

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 526**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2011 E 11738258 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2591367**

54 Título: **Método para diagnóstico**

30 Prioridad:

06.07.2010 GB 201011420

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

26.05.2015

73 Titular/es:

**UNITED ARAB EMIRATES UNIVERSITY (50.0%)
P.O. Box 17551 Al Ain
Abu Dhabi, AE y
UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PERUGIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**EL-AGNAF, OMAR;
PARNETTI, LUCILLA y
CALABRESI, PAOLO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 536 526 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para diagnóstico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para identificar si un paciente tiene o no la enfermedad de Parkinson (PD). En particular, la invención se refiere a un método para identificar si un individuo tiene o no PD en lugar de un trastorno neurodegenerativo diferente que no es PD.

10

Antecedentes de la invención

Los trastornos neurodegenerativos a menudo se clasifican en base a anomalías en la α -sinucleína (α -sin) o proteína tau, identificándose por lo general dichas anomalías durante un análisis patológico. Como resultado, un trastorno neurodegenerativo por lo general se clasifica como una sinucleinopatía o una tauopatía, con las dos categorías a menudo visualizándose como dos tipos distintos de entidad clínica y patológica.

15

Esta visión es coherente con las manifestaciones clínicas más evidentes de trastornos comunes en cada categoría. Por ejemplo, el trastorno más común clasificado como una sinucleinopatía, la Enfermedad de Parkinson (PD), se caracteriza por disfunción motora extrapiramidal, mientras que la tauopatía más común, la Enfermedad de Alzheimer (AD) se define por demencia, al igual que otra tauopatía relativamente común, la Demencia Frontotemporal (FTD).

20

A pesar de esto, existen coincidencias considerables en los síntomas clínicos de las sinucleinopatías y las tauopatías. Por ejemplo, los pacientes con PD frecuentemente tienen demencia, y los pacientes con AD y FTD a menudo manifiestan parkinsonismo. La Demencia con cuerpos de Lewy (DLB), aunque se define como una sinucleinopatía, ejemplifica la existencia de un continuo entre los síntomas clínicos de las sinucleinopatías y de las tauopatías. Este continuo conduce a dificultades cuando se intenta diagnosticar a un paciente de forma precisa, en particular en un estadio inicial de su enfermedad.

25

Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollo de un ensayo de diagnóstico fiable que pueda diferenciar entre trastornos neurológicos diferentes.

30

El documento de patente WO 2009/152607 desvela métodos para diagnosticar enfermedades neurodegenerativas.

35 Sumario de la Invención

Existen evidencia creciente que apoya una coincidencia funcional y morfológica entre las sinucleinopatías y las tauopatías. Por ejemplo:

40

(i) se han encontrado tau y α -sinucleína fosforiladas en fracciones enriquecidas de forma sináptica en varias sinucleinopatías;

(ii) se ha descrito una colocalización específica de ovillos neurofibrilares y cuerpos de Lewy en una familia con afasia progresiva;

45

(iii) en el cerebro de algunos pacientes que portan mutación c.709-2A>G de la progranulina, se ha documentado una patología α -sin difusa;

(iv) se ha descrito un caso de degeneración lobular frontotemporal con inclusiones tau-negativas ubiquitinadas y patología α -sin cortical difusa;

50

(v) miembros de la familia A de San Francisco, afectados con FTD unida a 17q y esclerosis lateral amiotrófica sin mutaciones tau, mostraron en sus cerebros inclusiones tau ir α -sin, combinando de este modo las características de una α -sinucleinopatía y de una tauopatía.

Además, mutaciones en LRRK2 conocidas porque causan Parkinsonismo están asociados no solamente con degeneración neuronal dopaminérgica, sino también con la acumulación de α -sin, tau, o ambas proteínas. También existen otras características genéticas compartidas entre tauopatías y sinucleinopatías. La coincidencia en las características clínicas y patológicas de tauopatías y sinucleinopatías plantea la posibilidad de que la proteína tau pueda ser importante en la patogénesis de la PD. Recientemente, se ha informado que la variabilidad genética en el gen tau (MAPT) confiere susceptibilidad a la PD.

55

Como un biomarcador candidato de sinucleinopatías, en particular PD y demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la determinación de α -sin en el fluido cefalorraquídeo (CSF) podría mejorar la precisión del diagnóstico clínico para estas afecciones neurodegenerativas. Sin embargo, dado que el desarrollo de ensayos para la medida de α -sin en el CSF es bastante reciente, solamente están disponibles unos pocos estudios sobre este tema y todos ellos son retroactivos. Un estudio informó que los pacientes con PD muestran niveles de α -sin en el CSF significativamente menores en comparación con los controles y que tal reducción se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Otro estudio encontró niveles de α -sinucleína en el CSF inferiores en un grupo de sinucleinopatía primaria (DLB y PD) en comparación con AD o sujetos de control no neurodegenerativos. Por el contrario, otros informes posteriores

65

no pudieron demostrar ninguna diferencia en los niveles de α -sin en el CSF entre PD y controles y entre DLB y enfermedad de Alzheimer (AD). Un estudio adicional tampoco pudo mostrar diferencias significativas entre DLB y AD, y encontró una asociación inversa entre niveles de α -sin en el CSF y duración de la enfermedad solamente en

5 Por el contrario, varios estudios han mostrado que los biomarcadores clásicos en el CSF (por ejemplo, β amiloide₁₋₄₂, tau, tau fosforilada) pueden ser útiles para el diagnóstico precoz de la AD. Estos biomarcadores pueden representar la expresión *in vivo* del proceso neurodegenerativo que se produce en el cerebro de pacientes con AD incluso antes del inicio clínico de la demencia. Por consiguiente, los presentes inventores consideraron que, aunque estos biomarcadores no contribuyen directamente al diagnóstico de demencias no AD, podrían proporcionar información adicional sobre la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas asociadas con deterioro cognitivo. De hecho, el fenotipo clínico de la mayoría de los trastornos neurodegenerativos, caracterizado por déficits de movimiento y/o cognitivos, puede ser la consecuencia de patologías simultáneas, es decir patología de cuerpos de Lewy y Alzheimer, que resulta de la interacción mutua entre α -sin, β -amiloide_{1, 42} y tau, durante el transcurso de la enfermedad.

Por lo tanto, los inventores presentaron la hipótesis de que una combinación de diferentes biomarcadores del CSF podría ayudar a diferenciar entre estos trastornos neurodegenerativos, especialmente en la fase inicial, cuando el diagnóstico clínico es más difícil y su precisión es crucial, en vista de tratamiento farmacológico apropiado y oportuno. Los inventores han encontrado que, a pesar de las incoherencias informadas anteriormente en niveles informados de α -sin en el CSF, la evaluación de la relación de la concentración total de tau en una muestra con respecto a la concentración de α -sin mostró niveles significativamente más bajos para esta relación en pacientes con PD en comparación con otros grupos patológicos ($P < 0,002$), incluyendo AD, FTD y DLB. Se obtuvieron resultados similares para la relación de la concentración de tau fosforilada (p-tau) en una muestra con respecto a la concentración de α -sin.

Por consiguiente la presente invención proporciona:

Un método para identificar si un individuo tiene enfermedad de Parkinson (PD) o no en lugar de una enfermedad neurodegenerativa que no es PD seleccionada entre AD, DLB y FTD, comprendiendo dicho método:

- (i) medir la concentración de α -sinucleína (α -sin) en una muestra de fluido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del individuo;
- (ii) medir la concentración de tau sin fosforilar (tau) y / o fosforilada ([rho]-tau) presente en la muestra; y
- (iii) calcular la relación de:

$$\frac{\text{concentración total de tau}}{\text{concentración de } \alpha\text{-sin}} \quad \text{o} \quad \frac{\text{concentración de p-tau}}{\text{concentración de } \alpha\text{-sin}}$$

en la que la concentración total de tau es la concentración acumulativa de p-tau y tau medida en la muestra; y (iv) determinar de ese modo si el individuo tiene PD o no.

también se describe un método para retrasar o prevenir el inicio de los síntomas de la PD en un individuo, que comprende;

- (i) determinar si un individuo tiene PD o no usando un método de acuerdo con la invención; y
- (ii) administrar a un individuo identificado en (i) como que tiene PD, una concentración terapéuticamente eficaz de un agente que directa o indirectamente inhibe la agregación y/o toxicidad de α -sin, un agente que reduce la expresión de la proteína α -sin, un agente que directa o indirectamente aumenta o estimula la degradación de agregados de α -sin, o un agente neuroprotector.

También se describe un kit para uso en un método para determinar si un individuo tiene PD o no, kit que comprende medios para la detección de α -sinucleína, tau y /o p-tau en una muestra de CSF. La invención también proporciona el uso de dicho kit en un método de la invención.

55 Sumario de las figuras

La Figura 1 muestra la dispersión de concentraciones de α -sin en el CSF observado en sujetos con Enfermedad de Parkinson (PD), Demencia con cuerpos de Lewy (DLB), Enfermedad de Alzheimer (AD), Demencia Frontotemporal (FTD) e individuos cognitivamente normales (OND).

La Figura 2 muestra una línea de regresión y límites de confianza de un 95 % de tau total frente a α -sin (transformado de forma logarítmica) en todo el grupo estudiado.

La Figura 3 muestra la distribución de las relaciones de marcador de CSF indicado (media +- ETM) en sujetos con Enfermedad de Parkinson (PD), Demencia con cuerpos de Lewy (DLB), Enfermedad de Alzheimer (AD),

Demencia Frontotemporal (FTD). * indica cuando se observaba una diferencia significativa para un grupo dado frente a los otros grupos patológicos.

La Figura 4 muestra curvas de Característica Operativa del Receptor (ROC) para valores en muestras de CSF de sujetos con PD para la relación de tau total / α -sin (línea continua, fina – que se inclina hacia la parte superior izquierda de la Figura), la relación de A β 42 / α -sin (línea gruesa de color oscuro – que se inclina hacia la parte inferior derecha de la Figura), la relación p-tau / α -sin (línea de color gris claro, gruesa – que se inclina hacia la parte superior izquierda, generalmente por debajo de la línea de tau total / α -sin), y solamente la concentración de α -sin (línea discontinua fina – que se inclina entre las líneas de p-tau y tau total / α -sin y la línea de A β 42 / α -sin).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para identificar si un sujeto tiene PD o no en lugar de una enfermedad o trastorno neurodegenerativos que no es PD. La invención por lo tanto se refiere a la detección de PD en el sujeto individual. El individuo por lo general es un mamífero. El mamífero por lo general es un ser humano o un mamífero doméstico tal como un caballo, una vaca, una oveja, un perro o un gato. El individuo es preferentemente un ser humano. El individuo puede tener hasta 30, hasta 40, hasta 50, hasta 60 o hasta 70 años de edad. El individuo puede tener una edad de 30 a 40, de 30 a 50, de 30 a 60 o de 30 a 70 años. El individuo puede tener una edad de 40 a 50, de 40 a 60 o de 40 a 70 años. El individuo puede tener una edad de 50 a 60 o de 50 a 70 años.

Por lo general, se sospecha que el individuo presenta el riesgo de desarrollar un trastorno neurodegenerativo. Esto se puede deber a que el individuo tiene una historia familiar de un trastorno neurodegenerativo o se puede deber a otras razones. El individuo puede tener o se le puede haber diagnosticado con uno o más síntomas asociados con un diagnóstico clínico de un trastorno neurodegenerativo. El trastorno neurodegenerativo puede ser Enfermedad de Parkinson (PD), Enfermedad de Alzheimer (AD), Demencia con cuerpos de Lewy (DLB) o Demencia Frontotemporal (FTD).

Como un ejemplo, el individuo puede presentar uno o más de los siguientes síntomas asociados con la PD:

Síntomas Motores Primarios

Por lo general, la práctica clínica requiere la presencia de al menos un síntoma motor primario para un diagnóstico de la PD. Los síntomas motores primarios son:

(i) Temblor en Reposo: Aproximadamente un 70 por ciento de personas con Parkinson experimentan un ligero temblor, que a menudo es el primer síntoma identificable. Por lo general, el temblor se produce en la mano o en el pie en un lado del cuerpo, o menos habitualmente en la mandíbula o la cara. El temblor aparece como una "sacudida" o movimiento oscilante. El temblor del Parkinson normalmente aparece cuando los músculos de una persona se relajan, de ahí que se le denomina "temblor en reposo". Por lo general, la parte afectada del organismo tiembla cuando no está desarrollando trabajo, y el temblor disminuye cuando una persona comienza una acción. A menudo, el temblor se extiende al otro lado del cuerpo a medida que la enfermedad avanza, pero sigue siendo más evidente en el lado original de la aparición.

(ii) Bradiquinesia (Movimiento lento): el paciente presenta movimiento lento de forma notable. Además de movimiento lento, una persona con bradiquinesia por lo general tendrá un movimiento incompleto, dificultad para comenzar los movimientos y dificultad para detener de forma repentina los movimientos en curso. Las personas que tienen bradiquinesia pueden caminar con pasos cortos, arrastrando los pies (festinación). Se pueden producir bradiquinesia y rigidez en los músculos faciales, reduciendo la variedad de expresiones faciales de una persona y dando como resultado un aspecto "similar al de una máscara".

(iii) Rigidez: también denominada aumento del tono muscular, se refiere a dureza o inflexibilidad de los músculos. En la rigidez, el tono muscular de una extremidad afectada siempre está rígido y no se relaja, dando como resultado en ocasiones una disminución de la amplitud del movimiento. Por ejemplo, una persona que tiene rigidez puede no ser capaz de balancearse sobre sus brazos cuando camina porque los músculos están demasiado tensos. La rigidez puede causar dolor y calambres.

(iv) Inestabilidad Postural (Alteración de Equilibrio y Coordinación): Los sujetos con PD a menudo experimentan inestabilidad cuando permanecen de pie, o tienen alteración del equilibrio y de la coordinación. Estos síntomas, combinados con otros síntomas tales como bradiquinesia, aumentan el riesgo de caída. Los sujetos con problemas de equilibrio pueden tener dificultades al hacer giros o movimientos bruscos. El sujeto puede atravesar periodos de "congelación", en los que el sujeto encuentra difícil comenzar a caminar. La lentitud y el carácter incompleto del movimiento también pueden afectar a la capacidad de hablar y de tragar.

Síntomas Motores Secundarios

No todos los sujetos con PD experimentarán síntomas motores secundarios. Sin embargo, la mayoría de los sujetos por lo general presentan uno o más de los siguientes:

- Postura encorvada, una tendencia a inclinarse hacia adelante
- Distonía
- Fatiga
- Alteración de la destreza motora fina y de la coordinación motora
- 5 - Alteración de la coordinación motora total
- Pobreza de movimiento (disminución del balanceo de los brazos)
- Acatisia
- Problemas del habla, tales como suavidad de la voz o pronunciación mal articulada causada por falta de control muscular
- 10 - Pérdida de expresión facial, o "máscara"
- Micrografía (escritura con letra pequeña, estrecha)
- Dificultad para tragar
- Disfunción sexual
- Babeo

15

Síntomas No motores

Una serie de síntomas no motores están asociados con la PD. Sin embargo, estos síntomas no son específicos para la PD, y por lo general solamente se identifican como indicativos de PD de forma retrospectiva. Es decir, los síntomas promotores experimentados por un sujeto por lo general no se reconocen como indicativos de PD hasta después de que se haya confirmado la presencia de síntomas motores primarios y secundarios. Aún así, por lo general un paciente con PD presentara uno o más de los siguientes:

- Dolor
- 25 - Demencia o confusión
- Trastornos del sueño (por ejemplo, trastorno de comportamiento del sueño REM (RBD))
- Hiposmia
- Estreñimiento
- Problemas cutáneos
- 30 - Depresión
- Miedo o ansiedad
- Dificultades de memoria y pensamiento lento
- Problemas urinarios
- Fatiga y dolor
- 35 - Pérdida de energía
- Comportamiento compulsivo (por ejemplo, Juegos de azar)
- Calambres

El individuo se puede haber clasificado o no de acuerdo con la escala de Hoehn-Yahr. La escala de Hoehn-Yahr es un sistema usado normalmente para describir cómo avanzan los síntomas de la enfermedad de Parkinson. La escala asigna estadios de 0 a 5 para indicar el nivel relativo de discapacidad:

- Estadio uno: Síntomas solamente en un lado del cuerpo.
- Estadio dos: Síntomas en ambos lados del cuerpo. Sin alteración del equilibrio.
- 45 - Estadio tres: Alteración del equilibrio. Enfermedad leve a moderada. Físicamente independiente.
- Estadio cuatro: Discapacidad grave, pero todavía capaz de caminar o permanecer de pie sin ayuda.
- Estadio cinco: En silla de ruedas o postrado en la cama a menos que tenga ayuda.

Si se clasifica, el individuo por lo general presenta grado 2 o inferior en la escala de Hoehn-Yahr.

El individuo de haber sido diagnosticado o no con PD de acuerdo con los criterios del U Banco de Cerebros de la Sociedad de la Enfermedad de Parkinson del Reino Unido. Estos criterios son:

Etapa 1: Diagnóstico del Síndrome Parkinsoniano

- 55 - Bradiquinesia
- Al menos uno de los siguientes
- Rigidez muscular
- 60 - Temblor en reposo de 4-6 Hz
- Inestabilidad postural no causada por disfunción visual primaria, vestibular, cerebelosa, o propioceptiva

Etapa 2: Identificación de características que tienden a excluir la enfermedad de Parkinson como la causa de Parkinsonismo

65

- historia de apoplejías repetidas con progresión en etapas de características parkinsonianas
- historia de lesiones en la cabeza repetidas
- historia de encefalitis definitiva
- crisis oculógiras
- 5 - tratamiento neuroléptico al inicio de los síntomas
- más de un familiar afectado
- remisión sostenida
- características estrictamente unilaterales después de 3 años
- parálisis supranuclear de la mirada
- 10 - signos cerebelosos
- implicación autónoma grave precoz
- demencia grave precoz con alteraciones de memoria, lenguaje, y praxis
- signo de Babinski
- presencia de tumor cerebral o hidrocefalia de comunicación en estudio de formación de imágenes
- 15 - respuesta negativa a dosis elevadas de levodopa en ausencia de mala absorción
- exposición a MPTP (1-metil 4-fenil 1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina)

Etapas 3: Identificación de características que apoyan un diagnóstico de enfermedad de Parkinson (tres o más en combinación con la etapa 1 necesarias para el diagnóstico de enfermedad de Parkinson definitiva):

- 20 - Inicio unilateral
- Temblor en reposo presente
- Trastorno progresivo
- Asimetría persistente que afecta principalmente al lado en el inicio
- 25 - Respuesta excelente (70-100 %) a la levodopa
- Corea inducida por levodopa grave
- Respuesta a levodopa durante 5 años o más
- Transcurso clínico de diez años o más.

30 Se puede sospechar que el individuo está en riesgo de desarrollar PD debido a la presencia de uno o más factores que aumentan la susceptibilidad a la PD. El individuo puede tener una historia familiar de PD. Grandes estudios epidemiológicos demuestran que las personas con un familiar de primer grado afectado, tal como un padre o hermano, tienen un índice de riesgo de dos a tres de desarrollar Parkinson, en comparación con la población general.

35 El individuo puede tener una mutación o polimorfismo en un gen o sitio asociado con la PD. Por ejemplo, el individuo puede tener una mutación individual en uno o más de los siguientes genes o sitios: PARK1 (gen que codifica α -sinucleína (SNCA)), PARK2 (gen que codifica la sospecha de ligasa de ubiquitina-proteína de Parkin (PRKN2)), PARK3, PARK4, PARK5 (gen que codifica la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1), PARK6 (gen que codifica una supuesta proteína quinasa (PINK1)), PARK7 (gen que codifica DJ-1), o PARK8 (gen que codifica repeticiones de quinasa 2 ricas en leucina (LRRK2)).

45 El individuo puede tener una mutación o polimorfismo en uno o más de los genes que codifican los siguientes productos: Receptor de dopamina 2, Receptor de dopamina 4, Transportador de dopamina, Monoamino oxidasa A, Monoamino oxidasa B, Catecol-o-metil-transferasa, enzima de desintoxicación de N-acetil transferasa 2, Apo-lipoproteína E, Enzima T1 de desintoxicación de glutatión transferasa, Enzima M1 de desintoxicación de glutatión transferasa, Enzima de desintoxicación de glutatión transferasa, o Enzima Z1 de desintoxicación de glutatión transferasa; y/o en el gen mitocondrial de Glu del ARNt y/o el Gen mitocondrial del complejo 1. Preferentemente, el individuo tiene una mutación o polimorfismo en el gen que codifica la Monoamino oxidasa B, y/o enzima de desintoxicación de N-acetil transferasa 2, y/o enzima de desintoxicación T1 de glutatión transferasa y/o en el gen mitocondrial de del ARNt.

55 También pueden estar presentes factores de riesgo ambientales. Hasta la fecha, la investigación epidemiológica ha identificado la vida rural, agua de pozo, uso de herbicidas y exposición a pesticidas como factores que pueden estar vinculados a la PD. Además, MPTP (1-metil 4-fenil 1,2,3,6 tetrahidropiridina) puede causar Parkinsonismo si se inyecta. La estructura química de MPTP es similar a la del herbicida paracuat usado ampliamente y daña a las células de una manera similar al pesticida rotenona, así como algunas otras sustancias.

60 Como un ejemplo adicional, el individuo puede presentar uno o más de los siguientes síntomas asociados con DLB. Las características fundamentales de DLB incluyen: 1) cognición fluctuante con grandes variaciones en atención y estado de alerta en el día a día y hora a hora; 2) alucinaciones visuales recurrentes (observadas en un 75 % de las personas con DLB); y 3) características motoras del parkinsonismo. Los síntomas sugerentes son Trastorno de comportamiento de movimiento rápido de ojos y anomalías detectadas en exploraciones de PET o SPECT.

65 Por ejemplo, el individuo puede presentar uno o más de los criterios de consenso para el diagnóstico clínico de DLB probable y posible (criterios de McKeith), que son los siguientes:

a.) La característica central necesaria para un diagnóstico de demencia con cuerpos de Lewy (DLB) es el deterioro cognitivo progresivo de magnitud suficiente para interferir con la función social u ocupacional normal. La alteración de la memoria importante o persistente no tiene por qué producirse necesariamente en los estadios iniciales pero normalmente es evidente con la evolución. Las deficiencias en los ensayos de atención y de habilidades frontales subcorticales y capacidad visuoespacial pueden ser especialmente importantes.

b.) Dos de las siguientes características principales son esenciales para un diagnóstico de DLB probable, uno es esencial para DLB posible.

- i. Cognición fluctuante con variaciones pronunciadas en atención y estado de alerta.
- ii. Alucinaciones visuales recurrentes que por lo general están bien formadas y detalladas.
- iii. Características motoras espontáneas de parkinsonismo.

c.) Son características de apoyo del diagnóstico:

- i. Caídas repetidas
- ii. Síncope
- iii. Pérdida de conciencia transitoria
- iv. Sensibilidad neuroléptica
- v. Delirios sistematizados
- vi. Alucinaciones en otras modalidades.

d.) Un diagnóstico de DLB es menos probable en presencia de:

- i. Enfermedad por apoplejía, evidente como signos neurológicos focales o en formación de imágenes del cerebro.
- ii. Evidencia en examen físico e investigación de cualquier enfermedad física, u otro trastorno cerebral, suficiente para tener en cuenta el cuadro clínico.

Se puede sospechar que el individuo está en riesgo de desarrollar DLB debido a la presencia de uno o más factores que aumentan la susceptibilidad a la DLB. El individuo puede tener una historia familiar de DLB. Por ejemplo, ser portador de ApoE épsilon 4 es un factor de riesgo de DLB. Además, la presentación de mutaciones para la glucocerebrosidasa (GBA) representa un riesgo genético reconocido para las sinucleinopatías.

Como un ejemplo adicional, el paciente puede presentar uno o más de los síntomas asociados con la AD, incluyendo lapsus de memoria y problemas para encontrar las palabras adecuadas durante la conversación, confusión, irritabilidad y agresividad, delirios, paranoia, cambios de humor, descomposición del lenguaje, pérdida de memoria a largo plazo, y retirada general. Por lo general, el paciente puede presentar uno o más de los criterios de NINCDS-ADRDA para el diagnóstico clínico de AD probable, que son los siguientes:

- Enfermedad de Alzheimer Definitiva: El paciente cumple los criterios para la enfermedad de Alzheimer probable y tiene pruebas histopatológicas de AD a través de autopsia o biopsia.
- Enfermedad de Alzheimer Probable: La demencia se ha establecido por el examen clínico y neuropsicológico. Los deterioros cognitivos también tienen que ser progresivos y estar presentes en dos o más áreas cognitivas. El inicio de las deficiencias se ha situado entre las edades de 40 y 90 años y, por último, tiene que haber una ausencia de otras enfermedades que pueden producir un síndrome de demencia.
- Enfermedad de Alzheimer Posible: Hay un síndrome de demencia con un inicio, presentación o progresión atípicos; y sin una etiología conocida; pero se cree que las enfermedades comórbidas capaces de producir demencia sean el origen de la misma.
- Enfermedad de Alzheimer Improbable: El paciente presenta un síndrome de demencia con un inicio súbito, signos neurológicos focales o convulsiones o trastornos de la marcha precoces en el transcurso de la enfermedad.

Se puede sospechar que el individuo está en riesgo de desarrollar AD debido a la presencia de uno o más factores que aumentan la susceptibilidad a la AD. El individuo puede tener una historia familiar de AD. Por ejemplo, el individuo puede tener una historia familiar de demencia en un familiar de primer grado (hermanos o padres), y mutaciones en genes que incluyen proteína precursora amiloide (APP), presenilina 1 y presenilina 2. La ApoE épsilon 4 es factor de riesgo para la AD tardía.

Como un ejemplo adicional, el individuo puede presentar uno o más síntomas asociados con FTD. Los síntomas de FTD se pueden clasificar (más o menos) en dos grupos que son la base de las funciones del lóbulo frontal: síntomas de comportamiento (y/o cambio de personalidad) y síntomas relacionados con problemas de la función ejecutiva. Los síntomas del comportamiento incluyen letargo y espontaneidad o desinhibición opuesta. Los pacientes apáticos pueden llegar a ser socialmente introvertidas y permanecer en la cama todo el día o ya no cuidar de sí mismos. Los pacientes desinhibidos pueden hacer comentarios inapropiados (a veces sexuales) o realizar actos inapropiados. Los pacientes con FTD pueden tener problemas en ocasiones con la policía a causa de un comportamiento inadecuado como el robo. Los hallazgos recientes indican que los síntomas psicóticos son raros en FTD, debido

posiblemente a la implicación temporo-límbica limitada en este trastorno. Entre los pacientes con FTD, solamente 2 (2,3 %) tenían delirios, 1 de los cuales tenían ideas paranoide; ningún paciente con FTD tenía alucinaciones. Esto era significativamente menor que en los pacientes con AD, (17,4 %) de los cuales tenían delirios y paranoia. La función ejecutiva es la habilidad cognitiva de planificación y organización. Los pacientes se vuelven incapaces de realizar las habilidades que requieren una planificación o secuenciación complejas. Por lo general, el paciente puede o no puede haber sido examinado usando (o haber sido diagnosticado usando) los criterios de Lund-Manchester para el diagnóstico clínico de FTD, que requieren la presencia de al menos dos de las siguientes características: pérdida de la conciencia personal, hábitos alimentarios extraños, la perseverancia y cambio de humor. Además, los pacientes deben tener uno o más de los siguientes: disfunción ejecutiva frontal, habla reducida, y capacidad visuoespacial conservada. Los criterios también se refieren a varias características importantes de apoyo, que incluyen inicio antes de los 65 años de edad, historia familiar de FTD, incontinencia urinaria precoz, enfermedad de neuronas motoras, y (en los últimos estadios) aquinesia, rigidez y temblor.

Se puede sospechar que el individuo está en riesgo de desarrollar FTD debido a la presencia de uno o más factores que aumentan la susceptibilidad a FTD. El individuo puede tener una historia familiar de FTD. Por ejemplo, aproximadamente un 20-50 % de los individuos con demencia frontotemporal (FTD) tienen un familiar de primer grado afectado. Se han identificado cambios en los siguientes cinco genes: gen MAPT en el cromosoma 17 que produce la proteína tau; gen GRN, también denominado el gen PGRN, en el cromosoma 17 que produce la proteína progranulina; gen TARDBP en el cromosoma 1 que produce proteína de unión al ADN de respuesta transactiva con un peso molecular de 43 kDa (TDP-43); gen VCP en el cromosoma 9 que codifica la proteína que contiene valosina; y el gen CHMP2B en el cromosoma 3 que expresa proteína 2B del cuerpo multivesicular cargado (también conocida como proteína 2B que modifica la cromatina). Las mutaciones en los genes MAPT y GRN en el cromosoma 17 son las causas genéticas más comunes de FTD.

El paciente puede o no haber sido evaluado mediante el examen del estado Mini-mental (MMSE- Journal of Psychiatric Research 1975; 12 (3): 189-98) u otro examen clínico para evaluar la demencia tal como la Evaluación de Demencia General de Milan (MODA - J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994; 57: 1510-17). Usando el MMSE, cualquier puntuación de más de 27 (de 30) es efectivamente normal. Por debajo de ésta, 20-26 indica algún deterioro cognitivo; 10-19 deterioro cognitivo de moderada a grave, y por debajo de 10 deterioro cognitivo muy grave. La puntuación sin procesar también se puede corregir para el grado de educación y la edad. Las puntuaciones de bajas a muy bajas se correlacionan estrechamente con la presencia de demencia. Por lo general, el paciente en el método de la invención tendrá una puntuación de MMSE en el intervalo de 15 – 30.

La presente invención implica medir la concentración de α -sin y la concentración de la proteína tau en una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) tomada de un individuo. La invención puede medir la concentración total de proteína tau, en la que la concentración total es la concentración de tau fosforilada (p-tau) que se añade a la concentración de tau sin fosforilar (tau). Como alternativa, solamente se puede medir la concentración de α -sin y la concentración de p-tau. A continuación se calcula la relación de α -sin a tau total o a p-tau. Por concentración se entiende la cantidad de un marcador dado por unidad de volumen. Por ejemplo, las concentraciones de la invención por lo general se pueden medir en unidades de ng/ml.

De acuerdo con la presente invención, una relación de tau total a α -sin inferior a 20:1, 19,5:1, 19:1, 18,5:1, 18:1, 17,5:1 o 17:1 es indicativo de que el paciente tiene PD en lugar de un trastorno neurodegenerativo diferente que no es PD. Preferentemente, la relación es inferior a 18,5:1.

De acuerdo con la presente invención, una relación de p-tau a α -sin inferior a 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1 o 2:1 es indicativo de que el paciente tiene PD en lugar de un trastorno neurodegenerativo diferente que no es PD. Preferentemente, la relación es inferior a 3,1:1,

De acuerdo con la presente invención, una disminución de la relación de α -sin a tau total o a p-tau en comparación con la relación en una muestra de un paciente con AD, DLB o FTD indica que el individuo tiene PD en lugar de trastorno neurodegenerativo un diferente que no es PD.

Por ejemplo la relación de tau total o de p-tau a α -sin en una muestra de un paciente con PD puede disminuir con un índice de al menos 1,5, un índice de al menos 2, un índice de al menos 2,5, un índice de al menos 3, un índice de al menos 4 o un índice de al menos 5 con respecto a la relación en una muestra de un paciente con AD, DLB o FTD.

De acuerdo con la presente invención, una relación de tau total o de p-tau a α -sin que no es significativamente diferente a la relación en una muestra de un individuo normal indica que el individuo tiene PD en lugar de un trastorno neurodegenerativo diferente que no es PD.

Por ejemplo, la relación de tau total o de p-tau a α -sin en una muestra de un paciente con PD puede diferir de la relación en una muestra de un paciente normal en una cantidad no superior a un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 % o un 25 %.

Un paciente o individuo normal es un individuo clasificado como cognitiva o neurológicamente normal. Preferentemente, el individuo normal está emparejado por edad al individuo a someter a ensayo.

5 La invención se realiza por lo general *in vitro* en una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del individuo. La muestra por lo general se puede procesar antes de ser sometida a ensayo, por ejemplo por centrifugación. La muestra también se puede almacenar antes del ensayo, preferentemente a temperatura inferior a -70 °C.

10 Se pueden usar métodos convencionales conocidos en la técnica para someter a ensayo el nivel de α -sin, tau y p-tau. Por lo general, estos métodos implican el uso de un agente para la detección de la proteína relevante. Por lo general, el agente se une específicamente a dicha proteína. El agente puede ser un anticuerpo específico para proteína. Por específico, se entenderá que el agente o anticuerpo se une a α -sin, tau o p-tau sin reactividad cruzada significativa a ninguna otra molécula, en particular ninguna otra proteína, de forma más particular ninguna de las otras proteínas enumeradas. Por ejemplo, un agente o anticuerpo específico para α -sin no mostrará reactividad cruzada significativa con tau o p-tau. Un agente o anticuerpo específico para p-tau no mostrará reactividad cruzada significativa con α -sin o tau. La reactividad cruzada se puede evaluar mediante cualquier método adecuado.

20 Los niveles de proteínas se miden usando cualquier método convencional. Un método preferente es un ensayo de ELISA de sándwich convencional. Es decir, en el que los anticuerpos de captura y detección son anticuerpos que son específicos para la misma proteína pero se unen a diferentes epítopos en esa proteína. De forma ideal, la forma de la "lectura de salida" del método para medir cada proteína debería ser la misma. Esto facilita el cálculo de las relaciones del método de la invención. La "lectura de salida" de un ensayo dado por lo general se convertirá en un nivel de concentración usando una curva patrón generada con muestras de ensayo de concentración conocida en el ensayo.

25 Un anticuerpo usado en cualquier método de la invención puede ser un anticuerpo completo o un fragmento del mismo que es capaz de unirse a la proteína deseada. El anticuerpo puede ser monoclonal. Tal un anticuerpo completo por lo general es un anticuerpo que se produce mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener anticuerpos policlonales por inmunización de un mamífero, por lo general un conejo o un ratón, con la proteína diana en condiciones adecuadas y aislar moléculas de anticuerpos, por ejemplo, del suero de dicho mamífero. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales mediante hibridoma o métodos recombinantes.

30 Por lo general, el anticuerpo es un anticuerpo de mamífero, tal como un anticuerpo de primate, ser humano, roedor (por ejemplo ratón o rata), conejo, ovino, porcino, equino o camello. El anticuerpo puede ser un anticuerpo camélido o anticuerpo de tiburón. El anticuerpo puede ser un nanocuerpo. El anticuerpo puede ser cualquier clase o isotipo de anticuerpo, por ejemplo IgM, pero preferentemente es IgG. El fragmento de anticuerpo completo que se puede usar en el método comprende un sitio de unión a antígeno, por ejemplo, fragmentos de Fab o F(ab)₂. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende la secuencia de diferentes anticuerpos naturales, por ejemplo un anticuerpo humanizado.

40 También se desvela un kit de diagnóstico que comprende medios para medir el nivel de α -sin, tau y p-tau en una muestra, y determinar de este modo si o no el individuo tiene PD. El kit contiene por lo general uno o más anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas anteriores. Por ejemplo, el kit puede comprender un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo de una sola cadena, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR o un anticuerpo humanizado. El anticuerpo puede ser una molécula intacta de inmunoglobulina o un fragmento de la misma tal como un Fab, F(ab)₂ o fragmento de Fv.

45 El kit puede comprender adicionalmente uno o más de otros reactivos o instrumentos que permiten la realización de cualquiera de las realizaciones del método que se ha mencionado anteriormente. Dichos reactivos o instrumentos incluyen uno o más de los siguientes: tampón o tampones adecuados (soluciones acuosas), medios para aislar α -sin, tau o p-tau a partir de una muestra, medios para obtener una muestra del individuo (tal como un recipiente o un instrumento que comprende una aguja) o un soporte que comprende pocillos en los que se pueden realizar reacciones cuantitativas. El kit puede comprender, opcionalmente, instrucciones para permitir el uso o detalles del kit en el método de la invención con respecto a los que los individuos pueden realizar el método.

50 También se desvela un método para retrasar o prevenir la aparición de los síntomas de PD en un individuo. El método comprende: (i) determinar si un individuo tiene PD o no usando un método de acuerdo con la invención; y (ii) administrar a un individuo identificado en (i) como que tiene PD, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que directa o indirectamente inhibe la agregación y/o toxicidad de α -sin, un agente que reduce la expresión de la proteína α -sin, un agente que directa o indirectamente aumenta o estimula la degradación de agregados de α -sin, o un agente neuroprotector. El agente neuroprotector por lo general, es un anti-apoptótico, un anti-oxidante, un anti-glutamatergico, un inhibidor de la monoamino oxidasa B, un antagonista de la adenosina, un agonista de dopamina, un estabilizador mitocondrial o un factor trófico. Por ejemplo, el agente neuroprotector puede ser rasagilina, selegilina, ropinirol, pramipexol, nicotina, minociclina, creatina, cafeína, o coenzima Q10.

El siguiente Ejemplo ilustra la invención:

Ejemplo

5 Métodos

Pacientes

Los sujetos incluidos en este estudio se reclutaron de forma potencial en el periodo de junio de 2005-abril de 2009. Representan una serie consecutiva de pacientes remitidos a nuestro Centro para evaluación diagnóstica. Todos ellos se evaluaron de forma minuciosa incluyendo ensayo neuropsicológico preciso, formación de imágenes neuronales (CT/MRI) y punción lumbar. El CSF se recogió en régimen de Servicio de Día, de acuerdo con el protocolo convencional del hospital y con la aprobación del Comité Ético local, después de que el paciente diera consentimiento por escrito informado o el familiar/cuidador, en el caso de sujetos con demencia. La PD Idiopática se diagnosticó de acuerdo con Banco de Cerebros de la Sociedad de la Enfermedad de Parkinson del Reino Unido. Todos ellos se trataron con L-dopa sola o asociada con agonistas de dopamina, con buen control de síntomas motores (UPRDS-III media: $20,2 \pm 5,3$), y eran funcionalmente independientes (Hoehn e Yahr 1-3). Ninguno de ellos presentaba síntomas clínicamente relevantes de deterioro cognitivo. La DLB probable se definió de acuerdo con criterios de McKeith. Los pacientes se sometieron a evaluación clínica y neurológica meticulosa incluyendo evaluaciones neuropsicológicas (MMSE y MODA), evaluación psicológica y del comportamiento (NeuroPsychiatric Inventory) y evaluación de fluctuaciones, así como formación de imágenes del cerebro por resonancia magnética (MRI) para excluir daños vasculares u otras lesiones. Se realizó Exploración de SPECT DAT en 24 pacientes con DLB, y se observó hipocaptación putaminal en todos ellos. Veintisiete de treinta y dos pacientes con DLB presentaban síntomas extrapiramidales al inicio de la demencia (media UPRDS-III: $18,9 \pm 8,3$), y en 29 de ellos se presentaban alucinaciones visuales. Se producían fluctuaciones cognitivas en todos los pacientes con DLB. La enfermedad de Alzheimer se diagnosticó de acuerdo con los criterios de NINCDS-ADRDA para AD probable. La FTD se diagnosticó de acuerdo con criterios de Lund-Manchester. En este grupo, 12 pacientes presentaban el inicio clínico en forma de afasia no fluente progresiva, 5 mostraban una demencia semántica y 14 se definieron clínicamente como variante frontal. Todos ellos se sometieron a SPECT o PET como criterio de apoyo. Ninguno de ellos presentaba signos relevantes de parkinsonismo al inicio. Como grupo de control, se reclutaron sujetos cognitivamente normales emparejados por edades que se sometieron a punción lumbar como parte del chequeo de diagnóstico para otras afecciones neurológicas (OND) – dolor de cabeza o sospecha de mielopatía. Por lo tanto, OND se refiere a controles cognitivamente normales.

35 *Toma de muestras del CSF*

Se realizó punción lumbar entre las 08.00 y las 10.00 a.m., después de un ayuno durante la noche. El CSF (10 ml) se recogió en tubos de polipropileno estériles, se centrifugó durante 10 minutos a 4000 g y alícuotas de 0,5 ml se congelaron inmediatamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los niveles del CSF de los "biomarcadores clásicos" β amiloide 1-42 ($\text{A}\beta_{42}$), tau total, y p-tau se midieron usando métodos convencionales de ELISA (Innotest β amiloide 1-42, hTAU-Ag, p-TAU 181 Ag, Innogenetics NV, Gante, Bélgica).

Inmunoensayo para α -Sinucleína en el CSF

Se midió α -sin total en las muestras de CSF usando un ensayo de ELISA de sándwich con alguna modificación para mejorar la sensibilidad del ensayo para medir α -sin directamente de las muestras de CSF. Se usó un anticuerpo 211 monoclonal α -sin anti-humano (Santa Cruz Biotechnology, USA) para captura, y se usó anticuerpo FL-140 policlonal α -sin anti-humano (Santa Cruz Biotechnology, USA) para detección de antígeno a través de un ensayo de quimioluminiscencia unido a peroxidasa de rábano picante (HRP). La placa de ELISA (Nunc Maxisorb, NUNC, Dinamarca) se revistió para incubación durante una noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, con $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ de 211 ($100\text{ }\mu\text{l/pocillo}$), en NaHCO_3 200 mM , pH 9,6. Después de incubación durante 2 horas con $200\text{ }\mu\text{l/pocillo}$ de tampón de bloqueo (solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenían gelatina al 2,5 % y Tween 20 al 0,05 %), se añadieron a continuación $100\text{ }\mu\text{l}$ de las muestras de CSF a cada tufillo y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h. Después de la incubación, la proteína α -sin capturada se detectó mediante la reacción con $100\text{ }\mu\text{l/pocillo}$ de anticuerpo FL-140 ($0,2\text{ }\mu\text{g/ml}$), seguido de incubación con $100\text{ }\mu\text{l/pocillo}$ (dilución a 1:10.000) de anticuerpo anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (DAKO, Dinamarca). Se sometieron a ensayar las actividades de HRP unida ($100\text{ }\mu\text{l/pocillo}$) mediante reacción de quimioluminiscencia usando un sustrato quimioluminiscente potenciado (Sustrato de Sensibilidad Máxima ELISA Femto SuperSignal, Pierce Biotechnology, Rockford, USA). La quimioluminiscencia en unidades de luz relativas se midió a 395 nm con un luminómetro de microplaca (SpectraMax L, Molecular Device, Tokio). La curva estándar para el ensayo de ELISA se realizó usando $100\text{ }\mu\text{l/pocillo}$ de solución de α -sin humana recombinante a diferentes concentraciones de la proteína en PBS. Todas las muestras y patrones se realizaron por triplicado en el mismo día con el mismo lote de patrones. Los cálculos de concentración relativa de α -sin total en el CSF se calcularon de acuerdo con cada curva patrón. El coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo era $< 10\text{ }\%$. Para todos los ensayos de ELISA, las muestras se mantuvieron constantemente en hielo. Estos ensayos se realizaron en alícuotas de muestra nunca descongeladas antes.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm SD, a menos que se indique de otro modo. Todos los datos se transformaron de forma logarítmica con la finalidad de análisis estadístico; se realizaron comparaciones entre grupos usando el ANOVA unilateral y el ensayo de Student-Newman Keuls como un ensayo a posteriori. Las correlaciones se expresan como coeficiente de correlación de Pearson. La precisión del diagnóstico se evaluó por medio de análisis de Característica Operativa del Receptor, ROC.

Resultados

Los detalles demográficos se muestran en la Tabla 1. Los grupos no diferían con respecto a la edad media y la educación. La puntuación media de MMSE no difería de forma significativa entre el grupo de PD y los controles. Sin embargo, en ensayos neuropsicológicos que evalúan las funciones ejecutivas (fluidez verbal, atención, memoria de trabajo) obtuvieron por lo general puntuaciones menores con respecto a los controles emparejados por edades. Por último, los grupos de demencia mostraron un grado comparable de deterioro cognitivo y duración de la enfermedad. La Fig. 1 muestra la dispersión de valores de α -sin del CSF observados en cada grupo, mientras que en la Tabla 2 se muestran los valores medios de los parámetros del CSF. Todos los grupos patológicos presentaban niveles medios de α -sin del CSF significativamente menores con respecto a los controles (otras enfermedades neurológicas, OND), en los que DLB y FTD mostraron los valores más bajos (fig. 1). Los niveles medios de CSF de biomarcadores clásicos eran bastante similares en PD y controles, mientras que en los grupos de demencia estaban significativamente alterados. A β 42 era significativamente menor en AD, DLB, FTD frente a OND y PD. De forma análoga, los niveles medios de tau total del CSF eran superiores en los grupos de demencia en comparación con OND y PD; tal como se esperaba, los valores más elevados de tau total se reservaron el grupo de AD, lo que diferencia esta categoría de los otros grupos de demencia (Tabla 2). Además, la p-tau del CSF presentaba los niveles medios más elevados en AD, siendo significativamente más elevados en todas las categorías de demencia con respecto a OND y PD, también. α -Sin presentaba una correlación inversa con la edad ($r = -0,19$, $p = 0,011$) y duración de la enfermedad ($r = -0,15$, $p = 0,08$). No se detectó asociación con puntuaciones de MMSE. Con respecto a los biomarcadores clásicos, se documentó una correlación inversa significativa con tau total ($r = -0,21$, $p = 0,007$) (fig. 2). No se encontró correlación significativa con A β 42 y p-tau. Por último, tau total and p-tau presentaban una correlación positiva significativa con la duración de la enfermedad ($r = 0,27$, $p = 0,001$, $r = 0,22$, $p = 0,005$, respectivamente), mientras que A β 42 no lo hacía. Se evaluó el comportamiento de las relaciones de A β 42/ α -sin, tau total/ α -sin y p-tau/ α -sin en la diferenciación de los grupos estudiados (Tabla 3, Fig. 2). Las relaciones tau total / α -sin y p-tau/ α -sin eran significativamente menores en PD con respecto a los demás grupos patológicos considerados, incluyendo DLB (Tabla 3). Con el fin de calcular la sensibilidad y la especificidad de estas relaciones en la diferenciación de PD de las otras afecciones patológicas, los inventores realizaron a continuación el análisis de Característica Operativa del Receptor (ROC) (Tabla 4, Fig. 3). Tal como se esperaba, α -sin del CSF sola no proporcionaba información relevante para el diagnóstico de la PD, mostrando una especificidad extremadamente escasa con respecto a otros trastornos neurológicos. Se obtuvo un rendimiento mejor con la relación de tau total/ α -sin: en el punto de corte de 19,5:1 (AUC: 0,765), la sensibilidad era de un 89 % y la especificidad de un 61 %. La relación p-tau/ α -sin desvelaba resultados ligeramente menores.

Conclusiones

Las relaciones entre tau y α -sin del CSF han mostrado diferencias que se producen entre las entidades clínicas consideradas. PD presentaba una relación de tau/ α -sin del CSF similar a la observada en sujetos de control. Por el contrario, todos los demás grupos patológicos, incluyendo DLB, presentaban valores similarmente elevados de las relaciones tanto de tau total / α -sin como de p-tau/ α -sin (Tabla 3, Fig. 3). Tales relaciones presentaban una buena sensibilidad (> 85 %) pero menor especificidad (55-61 %) en la diferenciación de la PD de las otras afecciones. Esta información proporciona un indicador valioso para el diagnóstico precoz de la PD.

Tablas

Los valores medios se muestran como \pm SD a menos que se indique de otro modo. τ = tau total, P- τ = p-tau.

Tabla 1 – Detalles demográficos de los sujetos estudiados

	PD (n = 38)	DLB (n = 32)	AD (n = 48)	FTD (n = 31)	OND (n = 32)
M/F	22/16	18/14	19/29	17/14	18/14
Edad (años)*	69,3 \pm 7,2	71,4 \pm 6,0	68,7 \pm 9,7	64,3 \pm 6,4	61,9 \pm 17,8
Duración (años)*	3,5 \pm 2,3	3,9 \pm 2,7	4 \pm 2,9	4,2 \pm 2,2	= =
Puntuación de MMSE*	25,9 \pm 2,4	15,5 \pm 2,9	16,6 \pm 4,4	18,9 \pm 3,7	28,0 \pm 1,7
Educación (años)*	8,4 \pm 3,1	8,1 \pm 4,4	7,1 \pm 3,3	7,0 \pm 3,5	7,4 \pm 4

Tabla 2 – Valores medios de α -sin, A β 42, tau total y p-tau del CSF en los grupos estudiados

<i>Comparaciones múltiples: P < 0,05 a: frente a OND; b: frente a PD; c: frente a AD; d: frente a DLB; e: frente a FTD; f: frente a otros</i>						
	PD (n = 38)	DLB (n = 32)	AD (n = 48)	FTD (n = 32)	OND	P
α-sin (ng/ml)	43,1 \pm 47 ^a	18,1 \pm 16 ^{a,b,c}	34,8 \pm 54 ^a	15,3 \pm 18 ^{a,b,c}	68,9 \pm 71	0,001
Aβ42 (pg/ml)	658 \pm 263	451 \pm 209 ^{a,b}	481 \pm 190 ^{a,b}	489 \pm 146 ^{ab}	624 \pm 227	0,005
τ Total (pg/ml)	232 \pm 164	341 \pm 254 ^{a,b}	734 \pm 357 ^f	424 \pm 241 ^{a,b}	190 \pm 96	0,001
P-τ (pg/ml)	41,6 \pm 21	49,5 \pm 26 ^a	97,7 \pm 4 ^f	59,5 \pm 40 ^{a,b}	35,3 \pm 11	0,001

Tabla 3 – Relaciones del biomarcador CSF de acuerdo con el diagnóstico

<i>Comparaciones múltiples: P < 0,05 a: frente a OND; b: frente a otros</i>						
	PD (n = 38)	DLB (n = 32)	AD (n = 48)	FTD (n = 31)	OND (n = 32)	P
Aβ42/α-sin	34,7 \pm 38	53,1 \pm 49	46,14 \pm 45	81,6 \pm 91	27,9 \pm 32	0,08
τ Total / α-sin	14,4 \pm 24 ^b	42,7 \pm 59 ^a	67 \pm 76 ^a	60 \pm 94 ^a	6,9 \pm 6,6	0,002
P-τ/α-sin	2,3 \pm 2,8 ^b	6,2 \pm 7,8 ^a	8,2 \pm 9,2 ^a	8,6 \pm 12 ^a	1,4 \pm 1,1	0,002

5

Tabla 4 – Parámetros de curva de ROC para relaciones del marcador CSF en pacientes con PD.

<i>*p = 0,001 frente a α-sin y Aβ42/ α-sin</i>			
	AUC	Punto de corte óptimo (ng/ml)	Sensibilidad/especificidad (%)
α-sin	0,662	13,0	94/25
τ Total / α-sin	0,765*	19,5	89/61
P-τ / α-sin	0,733*	3,1	86/55
Aβ42 / α-sin	0,586	61,8	87/57

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para identificar si un individuo tiene o no Enfermedad de Parkinson (PD) en lugar de una enfermedad neurodegenerativa que no es PD seleccionada entre Enfermedad de Alzheimer (AD), Demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y Demencia Frontotemporal (FTD), comprendiendo dicho método:

- 10 (i) medir la concentración de α -sinucleína (α -sin) en una muestra de fluido cefalorraquídeo (CSF) obtenida del individuo;
 (ii) medir la concentración de tau sin fosforilar (tau) y / o fosforilada (p-tau) presente en la muestra; y
 (iii) calcular la relación de:

$$\frac{\text{concentración total de tau}}{\text{concentración de } \alpha\text{-sin}} \quad \text{o} \quad \frac{\text{concentración de p-tau}}{\text{concentración de } \alpha\text{-sin}}$$

15 en la que la concentración total de tau es la concentración acumulativa de p-tau y tau medida en la muestra;
 y
 (iv) determinar de ese modo si el individuo tiene PD o no.

20 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que una relación de tau total a α -sin de 19,5:1 o inferior es indicativo de que el individuo tiene PD.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que una relación de p-tau a α -sin de 3,1:1 o inferior es indicativo de que el individuo tiene PD.

25 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la determinación de si el individuo tiene PD o no en lugar de una enfermedad neurodegenerativa que no es PD comprende determinar si, o no, la relación de tau total a α -sin o de p-tau a α -sin disminuye con respecto a la relación correspondiente en una muestra tomada de un individuo que tiene una enfermedad neurodegenerativa que no es PD.

30 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 en el que se determina que el individuo tiene PD cuando la relación de tau total a α -sin o de p-tau a α -sin disminuye en al menos 3 veces con respecto a la relación correspondiente en una muestra tomada de un individuo que tiene una enfermedad neurodegenerativa que no es PD.

35 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la determinación de si el individuo tiene PD o no en lugar de una enfermedad neurodegenerativa que no es PD comprende determinar si, o no, la relación de tau total a α -sin o de p-tau a α -sin no es significativamente diferente a la relación correspondiente en una muestra tomada de un individuo normal.

40 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 en el que la relación de tau total a α -sin o de p-tau a α -sin difiere en no más de un 25 % con respecto a la relación correspondiente en una muestra tomada de un individuo normal.

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se sospecha que el individuo está en riesgo de desarrollar un trastorno neurodegenerativo.

45 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el individuo tiene una historia familiar de un trastorno neurodegenerativo.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que el individuo tiene o ha sido diagnosticado con un síntoma clínico asociado con un diagnóstico de un trastorno neurodegenerativo.

50 11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el trastorno neurodegenerativo es PD, AD, DLB o FTD.

55 12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el individuo se clasifica como Hoehn-Yahr de grado 3 o inferior.

13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que se clasifica al individuo como que tiene una puntuación de examen de estado Mini-mental (MMSE) de 19 a 26.

60 14. Uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 de un kit que comprenden medios para la detección de α -sinucleína, tau y /o p-tau en una muestra de CSF.

Figura 1

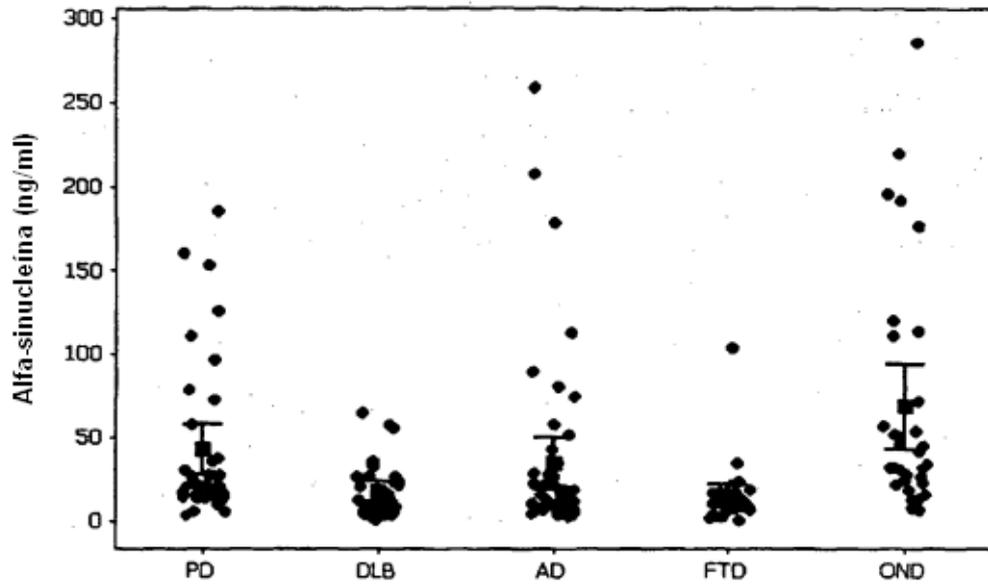


Figura 2

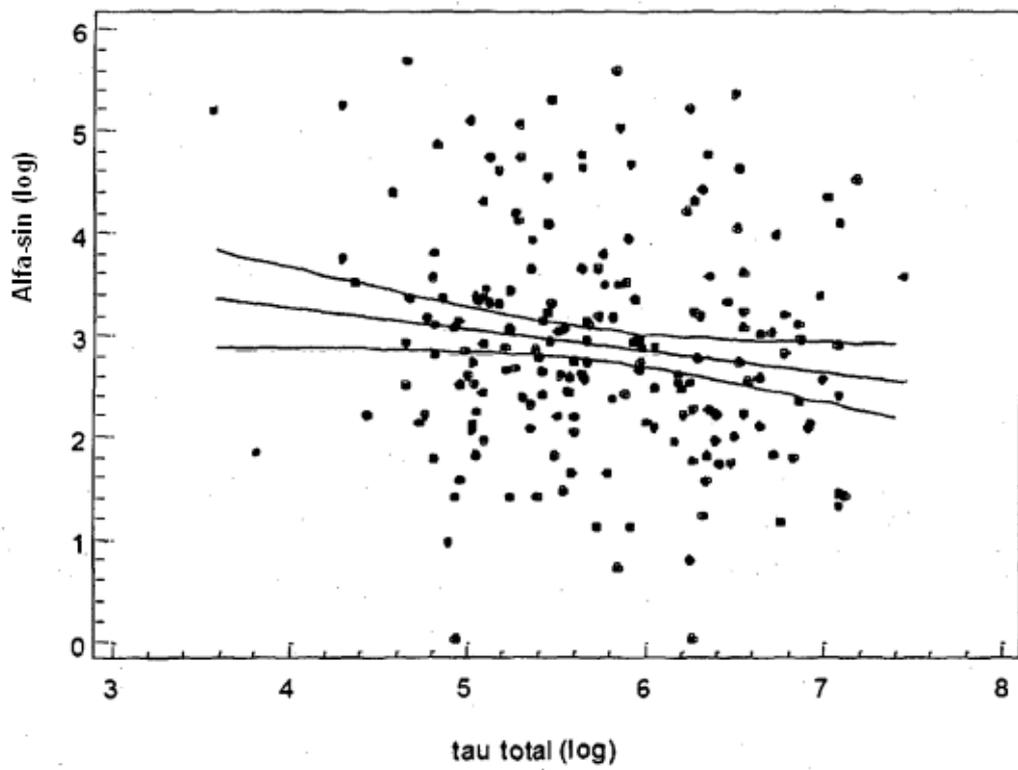


Figura 3

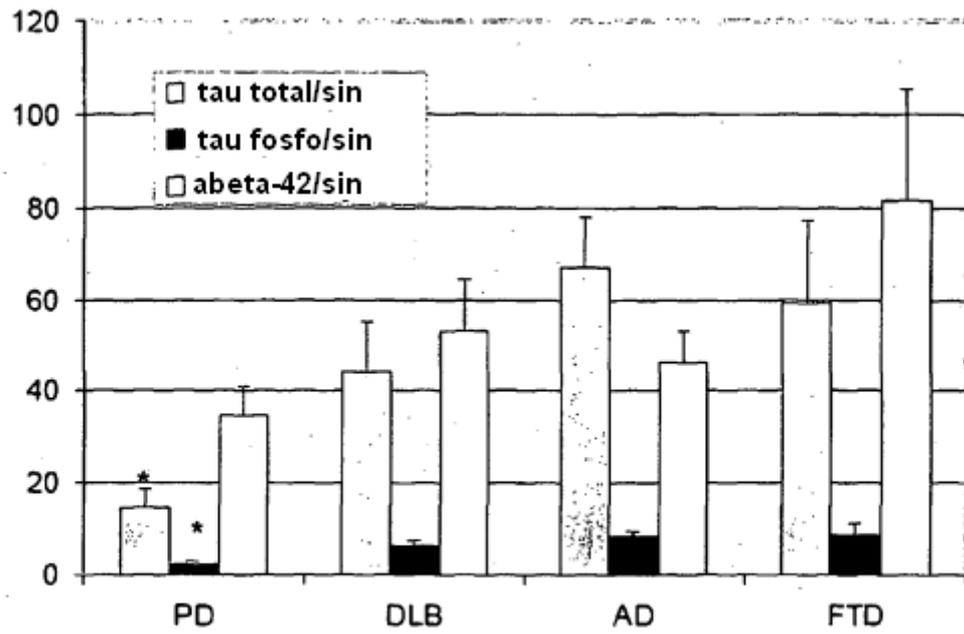


Figura 4

