indicar el valor de GDS correspondiente a la muestra de sangre obtenida analizada.

De este modo, el método de la presente invención puede utilizarse con fines clínicos, para valorar a un individuo de interés a efectos de su diagnóstico y/o su grado de desarrollo en la enfermedad de Alzheimer, a partir de una muestra de sangre previamente obtenida de dicho individuo.

Un último aspecto de la invención hace referencia a un kit o estuche de obtención de una muestra para medida espectroscópica del deterioro global cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer que comprende al menos un tubo de fraccionamiento de sangre y al menos un cristal soporte de muestra insoluble en agua apto como ventana para espectroscopía infrarroja de transmisión en el intervalo 3100-1300 cm⁻¹.

EXPLICACIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

Figura 1. Espectros infrarrojos de transmisión, en la región 1800-1100 cm⁻¹, de muestras de leucocitos de sangre periférica obtenida de un control sano (*superior*) y de un paciente de la EA con GDS-7 (*inferior*).

Figura 2. Espectros infrarrojos de segundas derivadas, en la región 1700-1600 cm⁻¹, de muestras de leucocitos de sangre periférica obtenida de un control sano (*superior*) y de un paciente de la EA con GDS 7 (*inferior*).

Figura 3. Porcentajes de estructura proteica β en muestras de leucocitos de sangre obtenida de controles sanos (Control joven y Control senil) y de pacientes de la EA con valores de GDS leve (GDS-3), moderado (GDS-4 y GDS-5) y severo (GDS-6 y GDS-7). Los resultados de cada grupo están expresados por su valor medio ± error estándar de la media.

Figura 4. Espectros infrarrojos de transmisión, en la región 3100-1100 cm⁻¹, de muestras de leucocitos de sangre periférica obtenida de un control sano (*superior*) y de un paciente de la EA con GDS-7 (*inferior*).

Figura 5. Comparación entre los valores reales y los calculados o predichos de GDS, y su ajuste a regresión lineal $Y = A + B \cdot X$, donde $A = 1,7 \pm 0,4$; $B = 0,71 \pm 0,1$ y $R = 0,70$.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Esta invención se ilustra con más detalle en los ejemplos siguientes.

5 Ejemplo 1

Procedimiento para la obtención de fracción de leucocitos de sangre periférica.

Para obtener la fracción leucocitaria a partir de una muestra de sangre obtenida, se procede de acuerdo a los siguientes pasos:

10 a) Se toman 4 mL de sangre obtenida de extracciones de sangre venosa de controles sanos y de pacientes con la EA en un tubo BD Vacutainer CPT con citrato sódico. Este tipo de tubos tiene un gradiente fluido y un gel de barrera para separar en la parte inferior los eritrocitos y los neutrófilos, por centrifugación-filtración, dejando en la parte superior los linfocitos y monocitos (dos tipos de células leucocitarias sanguíneas). Se centrifuga el tubo a 1650g durante 20 minutos a 4°C.

15 b) Se recoge el sobrenadante, se lava el tubo con 8 mL de tampón fosfato salino (PBS), y el conjunto de sobrenadante y líquido de lavado se centrifuga a 1000g durante 10 minutos a 4°C.

c) Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 10 mL de PBS que se centrifugan después a 1000g durante 10 minutos a 4°C.

d) Se descarta el sobrenadante, se resuspende el sedimento en 1 mL de PBS y se centrifuga a 1400g durante 10 minutos a 4°C.

20 e) Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 500 μ L de PBS. Esta suspensión acuosa se utiliza para la preparación de muestras para espectroscopía infrarroja.

Ejemplo 2

Obtención de una película de leucocitos sobre un cristal de seleniuro de cinc para posterior análisis infrarrojo.

25 De la suspensión madre de leucocitos preparada según el procedimiento indicado en el ejemplo 1 se toman con una micropipeta aproximadamente 100 microlitros, que se depositan sobre un cristal de seleniuro de cinc utilizado como ventana de transmisión para espectroscopía infrarroja.

30 La utilización de seleniuro de cinc, que es insoluble en agua, tiene por objeto obtener espectros en un intervalo espectral lo más amplio posible ($4000-500 \text{ cm}^{-1}$), a diferencia de lo que ocurre con los cristales de fluoruro cálcico que presentan en el infrarrojo una ventana más estrecha ($4000-1000 \text{ cm}^{-1}$). Otras ventanas para espectroscopía infrarroja de transmisión insolubles en agua, aptas para analizar el intervalo espectral $3100-1300 \text{ cm}^{-1}$ pueden ser igualmente válidas, como por ejemplo pueden ser sin carácter limitante ventanas de fluoruro bórico o de sulfuro de cinc.

35 Los 100 microlitros depositados sobre el cristal de seleniuro de cinc se dejan evaporar a 4°C. Tras extenderlos con una espátula para cubrir una superficie de al menos 1 cm^2 y de esta manera evitar en lo posible que la película leucocitaria resulte demasiado gruesa y genere por tanto dispersión (scattering) acompañada por un fondo espectral inclinado que influya en la exactitud de las medidas. Además y en relación con ello, un grosor adecuado de esta película leucocitaria debe generar una banda amida I cuyo máximo se sitúe por encima del 10% de transmisión.

Ejemplo 3

40 *Medida de la concentración de estructura proteica en lámina- β mediante espectroscopía infrarroja de segundas derivadas.*

45 Siguiendo el procedimiento indicado anteriormente para la preparación de película de leucocitos, se deposita aproximadamente una muestra de 100 microlitros de suspensión acuosa de leucocitos de cada muestra sobre cristales de seleniuro de cinc, para la que, tras posterior evaporación, se mide su espectro infrarrojo de transmisión en un espectrómetro Perkin-Elmer 1725X. Cada espectro obtenido es el resultado del promedio de 32 barridos con una resolución de 2 cm^{-1} y de restar el espectro del vapor de agua para eliminar posibles interferencias particularmente en las regiones amida I ($1700-1600 \text{ cm}^{-1}$) y Amida II ($1560-1520 \text{ cm}^{-1}$). La Figura 1 incluye espectros en la región $1800-1100 \text{ cm}^{-1}$ procedentes de una muestra analizada de sangre obtenida de un control sano y de un paciente de la EA con GDS 7. Estos presentan una gran similitud, y de ahí la necesidad de recurrir a sus espectros expresados en segundas derivadas que se incluyen en la Figura 2. Se ha de señalar que una diferencia importante

entre estos dos últimos espectros reside en la región donde aparecen bandas originadas por estructuras β de polipéptidos y proteínas ($1640-1620\text{ cm}^{-1}$). El aumento de intensidad de estas bandas en muestras de pacientes con la EA puede atribuirse a la presencia de péptidos amiloides. Con el fin de determinar las concentraciones relativas de esta estructura en muestras de sangre obtenidas procedentes de pacientes de la EA y compararlas con las procedentes de individuos sanos, se midieron éstas en muestras de leucocitos obtenidos de un grupo de controles y pacientes con diversos grados GDS de esta enfermedad. Este grupo de muestras de sangre obtenida se indica en la Tabla 1, en la que se incluyen los valores del criterio GDS para cada grupo de pacientes y controles estudiados, isoformas (2, 3 y 4) de la apoproteína E y sexo. El grupo llamado control joven incluye a individuos sanos (GDS-1) con edad comprendida entre 20 y 30 años, a diferencia del grupo llamado control senil y los grupos con la enfermedad de Alzheimer que corresponden todos ellos a una edad superior a 65 años.

Tabla 1

GRUPOS	GRADO	Pacientes Totales	APO E							SEXO	
			2/2	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4	ND	♂	♀
Control joven	GDS 1	6	1	0	0	3	1	0	1	1	5
Control senil	GDS 1	11	0	2	1	6	2	0	0	4	7
EA leve	GDS 3	8	0	0	1	6	1	0	0	2	6
EA moderada	GDS 4	6	0	0	0	4	2	0	0	2	4
	GDS 5	12	0	0	0	4	5	2	1	2	10
EA grave	GDS 6	10	0	1	0	5	4	0	0	3	7
	GDS 7	11	0	0	0	5	6	0	0	1	10

Los porcentajes de estructura β medidos como se recogen en la descripción detallada, se incluyen en la Figura 3 tras reagruparlos en cinco grupos o niveles de la EA (según el criterio GDS), a saber, controles jóvenes, controles seniles, EA leve, EA moderado, y avanzado o severo.

De estos resultados se desprende, por una parte, que no hay una clara diferencia entre los niveles de estructura proteica β de controles jóvenes y controles seniles, y por otro lado que las concentraciones medias de cada uno de los grupos con la EA son superiores a la de cualquier grupo de controles. Las correspondientes curvas ROC (acrónimo de Característica Operativa del Receptor) que se han obtenido para las muestras de la Tabla 1, y que expresan la sensibilidad en función de la especificidad, permiten atribuir al mencionado procedimiento espectroscópico de determinación de estructuras proteicas en lámina- β una especificidad de aproximadamente un 80% para una sensibilidad de aproximadamente un 90%.

Ejemplo 4

Análisis estadístico multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS) de espectros infrarrojos de leucocitos.

Se ha llevado a cabo un análisis estadístico multivariante PLS a partir del grupo de muestras indicadas en la Tabla 1. Con este fin se consideraron las regiones espectrales de tensión C-H ($3020-2830\text{ cm}^{-1}$) y la de $1720-1350\text{ cm}^{-1}$ que comprende las bandas intensas Amida I y amida II, y las bandas de intensidad media hacia 1450 y 1400 cm^{-1} . Los espectros sometidos a este tratamiento estadístico fueron el resultado de corregir la línea de base como se ilustra en la Figura 4, normalizarlos respecto a la altura de la banda amida I y referirlos todos a la misma absorbancia para la frecuencia de 1800 cm^{-1} . Se consideró como variable dependiente el criterio GDS de la EA, y como variables independientes las absorbancias en cada una de las frecuencias de las regiones mencionadas anteriormente. Para predecir los valores de GDS se realizó una valoración cruzada considerando todas las muestras excepto una para el modelo analítico, y la muestra excluida se utilizó para predecir su valor de GDS. Este tipo de predicción con valoración cruzada se realizó considerando un máximo de doce componentes para cada una de las muestras integrantes del grupo de la Tabla 1. Los resultados se muestran en la Figura 5, que muestra los valores predichos de los GDS frente a los valores reales. En esta figura se advierte que para algunas muestras controles (GDS-1) se obtienen unos valores predichos de GDS superiores a 1, e inversamente, para algunas muestras asociadas a la EA el método PLS predice unos valores de GDS alrededor de 1 ó 2, que son valores que se pueden confundir con los

5 de los controles. Estos resultados implican una sensibilidad (90%) y especificidad (65%) del método que son similares a las del procedimiento de determinación de estructura proteica β . En este caso la sensibilidad se refiere a la probabilidad de que una muestra de una subclase de tipo II (II-a, II-b, II-c, II-d o II-e) sometida a un análisis por este método conduzca a un resultado positivo de subclase II y en porcentaje se calcula como el número de aciertos de muestras de tipo II dividido por el número total de muestras de tipo II analizadas y multiplicando por cien el cociente resultante. En cuanto a la especificidad, se refiere a la probabilidad de que una muestra de subclase I-a sometida a análisis por este método conduzca a un resultado positivo de una subclase de tipo I-a, y en porcentaje se calcula como el número de aciertos de muestras de subclase I-a dividido por el número total de muestras de subclase I-a analizadas y multiplicando por cien el cociente resultante.

REIVINDICACIONES

1. Método espectroscópico infrarrojo para determinar deterioro global cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - a. registrar un espectro infrarrojo de transmisión a una primera muestra de sangre obtenida;
 - 5 b. obtener al menos un primer parámetro numérico a partir de al menos una señal del espectro de la región comprendida entre 3100 y 1300 cm^{-1} , incluidos ambos límites;
 - c. comparar dicho al menos primer parámetro numérico de la etapa 1b con al menos un segundo parámetro numérico de referencia;
 - d. determinar a partir de la comparación de la etapa anterior si la muestra de sangre de la etapa 1a corresponde a una clase definida por:
 - 10 I. no deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer,
 - II. deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer;
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la primera muestra de sangre obtenida es una muestra obtenida de sangre periférica humana.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la primera muestra de sangre es una muestra de una fracción de sangre obtenida seleccionada entre una fracción celular y una fracción acelular.
 - 15 4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque la fracción de sangre obtenida es una fracción de leucocitos de sangre periférica humana.
 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, caracterizado porque la muestra de una fracción de sangre obtenida se prepara siguiendo un procedimiento que comprende:
 - 20 a. preparar una suspensión acuosa de una fracción de sangre obtenida por centrifugación-filtración,
 - b. depositar y extender sobre un cristal de seleniuro de cinc para espectroscopía infrarroja un volumen de la anterior suspensión acuosa comprendido entre 5 y 125 μL , incluidos ambos límites,
 - 25 c. evaporar completamente la suspensión depositada a temperaturas comprendidas entre 2 y 20 $^{\circ}\text{C}$, incluidos ambos límites,
 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicho primer parámetro numérico es un porcentaje del contenido de estructura β peptídica de la muestra de sangre obtenida.
 7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque el porcentaje del contenido de estructura β peptídica se obtiene por un procedimiento que comprende:
 - 30 a. expresar en segunda derivada en el dominio de frecuencias una región del espectro de infrarrojo comprendida entre 1700 y 1600 cm^{-1} , incluidos ambos límites;
 - b. identificar cada una de las bandas asociadas a estructura β peptídica en la región del espectro infrarrojo comprendida entre 1640 y 1620 cm^{-1} , incluidos ambos límites;
 - 35 c. calcular el porcentaje de estructura β peptídica multiplicando por cien la suma de las áreas de cada una de las bandas asociadas a estructura de tipo β peptídica en la región del espectro infrarrojo comprendida entre 1639 y 1623 cm^{-1} , incluidos ambos límites, y dividiendo por el área total de dicho espectro en la región comprendida entre 1680 y 1623 cm^{-1} , incluidos ambos límites.
 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado porque el porcentaje del contenido de estructura β peptídica del espectro infrarrojo clasifica la primera muestra de sangre obtenida según la siguiente relación:
 - 40 a. muestra de sangre correspondiente a una clase I si el porcentaje del contenido de estructura β peptídica es igual o inferior al 12%;
 - b. muestra de sangre correspondiente a una clase II si el porcentaje del contenido de estructura β es superior al 12%;

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el al menos segundo parámetro numérico de referencia se obtiene en las mismas condiciones que el primer parámetro de la etapa 1b, a partir de un segundo espectro de infrarrojo registrado en al menos una segunda muestra de sangre de referencia obtenida de cada una de las clases definidas en I y II.
- 5 10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque :
- a. la clase I de dicha segunda muestra de sangre obtenida de referencia comprende al menos la subclase definida por:
- I-a. no deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-1 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg,
- 10 b. la clase II de dicha segunda muestra de sangre de referencia comprende al menos las subclases definidas por:
- II-a. deterioro cognitivo leve asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-3 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg,
- II-b. deterioro cognitivo moderado asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-4 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg,
- 15 style="padding-left: 40px;">II-c. deterioro cognitivo moderadamente grave asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-5 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg,
- II-d. deterioro cognitivo grave asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-6 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg,
- 20 style="padding-left: 40px;">II-e. deterioro cognitivo muy grave asociado a la enfermedad de Alzheimer con un valor de GDS-7 en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg.
11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho primer parámetro numérico son los valores de las absorbancias de cada una de las frecuencias de las regiones comprendidas entre $1500-1300\text{ cm}^{-1}$, $1600-1500\text{ cm}^{-1}$, $1700-1600\text{ cm}^{-1}$, y $3100-2800\text{ cm}^{-1}$ del espectro de la primera muestra de sangre, y dicho segundo parámetro numérico de referencia de cada una de las clases definidas en I-a, II-a, II-b, II-c, II-d y II-e son los valores de las absorbancias de cada una de las frecuencias de las regiones comprendidas entre $1500-1300\text{ cm}^{-1}$, $1600-1500\text{ cm}^{-1}$, $1700-1600\text{ cm}^{-1}$, y $3100-2800\text{ cm}^{-1}$ del espectro de cada muestra de sangre de referencia.
- 25 12. Método según la reivindicación 11, caracterizado porque los valores de las absorbancias de cada una de las frecuencias de las regiones comprendidas entre $1500-1300\text{ cm}^{-1}$, $1600-1500\text{ cm}^{-1}$, $1700-1600\text{ cm}^{-1}$, y $3100-2800\text{ cm}^{-1}$ se determinan a partir del espectro previamente normalizado respecto a la absorbancia de la banda amida I en la región $1700-1600\text{ cm}^{-1}$, y referido a un mismo valor de absorbancia en la frecuencia de 1800 cm^{-1} .
- 30 13. Método según la reivindicación 12, caracterizado porque la comparación de la etapa 1d comprende un análisis multivariante de mínimos cuadrados parciales que utiliza:
- 35 - como variables independientes los valores de las absorbancias de cada una de las frecuencias de las regiones comprendidas entre $1500-1300\text{ cm}^{-1}$, $1600-1500\text{ cm}^{-1}$, $1700-1600\text{ cm}^{-1}$, y $3100-2800\text{ cm}^{-1}$ del espectro de la primera muestra de sangre y los valores de las absorbancias de cada una de las frecuencias de las regiones comprendidas entre $1500-1300\text{ cm}^{-1}$, $1600-1500\text{ cm}^{-1}$, $1700-1600\text{ cm}^{-1}$, y $3100-2800\text{ cm}^{-1}$ del espectro de cada muestra de sangre de referencia;
- 40 - y como variable dependiente el valor de GDS numérico en la escala de deterioro global cognitivo de Reisberg que corresponde a la subclase definida en I-a, II-a, II-b, II-c, II-d y II-e de dicha segunda muestra de sangre de referencia.
- 45 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para obtener una indicación de la presencia o ausencia de una condición de enfermedad de Alzheimer en una muestra de sangre obtenida.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 para obtener una indicación del grado de deterioro global cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer en una muestra de sangre obtenida.
- 50 16. Kit de obtención de una muestra para medida espectroscópica del deterioro global cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer que comprende al menos un tubo de fraccionamiento de sangre y al menos un cristal soporte de muestra insoluble en agua apto como ventana para espectroscopía infrarroja de transmisión en el intervalo $3100-1300\text{ cm}^{-1}$.

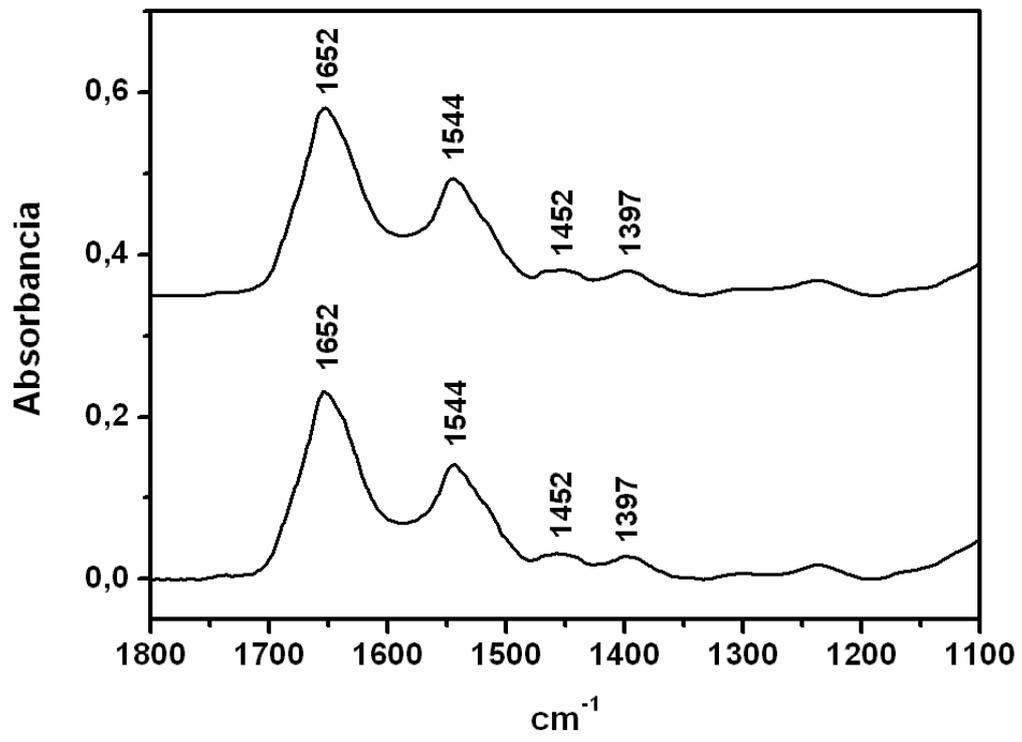


FIGURA 1

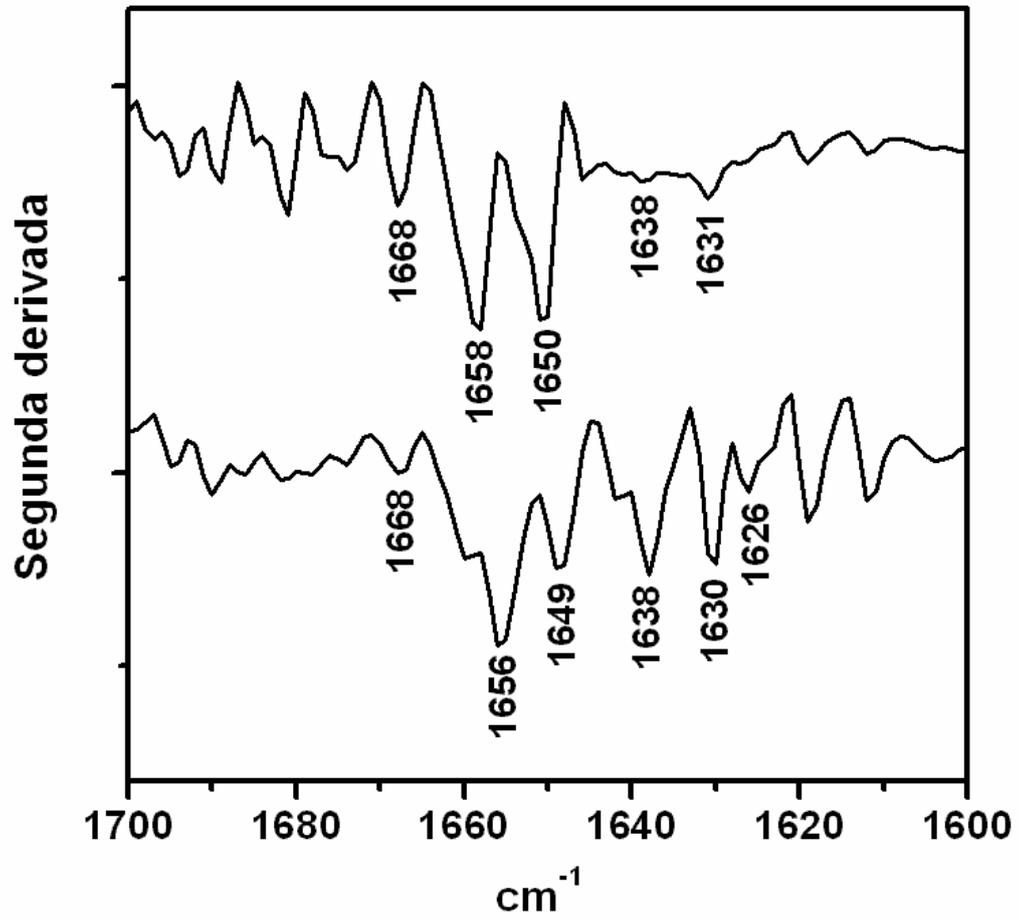


FIGURA 2

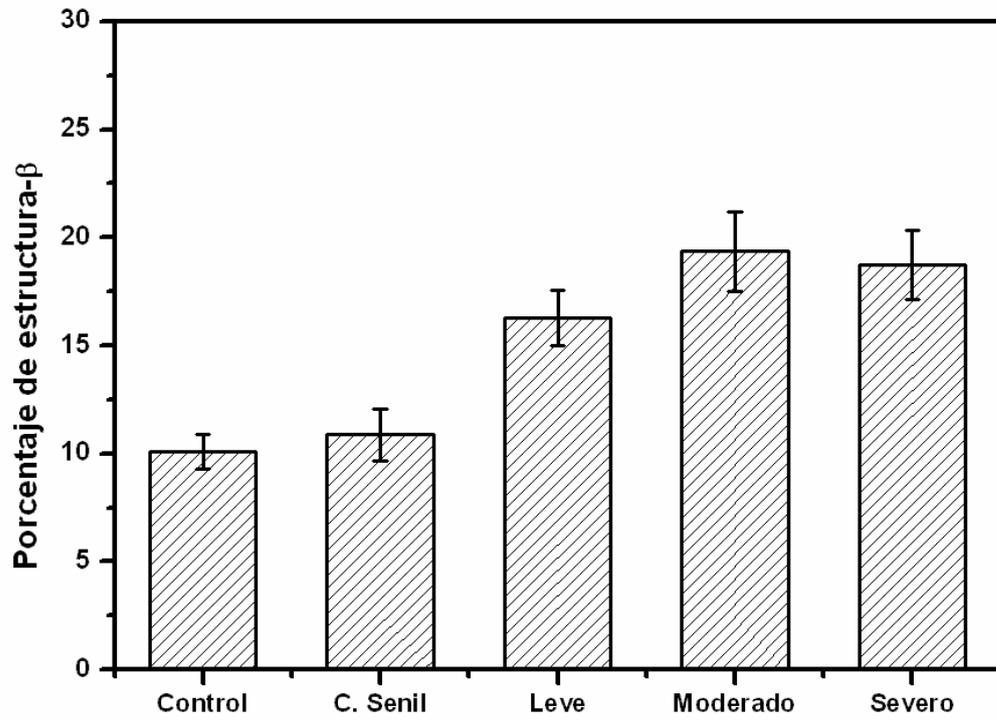


FIGURA 3

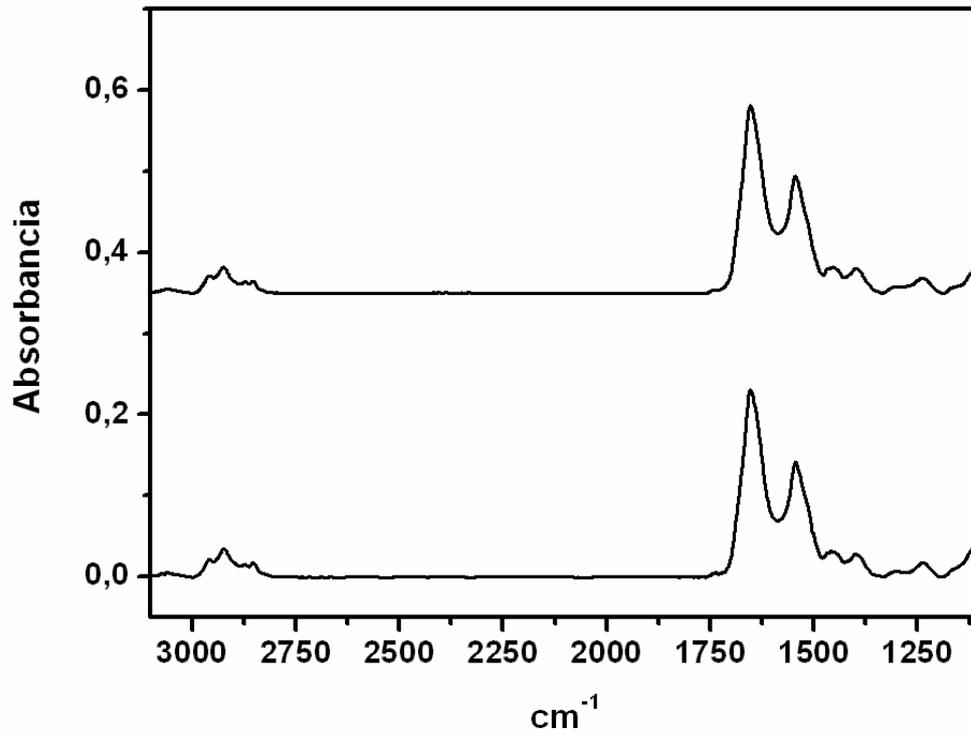


FIGURA 4

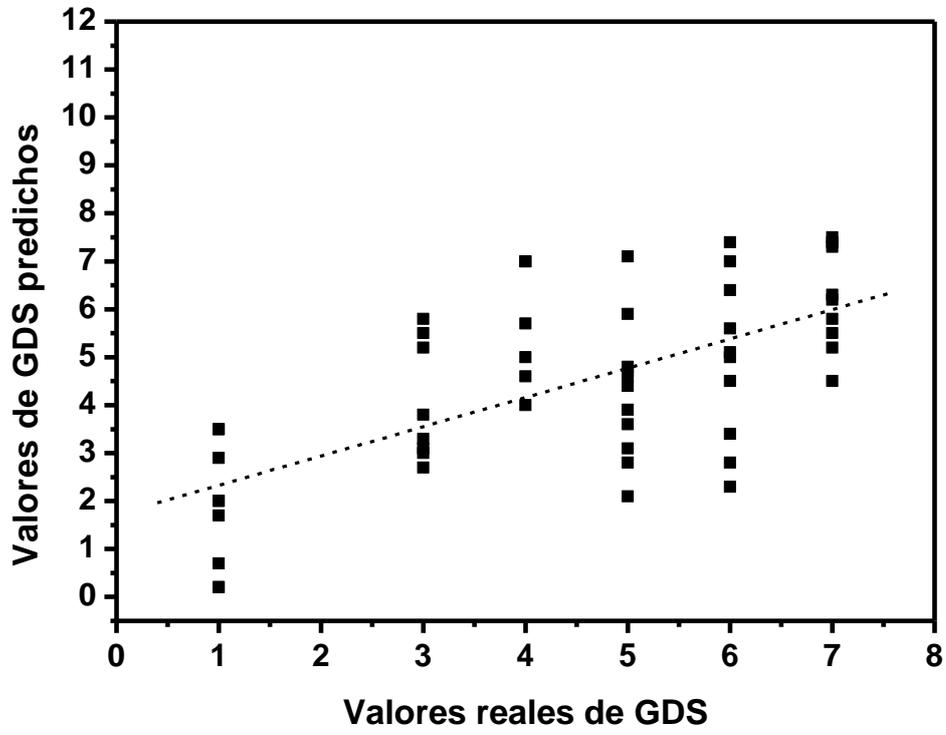


FIGURA 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131370

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.08.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N21/35** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2246113 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)) 01.02.2006, resumen; página 2, líneas 8-10,23-26,39-46; página 3, líneas 32-36,53-56,65-67; página 4, líneas 1-15,42-53; página 7, líneas 7-26,38-44; página 11, líneas 60-66; página 12, líneas 11-22; reivindicaciones 7,10,11.	1-4,6
A	GRIEBE M., DAFFERTSHOFER M., STROIK M., SYREN M., AHMAD-NEJAD P., NEUMAIER M., BACKHAUS J., HENNERICI M. G., FATAR M. "Infrared spectroscopy: a new diagnostic tool in Alzheimer disease." Neuroscience Letters (2007) Vol. 420, páginas 29-33. Todo el documento.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.11.2012

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, PUDMED.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.11.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5, 7-16	SI
	Reivindicaciones 1-4, 6	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2246113 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC))	01.02.2006
D02	GRIEBE M., DAFFERTSHOFER M., STROIK M., SYREN M., AHMAD-NEJAD P., NEUMAIER M., BACKHAUS J., HENNERICI M. G., FATAR M. "Infrared spectroscopy: a new diagnostic tool in Alzheimer disease." Neuroscience Letters (2007) Vol. 420, páginas 29-33. Todo el documento.	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un método espectroscópico infrarrojo para determinar el deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer que comprende las etapas de registro de un espectro infrarrojo de transmisión de una muestra de sangre, obtención de al menos un parámetro numérico a partir de una señal del espectro de la región comprendida entre 3100 y 1300 cm^{-1} , siendo el primer parámetro numérico un porcentaje del contenido de estructura beta peptídica de la muestra de sangre obtenida, comparación con un segundo parámetro numérico de referencia, y determinación a partir de dicha comparación si existe o no deterioro cognitivo asociado a la enfermedad de Alzheimer (reivindicaciones 1-15).

La presente solicitud de invención también consiste en un kit de obtención de la muestra para la medida espectroscópica que comprende al menos un tubo de fraccionamiento de sangre y un cristal soporte de muestra insoluble en agua apto para ventana para espectroscopia infrarroja de transmisión en el intervalo 3100-1300 cm^{-1} (reivindicación 16).

El documento D01 consiste en un método de detección por espectroscopia infrarroja de proteína priónicas infectivas en sangre de animales afectados por una encefalopatía espongiforme transmisible.

El documento D02 consiste en un estudio comparativo de mediciones convencionales de proteínas tau y beta-amiloide de líquido cefalorraquídeo mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986).

Las reivindicaciones 1-16 son nuevas según el artículo 6.1 Ley 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).**2.1.- Reivindicaciones 1-4 y 6.**

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica y divulga un método espectroscópico infrarrojo que comprende las etapas de registrar un espectro infrarrojo de transmisión a una primera muestra de sangre obtenida, obtener al menos un primer parámetro numérico a partir de al menos una señal del espectro de la región comprendida entre 3100 y 1300 cm^{-1} , y comparar el parámetro anterior con al menos un segundo parámetro numérico de referencia.

La muestra de sangre obtenida es una fracción de leucocitos de sangre periférica que puede ser humana, y el primer parámetro numérico es un porcentaje del contenido de estructura beta peptídica de dicha muestra de sangre (ver resumen, página 2, líneas 8-10, 23-26, 39-46, página 3, líneas 32-36, 53-56, 65-67, página 4, líneas 1-15, 42-53, página 7, líneas 7-26, 38-44, página 11, líneas 60-66, página 12, líneas 11-22, y reivindicación 7).

El documento I divulga que dicho procedimiento se utiliza para el diagnóstico de humanos afectados de beta-fibrilosis, como la enfermedad de Alzheimer (ver reivindicaciones 10 y 11).

El documento I no divulga la etapa de comparación de los dos parámetros (muestra y control) para determinar si existe deterioro cognitivo relacionado con la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, dicha etapa de comparación resulta obvia como última etapa del procedimiento para realizar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Por tanto se considera que las reivindicaciones 1-4 y 6 no implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.

2.2.- Reivindicaciones 5, 7-16.

Las reivindicaciones 5, 7-16 no implican actividad inventiva según el artículo 8.1 Ley 11/1986.