

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 481 517**

21 Número de solicitud: 201300104

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

29.01.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.07.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (50.0%)

OTRI - Pabellón de Brasil

Paseo de las Delicias s/n

41012 Sevilla ES y

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)

72 Inventor/es:

FERNANDEZ ESPEJO, Emilio;

MARTIN DE PABLOS, Angel;

CHACON PENA, José y

GARCIA MORENO, José Manuel

54 Título: **Método para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson en estadios tempranos**

57 Resumen:

Método para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson en estadios tempranos.

La presente invención se relaciona con un método in vitro para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson que comprende la cuantificación en sangre, suero o plasma de los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136.

Asimismo, también se relaciona con un método para evaluar la eficacia de la terapia administrada a un individuo que padece la enfermedad de Parkinson y con el uso de anticuerpos específicos de los residuos Tyr125 y/o Tyr136 y/o Tyr39 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína o de inhibidores de la óxido nítrico sintasa en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

ES 2 481 517 A2

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON EN ESTADÍOS TEMPRANOS

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con un método para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson que comprende la cuantificación en sangre, suero o plasma de los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136. Asimismo, también se relaciona con el uso de anticuerpos específicos de los residuos Tyr125 y/o Tyr136 y/o Tyr39 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína en la
10 elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto, la presente invención se incluye dentro del campo de la biomedicina, en particular, en el diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas mediante el empleo de biomarcadores y en el tratamiento de las mismas.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

La enfermedad de Parkinson es un trastorno que afecta las células nerviosas principalmente en una parte del cerebro que controla los movimientos musculares (circuito nigroestriado). En la enfermedad de Parkinson, las neuronas que
20 producen una sustancia química llamada dopamina mueren o no funcionan adecuadamente. Normalmente, la dopamina envía señales que ayudan a coordinar los movimientos. Los síntomas de la enfermedad de Parkinson pueden incluir temblor en las manos, los brazos, las piernas, la mandíbula y la cara, rigidez en los brazos, las piernas y el tronco, lentitud de los movimientos y
25 problemas de equilibrio y coordinación. La enfermedad de Parkinson se clasifica en estadios clínicos según el grado de afectación que van de grado 1 a grado 5 (Hoehn MM y Yahr MD. *Parkinsonism: onset, progression and mortality*; Neurology, 17: 427-442).

30 El estrés oxidativo se debe a un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) y los mecanismos de defensa

antioxidante. El estrés oxidativo está presente en la enfermedad de Parkinson, y se ha postulado como uno de los fenómenos fisiopatológicos relacionados con el desarrollo de la enfermedad (Jenner, P. 2003. *Oxidative stress in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 53, Suppl.3:S26-36). Dicho estrés se evidencia en suero y
5 líquido cefalorraquídeo de los enfermos, así como en muestras de tejido analizadas hasta la fecha. Entre los tipos de estrés oxidativo se encuentra la nitración, en el que hay modificaciones oxidativas de proteínas secundarias al exceso de óxido nítrico. La nitración de residuos de tirosina es el cambio más prominente y se asocia a diversas patologías humanas, tales como las alfa-
10 sinucleopatías entre las que se incluyen la enfermedad de Parkinson.

Entre las proteínas nitradas destaca la α -sinucleína, que es un componente principal de los cuerpos de Lewy. Las inclusiones de α -sinucleína en los cerebros de los pacientes con enfermedad de Parkinson se pueden marcar con anticuerpos
15 anti-3-nitrotirosina, lo que indica que la α -sinucleína es diana de nitración y se convierte en nitro- α -sinucleína. Esta proteína contiene 140 aminoácidos con cuatro residuos de tirosina (Tyr39, Tyr125, Tyr133, Tyr136) que son accesibles a la nitración. La nitración en Tyr39 y/o Tyr125/136 aumenta la agregación de la α -sinucleína (Paxinou E. *et al.* 2001. *Induction of alpha-synuclein aggregation by intracelular nitrative insult*. J Neurosci. 21(20): 8053-61), y hay evidencias que la
20 conversión de la α -sinucleína desde su forma soluble en forma agregada insoluble es un factor crucial en la enfermedad de Parkinson (Yanamandra k. *et al.*, 2011. *α -synuclein reactive antibodies as diagnostic biomarkers in blood sera of Parkinson's Disease patients*. PLoS One, 6(4):e18513). Finalmente, la nitración
25 conjunta de residuos en el carboxilo terminal más la de Tyr39 en el amino terminal origina una proteína altamente citotóxica que acelera la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Benner E.J. *et al.*, 2008. *Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons*. PLoS One, 3(1):e1376), e induce la muerte de neuronas en cultivo (tipo SH-SY5Y; Shavali
30 *et al.*, 2006. *Reactive macrophages increase oxidative stress and alpha-synuclein nitration during death of dopaminergic neuronal cells in co-culture: relevance to*

Parkinson's disease. Neurochem Res. 31(1):85-94; Liu *et al.*, 2011. *Novel molecular mechanism for nitrated alpha-synuclein induced cell death*. J. Mol Cell Biol. 3(4): 239-49).

- 5 Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson puede llegar a revestir una gran complejidad. Esta dificultad en la diagnosis es corriente que aparezca en los primeros estadios de la enfermedad, cuando los síntomas que el paciente presenta pueden ser atribuidos a otros trastornos. Consecuencia directa de este hecho es la elaboración de diagnósticos erróneos.
- 10 No existe ninguna prueba de laboratorio o estudio radiológico que permita diagnosticar la enfermedad, aunque algunas empresas de diagnósticos genéticos ofrecen test para la secuenciación de los genes SPARK1, SPARK2 y SPARK4 altamente relacionados con la enfermedad, aunque la detección de mutaciones en estos genes no determina el futuro desarrollo de la enfermedad en el individuo, y
- 15 solo estaría indicado en formas familiares de la enfermedad de Parkinson. También es frecuente que se realicen analíticas sanguíneas con el objetivo de descartar otros posibles trastornos que al igual que la enfermedad de Parkinson conllevan una ralentización en los movimientos.
- 20 Actualmente, las investigaciones dirigidas al desarrollo de métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson van encaminadas a encontrar biomarcadores que sean indicativos de la presencia de la enfermedad y ayuden a un mejor y más temprano diagnóstico de la misma.
- 25 Así, la solicitud de patente internacional WO2011/152699 describe un método para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Parkinson basado en el estudio de la formación de quinonas de dopamina y la detección por voltamperometría cíclica de metabolitos oxidados de la dopamina en el plasma de pacientes que presentan síntomas tempranos de la enfermedad.
- 30 La solicitud de patente internacional WO2012/056451 describe un método para el

diagnóstico de la enfermedad de Parkinson en un sujeto mediante el empleo de un perfil establecido a partir de la expresión de ciertos genes en la sangre periférica de dicho individuo.

- 5 La solicitud de patente WO2012/104696 describe anticuerpos que tienen alta afinidad por las protofibrillas de alfa-sinucleína humana pero baja afinidad por los monómeros de alfa-sinucleína y su uso en el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.
- 10 La solicitud de patente WO2012/101228 describe el uso del patrón de metilación del gen alfa-sinucleína en el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson a partir del análisis del ADN procedente de monocitos de sangre periférica.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos marcadores alternativos a los que ya existen en el estado de la técnica, que permitan diagnosticar la enfermedad de Parkinson en estadios tempranos de la enfermedad con fiabilidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han observado que los niveles en sangre de proteína nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 están aumentados en sujetos que padecen la enfermedad de Parkinson (EP) en grados 1 ó 2 de la escala de Hoehn-Yahr respecto a sujetos sanos.

Tal como se muestra en el ejemplo de la presente descripción, los inventores detectaron signos de estrés oxidativo, en concreto, estrés nitrativo en sangre de los enfermos de Parkinson de grados 1 ó 2 de Hoehn-Yahr, observando que los niveles de proteínas nitrosiladas estaban incrementados en pacientes respecto a controles sin afectar a los niveles de nitroalbúmina. Tras eliminar todas las proteínas mayores de 60 KDa, se detectó mediante western blotting (tanto en enfermos como en controles) una banda de alrededor de 56 KDa de proteína nitrosilada que correspondía a la α -sinucleína en estructura tetramérica.

Posteriormente, empleando anticuerpos selectivos para detectar nitrosilación en residuos concretos de la nitro- α -sinucleína, se observó que la proteína nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 estaba aumentada en enfermos de Parkinson respecto a sujetos sanos. Mediante análisis estadísticos (ANOVA), se vio que dicho incremento se producía en enfermos de Parkinson en grados 1 ó 2 de Hoehn-Yahr (Figura 3). También se detectó un decremento en la proteína nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39, aunque no es significativo en el grupo de pacientes en grados tempranos. Por lo tanto, en base a estos hechos, es posible diagnosticar la EP en un estadio temprano de la enfermedad (grado 1 ó 2 de Hoehn-Yahr) midiendo en la sangre de un individuo el nivel de proteína nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136. Así, la presente invención, no solo proporciona un nuevo marcador para el diagnóstico de la EP, sino que además, permite realizar dicho diagnóstico a partir de una muestra de sangre, suero o plasma.

15

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método para el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Parkinson en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr, de aquí en adelante "método de diagnóstico de la invención", en un individuo que comprende

- 20 (a) Cuantificar los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 en una muestra de sangre, suero o plasma de dicho individuo, y
- (b) Comparar los niveles obtenidos con un valor de referencia.

25 En la presente invención se entiende por "diagnosticar" al proceso que comprende determinar si un individuo sufre o no la EP en grado 1 ó 2 de Hoehn-Yahr mediante el examen o análisis de sus signos o parámetros. En la presente invención, el parámetro a medir para diagnosticar la EP es el nivel en sangre, suero o plasma de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o

30 Tyr136.

La “enfermedad de Parkinson” o “EP” es un trastorno que afecta principalmente a las células nerviosas, o neuronas, en una parte del cerebro que controla los movimientos musculares, que es el circuito nigroestriado. En la EP, las neuronas que producen dopamina mueren o no funcionan adecuadamente. Normalmente, la dopamina envía señales que ayudan a coordinar los movimientos. No se conoce el origen del daño de estas células. Los síntomas de la EP pueden incluir temblor en las manos, los brazos, las piernas, la mandíbula y la cara, rigidez en los brazos, las piernas y el tronco, lentitud de los movimientos, o problemas de equilibrio y coordinación. La EP se clasifica en estadios clínicos según el grado de afectación que van de grado 1 a grado 5 (Hoehn MM y Yahr MD. 1967. Citado *ad supra*).

En una primera etapa [etapa (a)], el método de diagnóstico de la invención comprende cuantificar los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 en una muestra de sangre, suero o plasma de dicho individuo.

En la presente invención se entiende por “cuantificar los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136” a determinar la cantidad o concentración de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136. La cantidad o concentración de nitro- α -sinucleína nitrosilada se puede medir mediante cualquiera de los métodos que existen en el estado de la técnica para medir los niveles de proteína y que son ampliamente conocidos por el experto en la materia. Los niveles de proteína se pueden cuantificar mediante técnicas inmunológicas tales como, por ejemplo, ELISA, Western Blot, inmunofluorescencia o radioinmunoensayo (RIA).

La técnica Western Blot está basada en la detección de proteínas previamente separadas por electroforesis en gel bajo condiciones más o menos desnaturizantes e inmovilizadas en una membrana, generalmente nitrocelulosa, mediante la incubación con un anticuerpo específico y un sistema de revelado. El ELISA está basado en el uso de anticuerpos marcados con enzimas de forma que

el conjugado formado entre el antígeno objetivo y el anticuerpo marcado da lugar a la formación de un complejo enzimáticamente activo. Dado que uno de los componentes (en antígeno o el anticuerpo) está inmovilizado en un soporte, los complejos antígeno-anticuerpo están inmovilizados en un soporte y así puede
5 detectarse mediante la adición de un sustrato que es convertido por la enzima a un producto que es detectable, por ejemplo, por espectrometría o fluorometría. Esta técnica permite una detección muy específica y altamente sensible de la proteína objetivo en una gran variedad de muestras (suero, plasma sangre, etc.). El radioinmunoensayo (RIA) es un tipo de inmunoensayo o método
10 radioinmunométrico que se basa en la formación específica de los complejos Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) lo que le dota de una gran especificidad unido a la sensibilidad de los métodos radiológicos.

Cualquier anticuerpo o reactivo capaz de unirse con alta afinidad a la proteína
15 diana puede usarse para detectar los niveles de proteína. No obstante, se prefiere el empleo de anticuerpos, por ejemplo, suero policlonal, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, ScFv, *diabodies*, *triabodies*, *tetrabodies* y anticuerpos humanizados.

20 Por lo tanto, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en residuos de tirosina se lleva a cabo mediante el empleo de anticuerpos. Como entiende el experto en la materia, los anticuerpos reconocerán de forma específica los residuos nitrosilados de la nitro- α -sinucleína. Ejemplos de anticuerpos que reconocen de forma específica los residuos
25 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína son conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Giasson, B.L. *et al.* 2000, *Science* 290, 985) y están disponibles comercialmente (por ejemplo, Millipore, Sigma-Aldrich, etc.) tal como se muestra en los ejemplos de la solicitud.

La α -sinucleína humana es una proteína de 140 aminoácidos [NCBI, Número de acceso P37840, versión P37840.1 GI:586067, SEQ ID NO: 1] codificada por el gen SNCA.

5 SEQ ID NO: 1

```
MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH GVATVAEKTK
EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP
DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA
```

10

La α -sinucleína presenta cuatro residuos de tirosina (Tyr39, Tyr125, Tyr133 y Tyr136) que son accesibles a sufrir nitrosilación (marcados en negrita en la SEQ ID NO: 1). Cuando la α -sinucleína está nitrosilada en, al menos, uno de estos residuos, entonces la α -sinucleína se denomina nitro- α -sinucleína.

15

Como sabe el experto en la materia, la α -sinucleína está presente en otras especies animales que, en el contexto de la presente invención, son consideradas variantes de la α -sinucleína humana y que también están contempladas dentro del ámbito de la presente invención.

20

Por otro lado, la muestra de sangre del individuo que va a ser diagnosticado puede obtenerse por cualquiera de los métodos habituales empleados por el experto en la materia, por ejemplo, mediante punción venosa empleando una jeringa. Una vez obtenida la muestra de sangre, ésta puede emplearse para

25 cuantificar el nivel de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136, o puede ser tratada para obtener el suero o el plasma. Igualmente, una vez obtenidos el suero o el plasma por técnicas convencionales a partir de la muestra de sangre, se puede proceder a cuantificar el nivel de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos de interés.

30

Una vez que se han cuantificado los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 en una muestra de sangre, suero o plasma del individuo que va a ser diagnosticado, el método de diagnóstico de la invención

comprende una etapa (b) dirigida a comparar los niveles obtenidos en la etapa (a) con un valor de referencia.

5 En la presente invención se entiende por "valor de referencia" al nivel de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 en una muestra de sangre, suero o plasma de un individuo sano, también denominado sujeto control, sin ninguna alteración neurológica.

10 La comparación de los niveles obtenidos tal como se define en la etapa (b) del método de diagnóstico de la invención, permite diagnosticar la EP en grados 1 ó 2 de Hoehn-Yahr. Así, en una realización particular del método de diagnóstico de la invención, si el nivel de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 es mayor que el valor de referencia, entonces dicho individuo padece la EP en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr.

15

Por otro lado, los inventores no sólo han observado que los niveles en sangre de proteína nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 están aumentados respecto a sujetos sanos, sino que, tal como se muestra en los ejemplos de la solicitud de patente, el estrés nitrativo en sangre de los enfermos de Parkinson origina una variación en el patrón de nitrosilación de la proteína nitro- α -sinucleína sérica. Así, se observó un incremento en la nitrosilación de los residuos Tyr125 y/o Tyr136 de la nitro- α -sinucleína respecto a la nitrosilación del residuo Tyr39 de dicha proteína, siendo el ratio superior de 1,6, preferiblemente, mayor de 1,8. Sin querer estar vinculados a ninguna teoría, se piensa que un aumento selectivo de la nitración en residuos Tyr125 y/o Tyr136 en los enfermos respecto a Tyr39 modifica la funcionalidad global de los tetrámeros de nitro- α -sinucleína y facilita la entrada global de tetrámeros de nitro- α -sinucleína en el tejido cerebral, ocasionando el daño neurotóxico progresivo de la EP a través de la neurotoxicidad de la nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39.

30

Por lo tanto, en otra realización particular, el método de diagnóstico de la

invención comprende, además,

(c) cuantificar los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39 respecto a un valor de referencia y

5 (d) calcular el ratio nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 en relación con la nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39.

Métodos de cuantificar los niveles de proteínas han sido explicados previamente en la etapa (a) del método de diagnóstico de la invención y son también aplicables
10 a la presente etapa. Como entiende el experto en la materia, la diferencia estriba en que, en esta ocasión, la proteína nitro- α -sinucleína que se va a cuantificar está nitrosilada en el residuo Tyr39.

De forma análoga a la etapa (b) del método de diagnóstico de la invención, en la
15 etapa (c) el “valor de referencia” se define como el nivel de nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39 en una muestra de sangre, suero o plasma de un individuo sano, también denominado sujeto control, sin ninguna alteración neurológica.

Una vez que se han cuantificado los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los
20 residuos Tyr125 y/o Tyr136 y los niveles nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39, se procede a calcular el ratio entre ambos valores [etapa (d)]. En la presente invención se entiende por “ratio” al valor resultante de dividir los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 entre los niveles nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39. El cálculo de dicho ratio,
25 permite diagnosticar la EP en grado 1 ó 2 de Hoehn-Yahr.

Así, en una realización particular, si el ratio es mayor de 1,6, en particular, mayor de 1,8, entonces el individuo padece la enfermedad de Parkinson en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr.

30

En otra realización particular, el individuo que va a ser diagnosticado es un mamífero, en particular, un primate, más en particular, un ser humano.

Adicionalmente, la observación realizada por los inventores y que es la base de la presente invención, puede tener otras aplicaciones, como por ejemplo, es útil para determinar si la terapia administrada a un individuo que padece la EP en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr va a ser eficaz. Como entiende el experto en la materia, si después de administrada la terapia, el individuo muestra unos niveles en sangre de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 por debajo de un valor de referencia tal como se ha definido previamente, entonces dicha terapia está siendo eficaz.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para evaluar *in vitro* la eficacia de la terapia administrada a un individuo que padece la EP en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr, de aquí en adelante “método de la invención para evaluar la eficacia de una terapia”, que comprende

- (a) Cuantificar los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 en una muestra de sangre, suero o plasma de dicho individuo, y
- (b) Comparar los niveles obtenidos en la etapa (a) con un valor de referencia.

Los términos empleados en el presente aspecto inventivo ya han sido definidos previamente para el método de diagnóstico de la invención, siendo su significado aplicable al presente aspecto inventivo.

25

Así, en una realización particular, si el nivel de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 es mayor que el valor de referencia, entonces la terapia administrada no está siendo eficaz.

Tal como se ha explicado previamente para el método de diagnóstico de la invención, en otra realización particular, el método para evaluar la eficacia de una terapia de la invención comprende, además

- 5 (c) cuantificar los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39 respecto a un valor de referencia y
- (d) calcular el ratio nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr 25 y/o Tyr136 en relación con la nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39.

- 10 En la presente invención, se entiende por "evaluar la eficacia de la terapia administrada a un paciente" a la acción de comprobar si la terapia o el tratamiento administrado a un paciente que padece la EP está siendo eficaz o no.

En otra realización particular, si el ratio es mayor de 1,6, en particular, mayor de
15 1,8, entonces la terapia administrada no está siendo eficaz.

En la presente invención, se entiende que la terapia administrada a un individuo que padece la EP en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr no está siendo eficaz, cuando en respuesta a dicha terapia, los síntomas de la EP se mantienen
20 o aumentan en el cuadro clínico del individuo tratado.

Por el contrario, en la presente invención se entiende que la terapia administrada a un individuo que padece la EP en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr está siendo eficaz, cuando en respuesta a dicha terapia, los síntomas de la EP
25 desaparecen o disminuyen del cuadro clínico del individuo tratado.

La metodología para evaluar si los síntomas de la EP disminuyen o desaparecen, se mantienen o aumentan del cuadro clínico del individuo está ampliamente descrita en el estado de la técnica, y su aplicación es práctica habitual para el
30 experto en la materia.

La eficacia de cualquiera de las terapias empleadas actualmente en el tratamiento de la EP puede ser evaluada mediante el método de la invención para evaluar la eficacia de una terapia. Ejemplos de terapias empleadas en el tratamiento de la EP incluyen, sin limitar a, la administración de levodopa (sola o en combinación con inhibidores de catecol-O-metiltransferasa (COMT)), agonistas dopaminérgicos (por ejemplo, bromocriptina, lisurida, Pramipexol, ropirinol, cabergolina, etc.), inhibidores de la monoaminoxidasa B (por ejemplo, la selegilina), liberadores presinápticos de dopamina (por ejemplo, la amantadina), antagonistas del receptor muscarínico de la acetilcolina (por ejemplo, la benztropina), anticuerpos que reconocen específicamente los residuos Tyr39 y/o Tyr125 y/o Tyr136 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína y compuestos inhibidores de la óxido nítrico sintasas.

En una realización particular, la terapia administrada se selecciona del grupo que consiste en levodopa, bromocriptina, lisurida, pramipexol, ropirinol, cabergolina, selegilina, amantadina, bezatropina, anticuerpos que reconocen específicamente los residuos Tyr39 y/o Tyr125 y/o Tyr136 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa y combinaciones de los mismos. En la tabla 1 se muestra un listado que incluye, pero no se limita a, inhibidores de las óxido nítrico sintasa.

Tabla 1 : Inhibidores de la óxido nítrico sintasa
S-(2-aminoetil) isotiourea (AE-ITU)
N-(3-(aminometil)-benzil) acetamidina
l-N ⁵ (1-iminoetil)-ornitina
Clorohidrato de Aminoguanidina
Clorohidrato de 2-Amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina
Clorohidrato de 5-[(4'-Amino-5',8'-difluorospiro[piperidina-4,2'(1'H)-quinaxolin]-1-il)carbonil]-2-piridincarbonitrilo
Diclorohidrato de 2-[2-(4-Metoxi-2-piridinil)etil]-1H-imidazo[4,5-b]piridina
Bromohidrato de (S)-Etilisotiourea
Clorohidrato de 2-Iminopiperidina
Bromohidrato de S-Isopropylisotiourea
Sulfato de (S)-Metilisotiourea
Clorohidrato de N ⁶ -(1-Iminoetil)-L-lisina
Diclorohidrato de N-[[3-(Aminometil)phenil]metil]-etanimidamida
Diclorohidrato de N ⁶ -(1-Iminoetil)-L-ornitina (L-NIO clorohidrato)

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/N5501?lang=es&region=ES ω-Nitro-L-arginina
Clorohidrato de L-N ⁶ -(1-Iminoetil) lisina
Sal de acetato de N ⁶ -Hidroxi-L-arginina (sal de acetato NOHA)
Aminoguanidina, Hemisulfato
1-Amino-2-hidroxiguanidina
<i>p</i> -Toluensulfato
Dexametasona
Diclorohidrato de N ⁶ ,N ⁶ -Dimetil-L-arginina
Cloruro de difenileneiodonium
2-Etil-2-tiopseudourea
Haloperidol
L-N ⁵ -(1-Iminoetil)ornitina
S-Metilisotiourea Sulfato
S-metil-L-tiocitrulina
N ⁶ -Monoetil-L-arginina, Sal de monoacetato
N ⁶ -Monoetil-D-arginina, Sal de monoacetato
N ⁶ -Monometil-L-arginina, Monoacetato (L-NMMA)
L-NIL
N ⁶ -Nitro-L-arginina (L-NNA)
7-Nitroindazol
7-Nitroindazol, Sal de sodio
7-Nitroindazol, 3-Bromo-, Sal de sodio
L-Thiocitrullina
N ⁶ -Propil-L-arginina
Nω-Nω-dimetil-L-arginina (L-ADMA)
Doxiciclina
Minociclina
Tetraciclina

En una realización particular, el inhibidor de la oxido nitrico sintasa se selecciona del grupo que consiste en S-(2-aminoetil) isotiourea (AE-ITU), L-N⁵(1-iminoetil)-ornitina, clorohidrato de aminoguanidina, clorohidrato de 2-Amino-5,6-dihidro-6-metil-4*H*-1,3-tiazina, clorohidrato de 5-[(4'-Amino-5',8'-difluorospiro[piperidina-4,2'(1'*H*)-quinaxolin]-1-il)carbonil]-2-piridinecarbonitrilo, diclorohidrato de 2-[2-(4-Metoxi-2-piridinil)etil]-1*H*-imidazo[4,5-*b*] piridina, bromohidrato de (S)-Etilisotiourea, clorohidrato de 2-Iminopiperidina, bromohidrato de S-Isopropylisotiourea, sulfato de (S)-Metilisotiourea, Clorohidrato de N⁶-(1-Iminoetil)-L-lisina, diclorohidrato de N-[[3-(Aminometil)phenil]metil]-etanimidamida, diclorohidrato de N⁵-(1-Iminoetil)-L-ornitina, Nω-Nitro-L-arginina (L-NIO clorohidrato), clorohidrato de L-N⁶-(1-Iminoetil)lisina, sal de acetato de N⁶-Hidroxi-

L-arginina (sal de acetato NOHA), aminoguanidina, Hemisulfato, 1-Amino-2-hidroxi guanidina, *p*-Toluensulfato, dexametasona, diclorohidrato de N^G,N^G-Dimetil-L-arginina, cloruro de difenileneiodonium, 2-etil-2-thiopseudourea, haloperidol, L-N⁵-(1-Iminoetil) ornitina, S-Metilisotiourea sulfato, S-metil-L-tiocitrulina, N^G-Monoetil-L-arginina sal de monoacetato, N^G-Monometil-L-arginina Monoacetato (L-NMMA), L-NIL, N^G-Nitro-L-arginina (L-NNA), 7-Nitroindazol, 7-Nitroindazol sal de sodio, 3-Bromo- sal de sodio, L-Tiocitrullina, N^G-Propil-L-arginina, N ω -N ω -dimetil-L-arginina (L-ADMA), doxiciclina, minociclina, tetraciclina y combinaciones de los mismos.

10

En otra realización particular, el individuo al que le ha administrado la terapia es un mamífero, en particular, un primate, más en particular, un ser humano.

En otra realización particular, la cuantificación de los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en residuos de tirosina se lleva a cabo mediante el empleo de anticuerpos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de anticuerpos que reconocen específicamente los residuos Tyr125 y/o Tyr136 y/o Tyr39 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína y/o un inhibidor de la oxido nítrico sintasa en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Tal como se ha mencionado previamente, ejemplos anticuerpos que reconocen de forma específica los residuos nitrosilados de la α -sinucleína son conocidos en el estado de la técnica (Giasson, B.L. *et al.* 2000, *Science* 290, 985) y están disponibles comercialmente (por ejemplo, en las casas comerciales Millipore, Sigma-Aldrich, etc.).

Por otro lado, la oxido nítrico sintasa (NOS) es una enzima oxidoreductasa que cataliza la oxidación de L-Arginina para producir L-citrulina y óxido nítrico (NO). Se han descrito principalmente tres isoenzimas para la NOS: NOS I o neuronal (nNOS), NOS II o inducible (iNOS) y NOS III o endotelial (eNOS). El NO

producido por la acción de la NOS es un gas biológicamente activo que difunde rápidamente a través de las membranas lipídicas y que, entre otras funciones, está implicado en el estrés oxidativo celular, pues reacciona con el anión superóxido O_2^- para dar lugar a peroxinitrito ($ONOO^-$) que lleva a cabo la nitración
 5 de aminoácidos aromáticos y proteínas.

Así, en la presente invención se entiende por "inhibidor de la NOS" a aquel compuesto que es capaz de impedir que la NOS lleve a cabo su actividad enzimática, es decir, la oxidación de L-Arginina a L-citrulina y NO, o de disminuir
 10 dicha actividad enzimática. Ejemplo de un ensayo para identificar si un compuesto dado es un inhibidor de la NOS es el descrito en Carrión, M. D. *et al.* 2004 (*Synthesis and iNOS/nNOS inhibitory activities of new benzoylpyrazoline derivatives*. Tetrahedron, 60(18): 4051-4069.)

15 En una realización particular, el inhibidor de la oxido nítrico sintasa se selecciona del grupo que consiste en S-(2-aminoetil) isotiourea (AE-ITU), I-N⁵(1-iminoetil)-ornitina, clorohidrato de aminoguanidina, clorohidrato de 2-Amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina, clorohidrato de 5-[(4'-Amino-5',8'-difluorospiro[piperidina-4,2'(1'H)-quinaxolin]-1-il)carbonil]-2-piridincarbonitrilo, diclorohidrato de 2-[2-(4-
 20 Metoxi-2-piridinil)etil]-1H-imidazo[4,5-b] piridina, bromohidrato de (S)-Etilisotiourea, clorohidrato de 2-Iminopiperidina, bromohidrato de S-Isopropylisotiourea, sulfato de (S)-Metilisotiourea, Clorohidrato de N⁶-(1-Iminoetil)-L-lisina, diclorohidrato de N-[[3-(Aminometil)phenil]metil]-etanimidamida, diclorohidrato de N⁵-(1-Iminoetil)-L-ornitina, N ω -Nitro-L-arginina (L-NIO
 25 clorohidrato), clorohidrato de L-N⁶-(1-Iminoetil)lisina, sal de acetato de N^G-Hidroxi-L-arginina (sal de acetato NOHA), aminoguanidina, Hemisulfato, 1-Amino-2-hidroxiguanidina, p-Toluensulfato, dexametasona, diclorohidrato de N^G,N^G-Dimetil-L-arginina, cloruro de difenileneiodonium, 2-etil-2-thiopseudourea, haloperidol, L-N⁵-(1-Iminoetil) ornitina, S-Metilisotiourea sulfato, S-metil-L-
 30 tiocitrulina, N^G-Monoetil-L-arginina sal de monoacetato, N^G-Monometil-L-arginina Monoacetato (L-NMMA), L-NIL, N^G-Nitro-L-arginina (L-NNA), 7-Nitroindazol, 7-Nitroindazol sal de sodio, 7-Nitroindazol, 3-Bromo- sal de sodio, L-Tiocitrullina, N^G-

Propil-L-arginina, N ω -N ω -dimetil-L-arginina (L-ADMA), doxiciclina, minociclina, tetraciclina y combinaciones de los mismos. Ejemplos adicionales de compuestos inhibidores de la NOS se describen en la patente ES2298048.

5 En la presente invención se entiende por "composición farmacéutica" o "medicamento" a toda preparación o forma farmacéutica, cuya fórmula de composición expresada en unidades del sistema internacional, está constituida por una sustancia o mezcla de sustancias, con peso, volumen y porcentajes constantes, elaborada en laboratorios farmacéuticos legalmente establecidos,
10 envasada o etiquetada para ser distribuida y comercializada como eficaz para diagnóstico, tratamiento, mitigación y profilaxis de una enfermedad, anomalía física o síntoma, o el restablecimiento, corrección o modificación del equilibrio de las funciones orgánicas de los seres humanos y de los animales.

15 La elaboración de la composición farmacéutica puede llevarse por cualquiera de los métodos descritos en el estado de la técnica, y además de los anticuerpos que reconocen específicamente los residuos Tyr125 y/o Tyr136 y/o Tyr39 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína y/o del inhibidor de la oxido nítrico sintasa, puede comprender un adyuvante y vehículos farmacéuticamente aceptables para su
20 administración.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de
25 composiciones terapéuticas. La composición terapéutica puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida, por ejemplo, por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de
30 medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas

puede encontrarse, por ejemplo, en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

Asimismo, la composición farmacéutica puede comprender otros compuestos
5 farmacéuticos útiles para el tratamiento de la EP. Ejemplos de compuestos farmacéuticos útiles en el tratamiento de la EP incluyen, pero no se limitan a, levodopa (sola o en combinación con inhibidores de catecol-O-metiltransferasa (COMT)), agonistas dopaminérgicos (por ejemplo, bromocriptina, lisurida, Pramipexol, ropirinol, cabergolina, etc.), inhibidores de la monoaminoxidasa B
10 (por ejemplo, la selegilina), liberadores presinápticos de dopamina (por ejemplo, la amantadina) y antagonista del receptor muscarínico de la acetilcolina (por ejemplo, la benztropina).

En la presente invención se entiende por “tratamiento” al conjunto de medios que
15 se utilizar para tratar, aliviar o curar una enfermedad, en particular, la EP.

En una realización particular, la enfermedad de Parkinson se encuentra en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr.

20 La puesta en práctica de los métodos de la invención requiere una serie de componentes que pueden disponerse juntos en forma de pack o kit. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit que comprende anticuerpos que reconocen específicamente los residuos Tyr125 y/o Tyr136 y/o Tyr39
25 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína para el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Parkinson en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr, o para evaluar *in vitro* la eficacia de la terapia administrada a un individuo que padece la enfermedad de Parkinson en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr.

Componentes útiles para la puesta en práctica de los métodos de la invención y
30 que pueden estar comprendidos dentro del kit incluyen, pero no se limitan a, solución tampón, solución de lisis, material estéril para hacer la recogida de

muestras (hisopos, torundas, pinzas, etc.), cubres y portaobjetos, agua destiladas, alcoholes (etanol), etc. Adicionalmente, el kit puede contener instrucciones o indicaciones que guíen al experto en la materia en la puesta en práctica los métodos de la invención.

5

En una realización particular, la terapia administrada se selecciona del grupo que consiste en levodopa, bromocriptina, lisurida, pramipexol, ropirinol, cabergolina, selegilina, amantadina, bezatropina, anticuerpos que reconocen específicamente los residuos Tyr39 y/o Tyr125 y/o Tyr136 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína, un
10 inhibidor de la oxido nítrico sintasa y combinaciones de los mismos.

En otra realización particular, el inhibidor de la oxido nítrico sintasa se selecciona del grupo que consiste en S-(2-aminoetil) isotiourea (AE-ITU), L-N⁵(1-iminoetil)-ornitina, clorohidrato de aminoguanidina, clorohidrato de 2-Amino-5,6-dihidro-6-
15 metil-4H-1,3-tiazina, clorohidrato de 5-[(4'-Amino-5',8'-difluorospiro[piperidina-4,2'(1'H)-quinaxolin]-1-il)carbonil]-2-piridinecarbonitrilo, diclorohidrato de 2-[2-(4-Metoxi-2-piridinil)etil]-1H-imidazo[4,5-b] piridina, bromohidrato de (S)-Etilisotiourea, clorohidrato de 2-Iminopiperidina, bromohidrato de S-Isopropylisotiourea, sulfato de (S)-Metilisotiourea, Clorohidrato de N⁶-(1-
20 Iminoetil)-L-lisina, diclorohidrato de N-[[3-(Aminometil)phenil]metil]-etanimidamida, diclorohidrato de N⁵-(1-Iminoetil)-L-ornitina, N ω -Nitro-L-arginina (L-NIO clorohidrato), clorohidrato de L-N⁶-(1-Iminoetil)lisina, sal de acetato de N^G-Hidroxi-L-arginina (sal de acetato NOHA), aminoguanidina, Hemisulfato, 1-Amino-2-hidroxi-
25 guanidina, *p*-Toluensulfato, dexametasona, diclorohidrato de N^G,N^G-Dimetil-L-arginina, cloruro de difenileneiodonium, 2-etil-2-thiopseudourea, haloperidol, L-N⁵-(1-Iminoetil) ornitina, S-Metilisotiourea sulfato, S-metil-L-tiocitrulina, N^G-Monoetil-L-arginina sal de monoacetato, N^G-Monometil-L-arginina Monoacetato (L-NMMA), L-NIL, N^G-Nitro-L-arginina (L-NNA), 7-Nitroindazol, 7-Nitroindazol sal de sodio, 7-Nitroindazol, 3-Bromo- sal de sodio, L-Tiocitrullina, N^G-
30 Propil-L-arginina, N ω -N ω -dimetil-L-arginina (L-ADMA), doxiciclina, minociclina, tetraciclina y combinaciones de los mismos.

Por otro lado, la invención también se relaciona con el uso de un kit que comprende anticuerpos que reconocen específicamente los residuos Tyr125 y/o Tyr136 y/o Tyr39 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína y/o un compuesto inhibidor de la óxido nítrico sintasa para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en particular, de la enfermedad de Parkinson en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr. Ejemplos de compuestos inhibidores de la óxido nítrico sintasa se han definido y descrito previamente en la presente descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es una representación gráfica que muestra los valores séricos de proteínas nitrotirosinadas y de nitroalbúmina medidas por medio de ELISA en suero de pacientes y sujetos control. Media \pm EEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto a controles (grado de Hoehn-Yahr 1, $t = 2,2$, $p < 0,05$; grado 2, $t = 2,6$, $p < 0,01$; test de Student).

La figura 2 es una imagen que muestra un blot de proteínas nitrotirosinadas (anti-3-nitrotirosina) y de alfa-sinucleína en suero de nueve pacientes de enfermedad de Parkinson, tras depleción de albúmina y proteínas >60 KDa. Se observan bandas en la misma posición a unos 56 KDa.

La figura 3A es una imagen que muestran un blot de 3NT-alfa-sinucleína nitrada en Tyr125/136 (3NT- α -Syn Tyr125/136) y de 3NT-alfa-sinucleína nitrada en Tyr39 (3NT- α -Syn Tyr39) en suero de pacientes y sujetos control; la figura 3B es un gráfico que muestra los valores de intensidad de las bandas en unidades Scion. En ella el ANOVA de dos vías indicó un efecto de interacción ($F_{3, 79} = 8,78$, $p < 0,0001$, $n = 10$ por grupo. Media \pm EEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto a la banda correspondiente en controles; ## $p < 0,01$ respecto a la banda de Tyr39 (test de Student).

La figura 4A es un gráfico que muestra los valores de la ratio entre la 3NT-alfa-sinucleína nitrada en Tyr125/136 (3NT- α -Syn Tyr125/136) y la 3NT-alfa-sinucleína

nitrada en Tyr39 (3NT- α -Syn Tyr39) en suero de pacientes y sujetos control. El ANOVA de una vía indicó un efecto de grado (F3, 53=4,142, $p<0,011$). Media \pm EEM. ** $p<0,01$ respecto al ratio en controles (grado 1, $t=6,7$, $p<0,0001$; grado 2, $t=2,73$, $p<0,01$). La figura 4B es un gráfico que muestra los valores
 5 individuales de la ratio entre la 3NT-alfa-sinucleína nitrada en Tyr125/136 (3NT- α -Syn Tyr125/136) y la 3NT-alfa-sinucleína nitrada en Tyr39 (3NT- α -Syn Tyr39) en suero de pacientes grado 1 ($n=13$) y 2 ($n=21$) y sujetos control ($n=20$). La línea es la media de la población.

10 EJEMPLOS

El siguiente ejemplo es meramente ilustrativo de la presente invención y no debe ser considerado limitativo de la misma.

15 **Ejemplo 1. Cuantificación de los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125/136 en suero.**

I.- Material y Métodos

20 **Sujetos de estudio**

Los pacientes elegidos sufrían enfermedad de Parkinson (EP) por diagnóstico clínico e información SPECT positiva. Se clasificaron según la escala de Hoehn-Yahr en cuatro grados, las escalas UPDRS y la duración en años de la EP. La duración en años se calculó según el momento del primer síntoma según el
 25 enfermo. Todos los pacientes eran no fumadores y no bebedores de bebidas alcohólicas.

Los sujetos control se reclutaron de familiares de los enfermos o de sujetos sometidos a anestesia intradural para tratamiento traumatológico en el Servicio de
 30 Cirugía y Anestesia del Hospital Macarena de Sevilla (sin ningún daño neurológico). Los sujetos con algún proceso hepático, renal o cardíaco, o

malabsorción, enfermedad autoinmune, diabetes mellitus, artritis reumatoide, SIDA o infección se rechazaron (los marcadores de estrés oxidativo se alteran en estos procesos).

- 5 De cada paciente se anotó: edad, sexo, peso, hipertensión, dislipemia, glucemia, bebidas de café, frecuencia de fumar, tomar vitaminas A y E como suplementos diarios, tomar estatinas o aspirinas, la dosis diaria de levodopa, el tipo y dosis de agonista dopaminérgico, y uso de rasagilina.

10 **Recogida de sangre y medidas bioquímicas**

La extracción de sangre se realizó por punción de la vena cefálica. Se recogieron 5 ml de sangre en tubos recubiertos de gel para inducir la coagulación de la sangre y para obtener el suero (BD Vacuotainer). El suero se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos para separar el coágulo y las células atrapadas, y luego
15 fue congelado a -80°C . Para medir los niveles de proteínas nitrotirosinadas y de α -sinucleína, se emplearon kits comerciales (Oxiselect Nitrotyrosine kit, Cell Biolabs Inc., USA; Human α -synuclein Elisa Kit, BlueGene Biotech, China), y se siguieron las instrucciones del fabricante.

20 **Depleción de albúmina y western blotting**

Se siguieron dos metodologías para deplecionar la albúmina de las muestras y facilitar así la detección de las proteínas de interés. Primero se usó el PureProteome™ Protein G Magnetic Bead System (Millipore, USA) para inmunoprecipitación basada en bolas magnéticas. Sin embargo, este método
25 resultó desnaturalizante y se empleó otro menos agresivo basado en filtros Amicon Ultra 50K (Millipore, USA). Se observó que un paso de filtración permite separar moléculas mayores de 60 KDa, incluyendo a la albúmina. Las muestras de suero se lisaron con 10% glicerol, 137 mM NaCl, y 20 mM Tris HCl pH 7,5, conteniendo inhibidores de peptidasas (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina y leupeptina, 1 mM
30 PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)).

Los niveles de proteínas se cuantificaron por medio del método de Bradford. Las muestras se hirvieron y alícuotas conteniendo 15 µg de proteínas se sometieron a electroforesis con gel de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Membranas de Polivinildenediflorida). La inmunotinción se realizó con anticuerpos contra 3-nitrotirosina (*monoclonal antibody to nitrotyrosine*, Hycult Biotech, USA), α -sinucleína (*monoclonal anti- α -synuclein antibody Syn211*, Sigma-Aldrich, USA), α -sinucleína nitrada en residuos de tirosina 125/136 (*anti-nitro- α/β -synuclein antibody*, nSYn12, Millipore, USA), y α -sinucleína nitrada en residuos de tirosina-39 (*anti-nitro- α/β -synuclein antibody Tyr39*, nSYn14, Millipore, USA). Los anticuerpos primarios se visualizaron con secundarios unidos a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, USA), quimioluminiscencia (ECL) (Amersham, GE HealthCare, Piscataway, NJ, USA), y autorradiografía. La densidad de las bandas se midió con el programa Scion Image para PC (NIH, USA). Los valores se dan como intensidad de banda en unidades Scion.

15

Cultivo de neuronas de sustancia negra

La puesta a punto de cultivos celulares de neuronas dopaminérgicas permitió la aproximación a nivel celular de la EP. Realizando cultivos primarios de dichas neuronas de manera específica se pudo estudiar más directamente los efectos de tóxicos. El cultivo primario de neuronas de sustancia negra se realizó siguiendo el protocolo descrito con anterioridad por Cardozo, 1993, *Neuroscience* 56(2): 409-421.

Para llevar a cabo el cultivo de neuronas de sustancia negra se utilizaron crías de ratas. Tras sacrificarlas, se extrajo el cerebro y se diseccionó mediante el empleo de un bisturí la zona correspondiente a la sustancia negra. Posteriormente, de ese corte se extrajo la sección en la que se localizaban la mayoría de neuronas de sustancia negra, evitando incluir aquella zona correspondiente al área tegmental ventral. Las disecciones obtenidas se colocaron en un tubo con solución enzimática previamente preparada, filtrada y precalentada en baño a 37°C (0,5 ml de solución enzimática por cada cría), y permanecieron en agitación durante 30

- minutos para la digestión. Pasado ese tiempo se centrifugó a 900 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido se pasó a un tubo con 2 ml de la solución inactivante (filtrada y precalentada a 37°C en el baño), se dejó actuar durante 5 minutos, y después de ese tiempo se centrifugó. El pellet resultante se pasó a un eppendorf
- 5 y se añadió 400 µL de medio de neuronas, se resuspendió y el sobrenadante se pasó a un tubo de 15 mL. Este proceso se repitió hasta que el tejido se disgregó completamente. Finalmente, se realizó un conteo de las células y se colocó una densidad de 30.000 células en cada pocillo.
- 10 La exposición del suero control o Parkinsoniano a 3-nitrotirosina libre se inició a los 4-5 días *in vitro*. El medio se quitó y se cambió a Neurobasal sin B27 durante 2 horas. Suero (10 y 50 µL en Neurobasal, 100 µL total) o 3-nitrotirosina (0, 1, 2, 8 y 16 nmoles en 100 µL Neurobasal) se añadió a las neuronas. En otros medios tratados con suero, se añadió 1 µL de anticuerpo para bloquear la α -sinucleína
- 15 nitrada en residuos de tirosina 125/136 (nSYn12 antibody, Millipore) o α -sinucleína nitrada en residuos de tirosina-39 (nSYn14 antibody, Millipore). Tras 30 minutos, se quitó este medio, y se lavó dos veces con Neurobasal y luego se mantuvo incubando 24 horas en Neurobasal, para llevar a cabo el ensayo de lactato hidrogenasa (LDH) (Cytotoxicity Detection kit, Roche, Indianapolis, USA).
- 20 La liberación total de LDH se calculó en células no tratadas y lisadas con 0,5% Triton X-100 durante 1 hora. La muerte basal se calculó en células no tratadas y en B27. La liberación de LDH de fondo, es decir, del medio solo, se restó a los valores obtenidos en todos los pocillos. El % de citotoxicidad celular se estimó midiendo la densidad óptica de las muestras de estudio o control utilizando un
- 25 espectrofotómetro a 490 nm. Los valores de muerte se calcularon como: % muerte celular = $(\text{valor LDH} - \text{BK}) / (\text{FK} - \text{BK}) \times 100$. Donde BK es la muerte basal del cultivo en un pocillo sin tratamiento y FK es la muerte total generada con tritón durante una hora. Por lo tanto, los valores de muerte celular obtenidos por este procedimiento son una medida indirecta de la muerte celular que ocurre en el
- 30 pocillo, teniendo en cuenta las condiciones del cultivo.

Estadística y ética

Se incluyeron 54 pacientes, en los cuatro grados de Hoehn-Yahr (grado 1, n= 13; grado 2, n= 21; grado 3, n=10; grado 4, n=10), y 40 sujetos control. Las diferencias entre los marcadores de nitración oxidativa y los datos clínicos se analizaron con el test de χ^2 o el de Student (grupos independientes). En los pacientes y controles se realizó un análisis de regresión lineal simple para buscar correlaciones. Las comparaciones entre datos clínicos y marcadores nitrativos dentro de los pacientes se realizaron con el test de χ^2 y ANOVA de una vía seguido de test de Newman-Keuls o de Student. Si había dos factores se empleaba el ANOVA de dos vías, con el test post-hoc de Newman-Keuls o de Student. Cuando era necesario, la normalización se verificó con el test de Shapiro-Wilk.

Se empleó un consentimiento informado firmado por todos los pacientes, y aprobado por la Universidad de Sevilla y el Hospital Macarena (comités ético y científico), de acuerdo a la Declaración de Helsinki (BMJ 1991; 302: 1194). Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo a las normas de cuidado de animales de experimentación del Consejo de la Unión Europea (86/609/ECC, 90/679/ECC, 98/81/CEE, 2003/65/EC y recomendaciones de la Comisión 2007/526/EC), y con la aprobación del Comité local de Ética Animal (Universidad de Sevilla).

II. Resultados

Primero se comprobó que las características clínicas eran similares entre pacientes y controles, excepto en hipertensión que era más frecuente en los pacientes de EP (Chi Cuadrado, $p < 0,01$). Luego se valoró si existía estrés nitrativo en los pacientes, para lo cual se midieron los niveles de proteínas nitrotirosinadas y de nitroalbúmina en suero mediante la técnica ELISA. Los niveles de proteínas nitrotirosinadas estaban aumentados en pacientes respecto a controles (pacientes EP, $70,6 \pm 4,7$ nM; controles, $48,3 \pm 6,8$ nM; $t = 2,67$, $p < 0,01$), sin

diferencias en los niveles de nitroalbúmina (pacientes EP, $1,6\pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$; controles, $1,4\pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$). Se evaluaron los niveles de proteínas nitrotirosinadas en cada paciente de EP clasificado según la escala de Hoehn-Yahr, y se detectó que los niveles estaban aumentados en los pacientes de grado 1 y 2 respecto a
5 controles de modo significativo (grado 1, $p<0,05$; grado 2, $p<0,01$), como se observa en Figura 1. Los niveles de nitroalbúmina eran semejantes en todos los grados y controles (Figura 1).

Estos resultados sugerían un proceso nitrativo específico, sin afectar a la
10 albúmina sérica, que es la proteína más abundante. Por ello, se evaluaron las proteínas nitradas en suero mediante *western blotting* tras eliminar todas las proteínas >60 kDa mediante filtración selectiva, y se detectó la presencia de una

banda única de ~ 56 kDa de peso molecular en pacientes y controles (Figura 2). No

había diferencias en intensidad de banda entre pacientes y controles. Una banda
15 de unos 56 kDa es muy característica de la α -sinucleína tetramérica, así que se testó un anticuerpo selectivo anti- α -sinucleína con el resultado de una banda

similar a ~ 56 -kDa. Se midieron los niveles séricos de proteínas nitrotirosinadas y

de α -sinucleína mediante ELISA y no se observaron diferencias entre pacientes y
controles (proteínas nitrotirosinadas, pacientes EP, $2,3\pm 0,7$ nM; controles,
20 $3,1\pm 1,1$ nM; α -sinucleína, pacientes EP, 327 ± 45 pg/ml; controles, $425,8\pm 65$ pg/ml),
indicando que no había diferencias en los niveles de α -sinucleína total, sea nitrada
o no.

Por este motivo, interesó saber si la modificación de la α -sinucleína no era de tipo cuantitativo, pero sí lo era el perfil de nitración de la nitro- α -sinucleína (3NT- α Syn) con cambios en la nitración de la molécula (pues diversos residuos de tirosina se pueden nitrar como se ha explicado). Para ello, se emplearon anticuerpos monoclonales selectivos (mAbs) para detectar 3NT- α Syn en los residuos de 5 tirosina 125/136 (3NT- α Syn Tyr125/136; nSYN12 mAb), y tirosina 39 (3NT- α Syn Tyr39; nSYN14 mAb), que son los tipos de nitración más importantes de la molécula. Se midió la intensidad de los *blots* (mediante unidades Scion con el programa Scion Image para PC) y el ANOVA de dos vías indicó un efecto de 10 interacción significativo ($p < 0,0001$, ver Fig. 3). La intensidad de nitración en Tyr125/136 era mayor en pacientes grado 1 y 2 respecto a los grados 3 y 4 ($p < 0,01$; Newman-Keuls) y controles (grado 1, $t = 2,48$, $p < 0,02$; grado 2, $t = 2,6$, $p < 0,01$; Fig. 3). La intensidad de expresión de nitración en Tyr39 era significativamente menor en pacientes grado 1, pero no grado 2 ($t = 2,1$, $p < 0,05$; 15 Fig. 3). Comparando los dos tipos de bandas entre sí, la intensidad de 3NT- α Syn Tyr125/136 era significativamente mayor que la de 3NT- α Syn Tyr39 en pacientes tempranos (grado 1, $t = 4,5$, $p < 0,001$; grado 2, $t = 3,18$, $p < 0,01$). Si se calculaba la ratio 3NT- α Syn Tyr125/136 *versus* 3NT- α Syn Tyr39, se observó que dicha ratio se elevó significativamente en los pacientes con EP precoz o de grado 1 y 2 respecto 20 a controles ($p < 0,001$), y era similar a controles en los grados avanzados 3 y 4, como se observa en la Figura 4. Analizando las ratios individuales de todos los enfermos, se observó que era superior a 1,6 en todos los casos de enfermos de grado 1 y 2, pero no en controles o enfermos de grado 3 y 4, donde era inferior a 1,6 en todos los casos. El avance de la enfermedad parece que reduce los niveles 25 de 3NT- α Syn Tyr125/136 en los pacientes avanzados (grados 3 y 4). Es de destacar que las diferencias observadas entre pacientes tempranos y avanzados se asemeja a la reducción progresiva de anticuerpos anti- α Syn en suero de pacientes de EP según Yanamandra *et al.* (2011) [citado *ad supra*]. Los anticuerpos nSyn14 y nSyn12 también reconocen β -sinucleína, pero esta proteína 30 se expresa en cerebro, no en sangre.

Finalmente, considerando que la α -sinucleína nitrada es neurotóxica como se ha explicado, interesó saber si el suero filtrado y conteniendo 3NT- α Syn era también neurotóxico para las neuronas de sustancia negra. Se hizo ensayo LDH de neuronas de sustancia negra de cría de rata en cultivo en Neurobasal, y se observó que tanto el suero de EP como control eran neurotóxicos pues aumentaban significativamente los niveles de LDH respecto a cultivos no tratados con suero ($p < 0,001$). Se investigó si el bloqueo de 3NT- α Syn Tyr125/136 o 3NT- α Syn Tyr-39 modificaba dicha neurotoxicidad. Sólo el bloqueo de 3NT- α Syn Tyr-39 anuló la neurotoxicidad del suero, tanto en EP como control ($p < 0,01$). Esto permite deducir que el suero de los enfermos de Parkinson, al igual que el normal, es citotóxico para las neuronas de sustancia negra en cultivo, y dicha neurotoxicidad depende de la α -sinucleína nitrada en el residuo Tyr39. Al detectarse un aumento selectivo de la nitración en residuos Tyr125/136 en los enfermos respecto a Tyr39, se propone, sin querer estar vinculados a ninguna teoría, que dicho cambio modifica la funcionalidad global de los tetrámeros de α -sinucleína nitrada y facilita la entrada global de tetrámeros de 3NT- α Syn en tejido cerebral ocasionando el daño neurotóxico progresivo de la enfermedad de Parkinson a través de la neurotoxicidad de Tyr39 nitrada

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Parkinson en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr en un individuo que comprende
 - 5 (a) Cuantificar los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 en una muestra de sangre, suero o plasma de dicho individuo y
 - (b) Comparar los niveles obtenidos con un valor de referencia.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que si el nivel de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 es mayor que el valor de referencia, entonces dicho individuo padece la EP en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que además comprende
 - (c) cuantificar los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39 respecto a un valor de referencia y
 - (d) calcular el ratio nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 en relación con la nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo
 - 20 Tyr39.
4. Método según la reivindicación 3, en el que si el ratio es mayor de 1,6, en particular, mayor de 1,8, entonces el individuo padece la enfermedad de Parkinson en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el individuo es un mamífero, en particular, un primate, más en particular, un ser humano.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la
- 30 cuantificación de los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada se lleva a cabo mediante el empleo de anticuerpos.

7. Un método para evaluar *in vitro* la eficacia de la terapia administrada a un individuo que padece la enfermedad de Parkinson EP en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr que comprende
- 5 (a) Cuantificar los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 en una muestra de sangre, suero o plasma de dicho individuo, y
- (b) Comparar los niveles obtenidos en la etapa (a) con un valor de referencia.
- 10 8. Método según la reivindicación 7, en el que si el nivel de nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr125 y/o Tyr136 es mayor que el valor de referencia, entonces la terapia administrada no está siendo eficaz.
9. Método según la reivindicación 7 u 8, que además comprende
- 15 (c) cuantificar los niveles de nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39 respecto a un valor de referencia y
- (d) calcular el ratio nitro- α -sinucleína nitrosilada en los residuos Tyr 25 y/o Tyr136 en relación con la nitro- α -sinucleína nitrosilada en el residuo Tyr39.
- 20 10. Método según la reivindicación 9, en el que si el ratio es mayor de 1,6 en particular, mayor de 1,8, entonces la terapia administrada no está siendo eficaz.
- 25 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la terapia administrada se selecciona del grupo que consiste en levodopa, bromocriptina, lisurida, pramipexol, repirinol, cabergolina, selegilina, amantadina, bezatropina, anticuerpos que reconocen específicamente los residuos Tyr39 y/o Tyr125 y/o Tyr136 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína, un
- 30 inhibidor de la oxido nítrico sintasa y combinaciones de los mismos.

12. Método según la reivindicación 11, en el que el inhibidor de la oxido nítrico sintasa se selecciona del grupo que consiste en S-(2-aminoetil) isotiourea (AE-ITU), L-N⁵(1-iminoetil)-ornitina, clorohidrato de aminoguanidina, clorohidrato de 2-Amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina, clorohidrato de 5-
 5 [(4'-Amino-5',8'-difluorospiro[piperidina-4,2'(1H)-quinaxolin]-1-il)carbonil]-2-piridinecarbonitrilo, diclorohidrato de 2-[2-(4-Metoxi-2-piridinil)etil]-1H-imidazo[4,5-b] piridina, bromohidrato de (S)-Etilisotiourea, clorohidrato de 2-Iminopiperidina, bromohidrato de S-Isopropylisotiourea, sulfato de (S)-Metilisotiourea, Clorohidrato de N⁶-(1-Iminoetil)-L-lisina, diclorohidrato de N-
 10 [[3-(Aminometil)phenil]metil]-etanimidamida, diclorohidrato de N⁵-(1-Iminoetil)-L-ornitina, N ω -Nitro-L-arginina (L-NIO clorohidrato), clorohidrato de L-N⁶-(1-Iminoetil)lisina, sal de acetato de N^G-Hidroxi-L-arginina (sal de acetato NOHA), aminoguanidina, Hemisulfato, 1-Amino-2-hidroxiguanidina, p-Toluensulfato, dexametasona, diclorohidrato de N^G,N^G-Dimetil-L-arginina,
 15 cloruro de difenileneiodonium, 2-etil-2-thiopseudourea, haloperidol, L-N⁵-(1-Iminoetil) ornitina, S-Metilisotiourea sulfato, S-metil-L-tiocitrulina, N^G-Monoetil-L-arginina sal de monoacetato, N^G-Monometil-L-arginina Monoacetato (L-NMMA), L-NIL, N^G-Nitro-L-arginina (L-NNA), 7-Nitroindazol, 7-Nitroindazol sal de sodio, 7-Nitroindazol, 3-Bromo- sal de sodio, L-Tiocitrullina, N^G-Propil-L-
 20 arginina, N ω -N ω -dimetil-L-arginina (L-ADMA), doxiciclina, minociclina, tetraciclina y combinaciones de los mismos.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que el individuo es un mamífero, en particular, un primate, más en particular, un ser humano.
 25
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que la cuantificación de los niveles de nitro- α -sinucleína nitrada se lleva a cabo mediante el empleo de anticuerpos.
- 30 15. Uso de un kit que comprende anticuerpos que reconocen específicamente los residuos Tyr125 y/o Tyr136 y/o Tyr39 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína para

el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Parkinson en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr, o para evaluar *in vitro* la eficacia de la terapia administrada a un individuo que padece la enfermedad de Parkinson EP en grado 1 ó 2 según la escala Hoehn-Yahr.

5

16. Uso según la reivindicación 15, en el que la terapia administrada se selecciona del grupo que consiste en levodopa, bromocriptina, lisurida, pramipexol, ropirinol, cabergolina, selegilina, amantadina, bezatropina, anticuerpos que reconocen específicamente los residuos Tyr39 y/o Tyr125 y/o Tyr136 nitrosilados de la nitro- α -sinucleína, un inhibidor de la oxido nítrico sintasa y combinaciones de los mismos.

10

17. Uso según la reivindicación 16, en el que el inhibidor de la oxido nítrico sintasa se selecciona del grupo que consiste en S-(2-aminoetil) isotiourea (AE-ITU), 1-N⁵(1-iminoetil)-ornitina, clorohidrato de aminoguanidina, clorohidrato de 2-Amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina, clorohidrato de 5-[(4'-Amino-5',8'-difluorospiro[piperidina-4,2'(1'H)-quinaxolin]-1-il)carbonil]-2-piridinecarbonitrilo, diclorohidrato de 2-[2-(4-Metoxi-2-piridinil)etil]-1H-imidazo[4,5-b] piridina, bromohidrato de (S)-Etilisotiourea, clorohidrato de 2-Iminopiperidina, bromohidrato de S-Isopropylisotiourea, sulfato de (S)-Metilisotiourea, Clorohidrato de N⁶-(1-Iminoetil)-L-lisina, diclorohidrato de N-[[3-(Aminometil)phenil]metil]-etanimidamida, diclorohidrato de N⁵-(1-Iminoetil)-L-ornitina, N ω -Nitro-L-arginina (L-NIO clorohidrato), clorohidrato de L-N⁶-(1-Iminoetil)lisina, sal de acetato de N^G-Hidroxi-L-arginina (sal de acetato NOHA), aminoguanidina, Hemisulfato, 1-Amino-2-hidroxiguanidina, p-Toluensulfato, dexametasona, diclorohidrato de N^G,N^G-Dimetil-L-arginina, cloruro de difenileneiodonium, 2-etil-2-thiopseudourea, haloperidol, L-N⁵-(1-Iminoetil) ornitina, S-Metilisotiourea sulfato, S-metil-L-tiocitrulina, N^G-Monoetil-L-arginina sal de monoacetato, N^G-Monometil-L-arginina Monoacetato (L-NMMA), L-NIL, N^G-Nitro-L-arginina (L-NNA), 7-Nitroindazol, 7-Nitroindazol sal de sodio, 7-Nitroindazol, 3-Bromo- sal de sodio, L-Tiocitrullina, N^G-Propil-L-

15

20

25

30

arginina, N ω -N ω -dimetil-L-arginina (L-ADMA), doxiciclina, minociclina, tetraciclina y combinaciones de los mismos.

FIG. 1

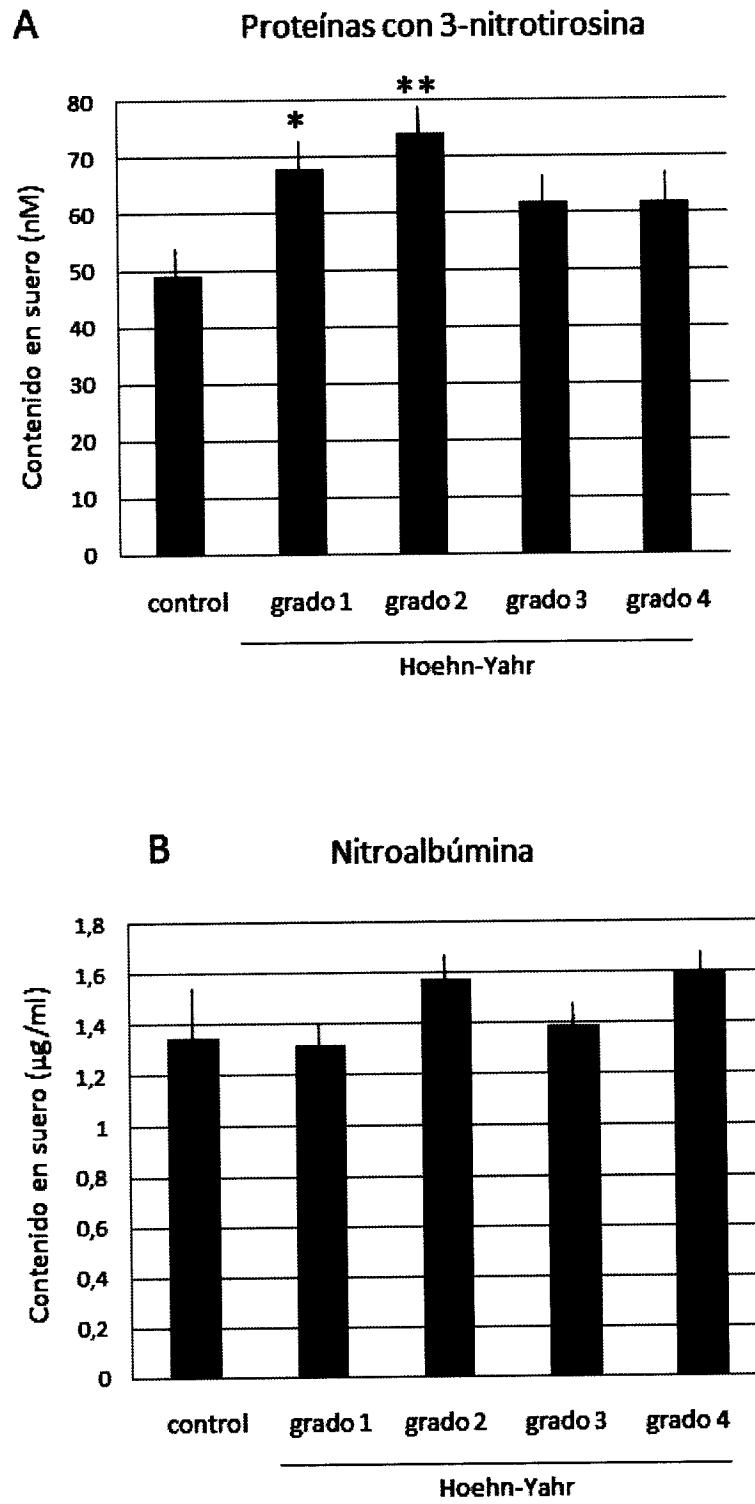
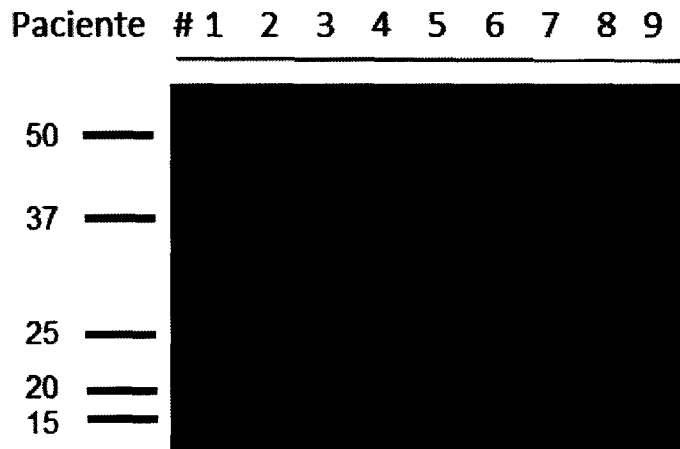


FIG. 2

A. Proteínas nitrotirosinadas



B. α -sinucleína

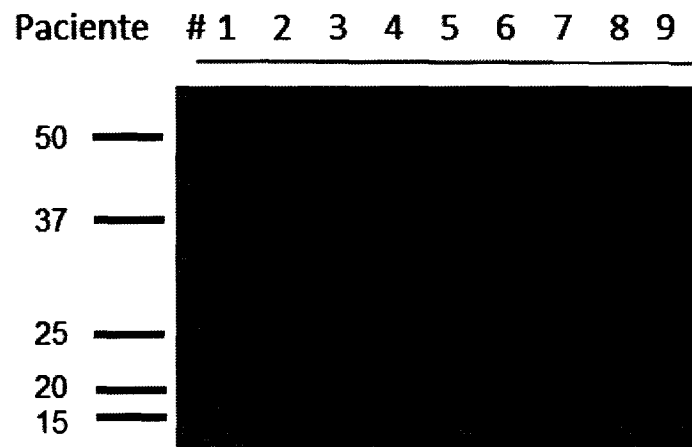


FIG. 3

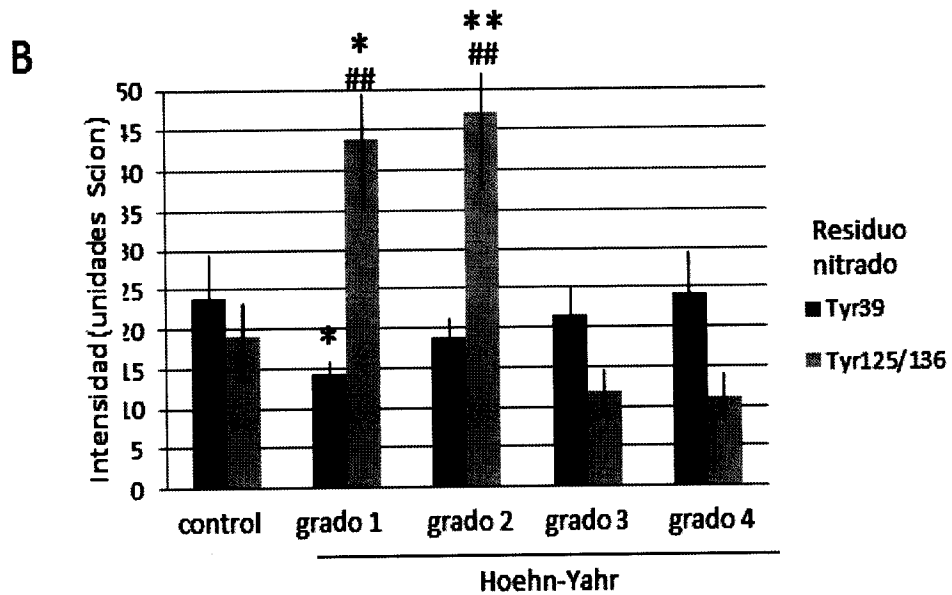
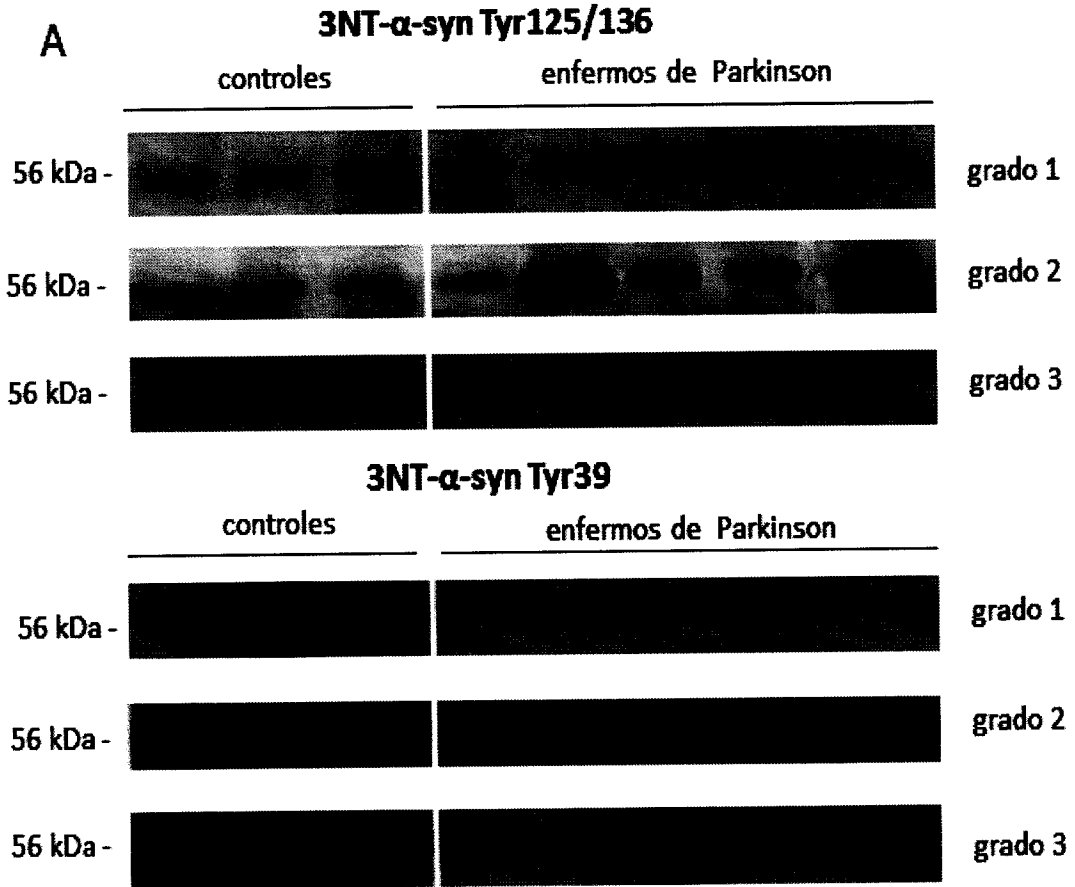


FIG. 4A

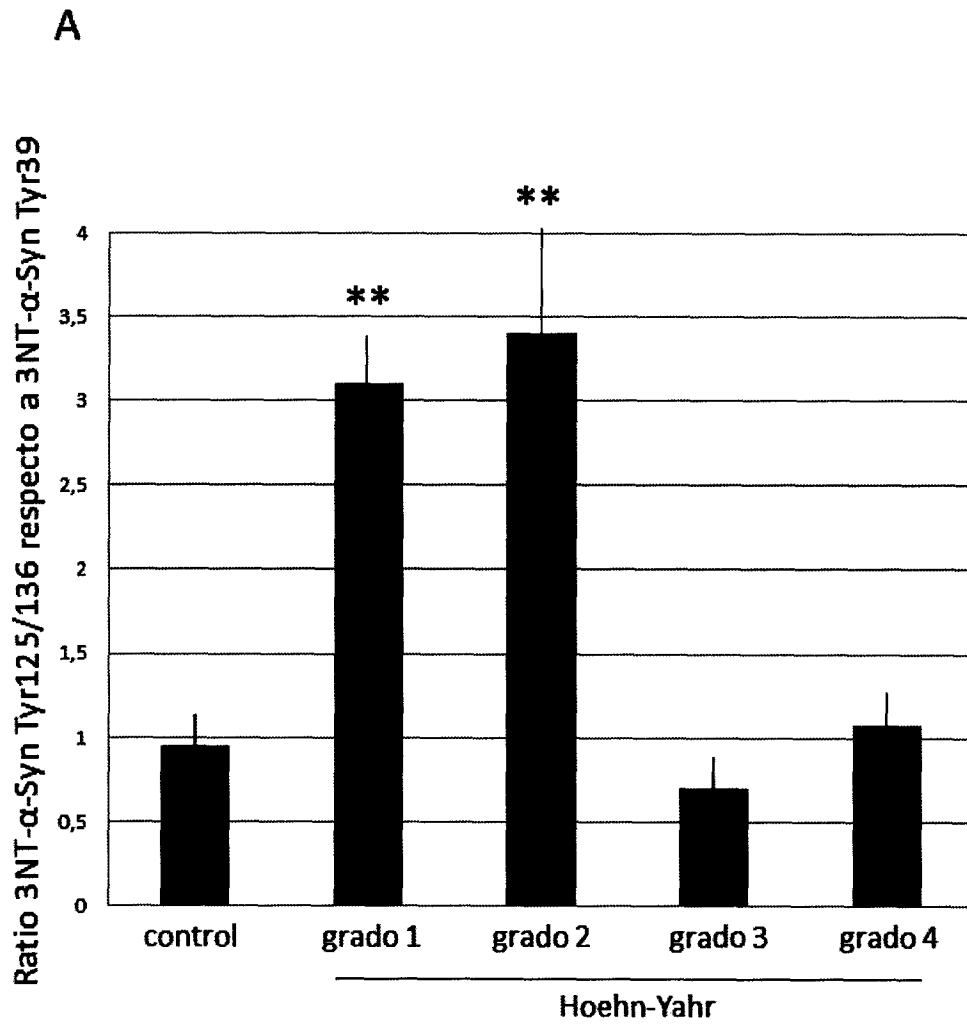
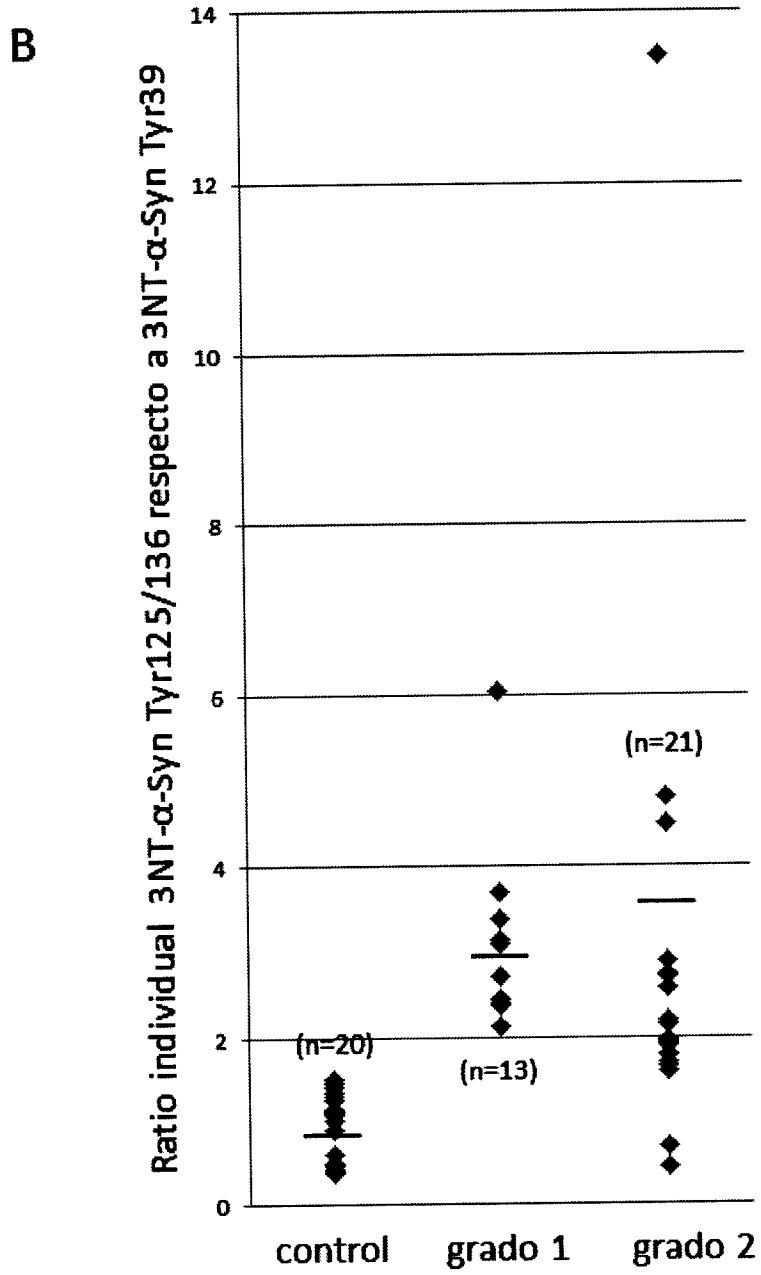


FIG. 4B



LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Sevilla
Servicio Andaluz de Salud
- <120> MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON EN ESTADÍOS TEMPRANOS
- <130> ES1650.28
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 140
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Asp	Val	Phe	Met	Lys	Gly	Leu	Ser	Lys	Ala	Lys	Glu	Gly	Val	Val
1				5					10					15	
Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Gln	Gly	Val	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Lys
			20				25						30		
Thr	Lys	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Ser	Lys	Thr	Lys	Glu	Gly	Val
		35				40						45			
Val	His	Gly	Val	Ala	Thr	Val	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Glu	Gln	Val	Thr
	50					55					60				
Asn	Val	Gly	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Ala	Val	Ala	Gln	Lys
65					70					75				80	
Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Phe	Val	Lys
				85					90					95	
Lys	Asp	Gln	Leu	Gly	Lys	Asn	Glu	Glu	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Gly	Ile
			100				105						110		
Leu	Glu	Asp	Met	Pro	Val	Asp	Pro	Asp	Asn	Glu	Ala	Tyr	Glu	Met	Pro
		115					120					125			
Ser	Glu	Glu	Gly	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Glu	Pro	Glu	Ala				
130						135					140				