

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 213**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2010 E 10755214 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2478375**

54 Título: **Agente de diagnóstico para la enfermedad de Parkinson**

30 Prioridad:

16.09.2009 GB 0916264
30.06.2010 GB 201011045

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.07.2015

73 Titular/es:

UNITED ARAB EMIRATES UNIVERSITY (100.0%)
P.O. Box 17551
Al Ain, Abu Dhabi, AE

72 Inventor/es:

EL-AGNAF, OMAR

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 541 213 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**Agente de diagnóstico para la enfermedad de Parkinson****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a método para identificar si una persona tiene o no la enfermedad de Parkinson (PD). En particular, la invención se refiere a un método para identificar si un individuo tiene EP en la fase de pre-sintomática de la enfermedad.

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer. Típicamente, las características clínicas más tempranas de la EP se identifican retrospectivamente y no son específicas para la EP. Estos síntomas suelen ser síntomas no motores tales como estreñimiento, depresión, hiposmia, y trastornos del sueño.

15

Los síntomas reconocidos de manera más general de la EP son los síntomas motores como bradicinesia, temblor muscular, rigidez y problemas de equilibrio. Estos síntomas no aparecen hasta mucho más tarde en la enfermedad, cuando ya se ha producido daños importantes en el cerebro. De hecho, al menos 70% de las neuronas de la sustancia negra del mesencéfalo debe perderse antes de la aparición de síntomas de este tipo. Incluso entonces, la primera manifestación de los síntomas motores puede ser sutil y puede pasar desapercibida durante meses o años.

20

El diagnóstico clínico preciso de la EP durante la vida es muy difícil, siendo correcto en sólo en aproximadamente 85% de los casos. Como consecuencia, ha resultado impedido el descubrimiento de terapias eficaces modificadoras de la enfermedad. Los métodos más avanzados disponibles en la actualidad para el diagnóstico de la EP se basan en la formación de imágenes mediante núclidos radiactivos. Estos métodos son costosos y sigue siendo un tema de debate en qué medida reflejan el proceso patológico subyacente.

25

Hasta la fecha, no existe una prueba que puede determinar de forma fiable si un individuo tiene EP. En particular, no existe una prueba que pueda determinar si una persona tiene o no EP durante la fase temprana (pre-sintomática) de la enfermedad, antes de que se haya producido demasiado daño al cerebro.

30

El-Agnaf et al., FASEB Journal (2006) 20(3) págs. 419-425 describen la detección de formas oligoméricas solubles de α -sinucleína en plasma humano y muestras de líquido cefalorraquídeo post mortem.

35

Sin embargo, existe una necesidad largamente sentida para el desarrollo de una prueba fiable para la EP que pueda ser utilizada en sujetos vivos. Existe una necesidad concreta de una prueba que pueda determinar si una persona tiene o no EP durante la fase temprana (pre-sintomática) de la enfermedad.

40

Compendio de la invención

El descubrimiento de mutaciones en el gen que codifica la α -sinucleína (SNCA) en los casos familiares de EP sugiere en primer lugar un papel crítico para la proteína α -sinucleína (α -syn) en la etiología de la EP idiopática. Más recientemente, estudios genéticos han revelado también que eventos raros de triplicación en la SNCA pueden estar asociados con formas graves de EP familiar de aparición temprana que también presentan demencia con cambios de tipo cuerpos de Lewy. Además, las mutaciones de duplicación causan un fenotipo de EP familiar que se asemeja más a la EP idiopática de aparición tardía. Estos estudios colectivos indican que un aumento de la expresión de α -syn de tipo salvaje aumenta el riesgo de desarrollar EP y que el nivel de proteína de α -syn podría ser un determinante importante de la progresión y la gravedad del fenotipo parkinsoniano.

45

50

Los datos demográficos también demuestran que la variabilidad genética común en el locus SNCA es un factor de riesgo en la EP esporádica. Además, las lesiones neuropatológicas (cuerpos de Lewy (CL)) que mejor caracterizan una EP en fase terminal se componen en gran parte de los depósitos de α -syn fibrilar. Sin embargo, la α -syn es expresada principalmente por las células neuronales, y se consideraba en general que existía como una proteína citoplasmática y asociada a vesículas de lípidos, que tendía a desalentar su uso como un marcador de diagnóstico.

55

Se ha demostrado recientemente que la α -syn es, de hecho, normalmente liberada por las células neuronales, y está presente en el líquido cefalorraquídeo humano (LCR) y plasma periférico, aunque se encontró que los niveles de α -syn en el LCR tomadas de pacientes con EP disminuían en comparación con los de los controles de la misma edad.

60

Hay evidencia que sugiere que los oligómeros solubles de las proteínas amiloidogénicas asociadas con las enfermedades neurodegenerativas son las especies patógenas que causan la muerte celular neuronal, en lugar de las fibrillas amiloides maduras. Se ha demostrado recientemente que los oligómeros de α -syn solubles son elevados

en los productos homogeneizados de cerebro de pacientes fallecidos con EP y demencia con Cuerpos de Lewy (CL), con respecto a los productos homogeneizados de cerebros normales. Además, en contraste con el resultado en el LCR, se ha encontrado recientemente que los niveles de oligómeros de α -syn soluble en el plasma eran elevados en pacientes con EP en comparación con los controles. Cabe señalar que los niveles de oligómeros de α -syn en plasma obtenidos a partir de pacientes con EP variaron ampliamente y se superpusieron considerablemente con los de las muestras de los controles.

No obstante, el autor de la presente invención ha comparado los niveles de oligómeros de α -syn solubles en el LCR tomados de pacientes con EP y sujetos de la misma edad, incluyendo pacientes con Parálisis supranuclear progresiva (PSP) y enfermedad de Alzheimer (EA), así como sujetos control normales. También se midieron los niveles totales de α -syn con el fin de medir los niveles de proteínas totales de α -syn en las mismas muestras. El autor de la presente invención ha encontrado que la cantidad de oligómeros de α -syn solubles y la razón entre la cantidad de dichos oligómeros y la cantidad total de α -syn se incrementaron significativamente en las muestras de LCR de pacientes con EP vivos, en comparación con muestras de LCR de controles normales de la misma edad. El autor de la presente invención también ha encontrado que la cantidad de oligómeros de α -syn solubles es significativamente mayor en las muestras de LCR de pacientes con EP, en comparación con las muestras de LCR de pacientes de la misma edad con otros trastornos neurológicos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona:

Un método para identificar si es un individuo tiene o no la enfermedad de Parkinson (EP) y/o distinguir entre EP y otro trastorno neurológico que no sea EP, cuyo método comprende medir la cantidad de oligómeros de α -sinucleína solubles y la cantidad total de α -sinucleína en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) tomada del individuo, calculando la razón de:

$$\frac{\text{cantidad de oligómeros de } \alpha\text{-sinucleína}}{\text{cantidad total de } \alpha\text{-sinucleína}}$$

y determinando de este modo si el individuo tiene o no EP.

En el método, la determinación de si el individuo tiene o no EP puede comprender la determinación de si la razón de la cantidad de oligómeros de α -syn con respecto a la cantidad total de α -syn se incrementa o no con respecto a la proporción en la muestra tomada de un individuo normal. Por ejemplo, la razón se puede aumentar por lo menos 3 veces con respecto a la razón en una muestra tomada de un individuo sin EP.

Alternativamente, la determinación de si el individuo tiene o no EP puede comprender la determinación de si la razón, cuando se expresa como un porcentaje, es o no de al menos 6%, preferiblemente al menos 7%.

En un método de la invención, el sujeto individual puede ser sospechoso de estar en riesgo de desarrollar EP u otro trastorno neurológico tal como PSP o EA. El individuo puede tener una historia familiar de EP. El individuo puede tener o, más generalmente, no tener (o haber sido diagnosticado) de cualquiera de los síntomas clínicos asociados con un diagnóstico de EP o de otro trastorno neurológico tal como PSP o EA. El individuo puede tener o puede no tener (o haber sido diagnosticado) de cualquiera de los síntomas no motores de la enfermedad de Parkinson. El individuo se puede clasificar normalmente como Hoehn-Yahr grado 2 o inferior.

También se describe un método para la detección de oligómeros de α -syn en una muestra de LCR que comprende:

- incubar la muestra de LCR con un primer reactivo de unión a α -syn que está inmovilizado sobre una fase sólida;
- detectar la unión de α -sinucleína utilizando un segundo reactivo de unión a α -syn que no está inmovilizado y que se une a la misma o un sitio de solapamiento en α -sinucleína como primer agente.

También se describe un método para la detección de oligómeros de α -syn en una muestra de LCR que comprende:

- incubar la muestra de LCR con un primer reactivo que es específico del oligómeros de amiloide pero no se une específicamente a la α -sinucleína, y que está inmovilizado sobre una fase sólida;
- detectar oligómeros de amiloide unidos utilizando un reactivo de unión a α -sinucleína que no está inmovilizado y que se une específicamente a la proteína α -sinucleína.

En esta realización, el primer reactivo típicamente une específicamente a un componente de oligómeros de amiloide que no es α -sinucleína. Por ejemplo, el primer reactivo se puede unir específicamente la proteína β -amiloide, la proteína de Huntington o la proteína amilina.

En el método, los reactivos de unión a α -syn pueden ser un anticuerpo monoclonal específico de α -syn, opcionalmente un anticuerpo marcado.

También se describe un método para retrasar o prevenir la aparición de los síntomas de la EP en un individuo, que comprende;

- (i) determinar si una persona tiene o no EP utilizando un método de acuerdo con la invención; y
 (ii) administrar a un individuo identificado por tener EP en (i), una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe directa o indirectamente la agregación y/o toxicidad de α -syn, un agente que reduce la expresión de la proteína α -syn, un agente que aumenta o estimula directamente o indirectamente la degradación de los agregados de α -syn, o un agente neuroprotector.

En el método, el agente neuroprotector puede ser un anti-apoptótico, un anti-oxidante, un anti-glutamatérgico, un inhibidor de la monoamino oxidasa B, un antagonista de adenosina, un agonista de dopamina, un estabilizador mitocondrial o un factor trófico.

El agente neuroprotector puede ser rasagilina, selegilina, ropinirol, pramipexol, nicotina, minociclina, creatina, cafeína o coenzima Q10.

También se describe un kit de ensayo para uso en un método para determinar si una persona tiene o no EP, cuyo kit de ensayo comprende medios para la detección de oligómeros de α -syn solubles en una muestra de LCR.

El kit de prueba puede comprender, además, medios para la medición de la cantidad total de α -syn en una muestra de líquido cefalorraquídeo.

Los métodos o kit de ensayo descritos en la presente memoria pueden ser utilizados en ensayos clínicos para medir el efecto de los fármacos en ambos modelos animales de EP y pacientes de EP humanos.

Compendio de las Figuras

La Figura 1 muestra los valores individuales para el nivel de α -sinucleína total (A), los oligómeros de α -syn (B; URL = unidades relativas de luminiscencia) y la proporción de oligómeros de α -syn con respecto a α -syn total (C; oligómero/total, %) en el LCR de pacientes con EP (círculos rellenos) y controles (círculos vacíos). Cada barra representa el valor medio. Las líneas discontinuas en (B) y (C) indican valores de corte respectivos que producen la sensibilidad y especificidad más fiables identificadas por curvas características operativas del receptor (véase la Figura 2).

La Figura 2. Curvas características operativas del receptor (ROC) para los niveles de oligómeros de α -syn en LCR (cuadrados vacíos) y razón de oligómeros de α -syn con respecto a α -syn total en el LCR (círculo vacío) en la discriminación de la EP de los controles a lo largo de un intervalo de puntos de corte, una punta de flecha indica un valor de corte que produce la sensibilidad y especificidad más adecuadas.

La Figura 3 muestra los valores individuales del nivel de oligómeros de α -syn en el LCR de una segunda cohorte de sujetos incluyendo los pacientes con EP (n = 25), PSP (Parálisis supranuclear progresiva; n = 18), EA (Enfermedad de Alzheimer; n = 35) y sujetos normales de control (n = 43). Cada barra representa el valor medio.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método de identificación de si un sujeto tiene o no EP. Por consiguiente, la invención se refiere a la detección de EP en el sujeto individual. El individuo es normalmente un mamífero. El mamífero es típicamente un ser humano o un mamífero doméstico tal como un caballo, una vaca, una oveja, un perro o un gato. El individuo es preferiblemente 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, 30 a 50, 30 a 60 o 30 a 70 años. El individuo puede tener una edad de 40 a 50, 40 a 60 o 40 a 70 años. El individuo puede tener una edad de 50 a 60 o 50 a 70 años.

El individuo puede mostrar síntomas clínicos asociados con la EP, o el individuo puede presentar uno o más de los siguientes síntomas:

Síntomas motores primarios

La práctica clínica actual requiere típicamente la presencia de al menos un síntoma motor primario para un diagnóstico de EP. Los síntomas motores primarios son:

- (i) Temblor de reposo: Aproximadamente 70 por ciento de las personas con Parkinson experimentan un ligero temblor, que suele ser el primer síntoma identificable. El temblor está típicamente en la mano o el pie en un lado del cuerpo, o menos comúnmente en la mandíbula o la cara. El temblor se presenta como una "latido" o movimiento oscilante. El temblor del Parkinson suele aparecer cuando los músculos de una persona están relajados, por lo que se denomina "temblor de reposo". Normalmente, la parte del cuerpo afectada tiembla cuando no trabaja, y el temblor desaparece cuando una persona comienza una acción. El temblor a menudo se extiende al otro lado del cuerpo a medida que la enfermedad progresa, pero sigue siendo más evidente en el lado original de aparición.

(ii) Bradicinesia (movimiento lento): el paciente muestra movimiento marcadamente lento. Además de reducir la velocidad de movimiento, una persona con bradicinesia tiene también típicamente movimiento incompleto, dificultad para iniciar movimientos y dificultad en la detención repentina de movimientos en curso. Las personas que tienen la bradicinesia pueden caminar con pasos cortos arrastrando los pies (festinación). Se puede producir bradicinesia y rigidez en los músculos faciales, reduciendo la gama de expresiones faciales de una persona y dando como resultado una apariencia "similar a una máscara".

(iii) Rigidez: también llamado aumento del tono muscular, significa dureza o inflexibilidad de los músculos. En la rigidez, el tono muscular de la extremidad afectada es siempre duro y no se relaja, dando como resultado a veces una disminución de la amplitud de movimiento. Por ejemplo, una persona que tiene rigidez puede no ser capaz de hacer balancear sus brazos al caminar porque los músculos están demasiado tensos. La rigidez puede causar dolor y calambres.

(iv) Inestabilidad postural (Deterioro de Equilibrio y Coordinación): Los sujetos con enfermedad de Parkinson a menudo experimentan inestabilidad al estar de pie, o tienen deteriorados el equilibrio y la coordinación. Estos síntomas, junto con otros síntomas como la bradicinesia, aumentan la posibilidad de caer. Los sujetos con problemas de equilibrio pueden tener dificultad para hacer giros o movimientos bruscos. El sujeto puede pasar por períodos de "congelación", en el que el sujeto tiene dificultades para empezar a caminar. La lentitud y el carácter incompleto de movimiento también pueden afectar al habla y a la deglución.

20 Síntomas motores secundarios

No todos los sujetos con EP experimentan síntomas motores secundarios. Sin embargo, la mayoría de los sujetos presentan típicamente uno o más de los siguientes:

- Postura encorvada, una tendencia a inclinarse hacia adelante
- Distonía
- Fatiga
- Deterioro de la destreza motora y la coordinación motora finas
- Deterioro de la coordinación motora gruesa
- Pobreza de movimientos (disminución del balanceo de los brazos)
- Acatisia
- Problemas del habla, como la suavidad de la voz o dificultad para hablar causada por la falta de control muscular
- Pérdida de la expresión facial, o "enmascaramiento"
- Micrografía (letra pequeña, apretada)
- Dificultad para deglutir
- Disfunción sexual
- Babeo

40 Síntomas no motores

Algunos síntomas no motores se asocian con la EP. Sin embargo, estos síntomas no son específicos de la EP, y típicamente sólo se identifican como indicativos de EP retrospectivamente. Es decir, los síntomas no motores experimentados por un sujeto que no se reconocen típicamente como indicativos de EP hasta después de que ha sido confirmada la presencia de los síntomas motores primarios y secundarios. Aun así, un paciente de EP será exhibirá típicamente uno o más de los siguientes:

- Dolor
- Demencia o confusión
- Trastornos del sueño (por ejemplo, trastorno de conducta asociado al sueño REM (RBD))
- Hiposmia
- Estreñimiento
- Problemas cutáneos
- Depresión
- Miedo o ansiedad
- Dificultades de memoria y pensamiento lento
- Problemas urinarios
- Fatiga y dolor
- Pérdida de energía
- Comportamiento compulsivo (p. ej. Juegos de azar)
- Calambres

El individuo que se va a someter a ensayo típicamente no tiene o no ha sido diagnosticado de cualquiera de los síntomas motores principales de la EP. Preferiblemente, el individuo tampoco tiene o no ha sido diagnosticado de cualquiera de los síntomas motores secundarios de la EP.

- 5 El individuo puede ser sospechoso de estar en riesgo de desarrollar EP debido a la presencia de uno o más de los síntomas no motores o síntomas motores secundarios de EP.

10 El individuo puede haber sido clasificado o no de acuerdo a la escala de Hoehn-Yahr. La escala de Hoehn-Yahr es un sistema comúnmente utilizado para describir cómo progresan los síntomas de la enfermedad de Parkinson. La escala asigna fases de 0 a 5 para indicar el nivel relativo de discapacidad:

- Fase uno: Síntomas solo en un lado del cuerpo.
- Fase dos: Síntomas en ambos lados del cuerpo. Sin deterioro del equilibrio.
- Fase tres: Deterioro del equilibrio. Enfermedad leve a moderada. Físicamente independiente.
- 15 • Fase cuatro: Discapacidad grave, pero todavía capaz de caminar o estar de pie sin ayuda.
- Fase cinco: Limitado a silla de ruedas o postrada en cama a menos que esté asistido.

Si se clasifica, el individuo es típicamente de grado 2 o más bajo en la escala de Hoehn-Yahr.

- 20 El individuo puede haber sido diagnosticado o no de EP según los criterios del Banco de Cerebros de la Sociedad de la Enfermedad de Parkinson del Reino Unido. Estos criterios son los siguientes:

Etapa 1: Diagnóstico de síndrome parkinsoniano

- 25
- Bradicinesia
 - Al menos una de las siguientes
 - Rigidez muscular
 - temblor de reposo de 4-6 Hz
 - inestabilidad postural no causada por disfunción visual, vestibular, cerebelosa, o propioceptiva primaria
- 30

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

- 35
- historial de golpes repetidos con progresión gradual de características parkinsonianas
 - historial de lesión en la cabeza repetidos
 - historial de la encefalitis definida
 - crisis oculógiras
 - tratamiento neuroléptico al inicio de los síntomas
 - más de un familiar afectado
 - 40 • remisión sostenida
 - características estrictamente unilaterales después de 3 años
 - parálisis supranuclear de la mirada
 - signos cerebelosos
 - dificultad autónoma severa temprana
 - 45 • demencia severa temprana con trastornos de la memoria, el lenguaje y la praxis
 - signo de Babinski
 - presencia de tumor cerebral o comunicación del hidrocéfalo en estudio por imágenes
 - respuesta negativa a grandes dosis de levodopa en ausencia de mala absorción
 - exposición a MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina)
- 50

Etapa 3: Identificación de las características que apoyan el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson (se requieren tres o más combinadas con la etapa 1 para el diagnóstico definitivo de la enfermedad de Parkinson):

- 55
- Inicio unilateral
 - Temblor en reposo presente
 - Trastorno progresivo
 - Asimetría persistente que afecta sumamente al lado de inicio
 - Excelente respuesta (70-100%) a la levodopa
 - Corea severa inducida por levodopa
 - 60 • Respuesta a levodopa durante 5 años o más
 - Curso clínico de diez años o más

El individuo puede o no ser sospechoso de tener o estar en riesgo de desarrollar otro trastorno neurológico tal como PSP o EA. El individuo puede o no haber sido diagnosticado de un trastorno de este tipo, o con uno o más síntomas asociados con dicho trastorno.

- 5 El individuo puede ser sospechoso de estar en riesgo de desarrollar EP debido a la presencia de uno o más factores que aumentan la susceptibilidad a la enfermedad de Parkinson.

10 Por ejemplo, el individuo puede tener un historial familiar de enfermedad de Parkinson. Grandes estudios epidemiológicos demuestran que las personas con un familiar de primer grado afectado, como un padre o hermano, tienen un riesgo de desarrollar Parkinson de dos a tres veces mayor, en comparación con la población general.

15 El individuo puede tener una mutación o polimorfismo en un gen o locus asociado con la EP. Por ejemplo, el individuo puede tener una mutación o polimorfismo en uno de más de los siguientes genes o loci: PARK1 (gen que codifica la α -sinucleína (SNCA)), PARK2 (gen que codifica la presunta proteína ubiquitina ligasa Parkina (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 la quinasa 2 con repeticiones ricas en leucina (LRRK2)).

20 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 detoxificación N-acetil transferasa 2, Apolipoproteína E, Enzima de detoxificación glutatión transferasa T1, Enzima de detoxificación glutatión transferasa MI, Enzima de detoxificación glutatión transferasa, o Enzima de detoxificación glutatión transferasa Z1; y/o en el Gen mitocondrial tRNA Glu y/o el Gen del complejo mitocondrial 1. Preferiblemente, el individuo tiene una mutación o polimorfismo en el gen que codifica la Monoamino oxidasa B, y/o la Enzima de detoxificación N-acetil transferasa 2, y/o glutatión transferasa enzima de detoxificación T1 y/o en el Gen mitocondrial tRNA Glu.

30 También pueden estar presentes factores de riesgo ambientales. Hasta la fecha, la investigación epidemiológica ha identificado la vida rural, el agua de pozo, el uso de herbicidas y la exposición a plaguicidas como factores que pueden estar vinculados a la enfermedad de Parkinson. Asimismo, la MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) puede causar parkinsonismo si se inyecta. La estructura química de la MPTP es similar a la del herbicida paraquat ampliamente utilizado y daña las células en una manera similar al plaguicida rotenona, así como algunas otras sustancias.

35 La presente invención implica medir la cantidad de oligómeros de α -syn solubles en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) tomada de un individuo. Un mayor nivel de oligómeros de α -syn solubles en comparación con el nivel basal puede indicar que el individuo tiene EP. El nivel de referencia es típicamente la cantidad de oligómeros de α -syn solubles en una muestra de líquido cefalorraquídeo de un individuo sin EP. El individuo sin EP es típicamente un individuo neurológicamente normal de la misma edad: referido en la presente memoria como un "individuo normal". Alternativamente, el individuo no-EP puede ser un paciente de la misma edad que ha sido diagnosticado de uno o más síntomas asociados con otro trastorno neurológico que no es EP. Por ejemplo, el individuo sin EP puede haber sido diagnosticado de uno o más síntomas de PSP o EA.

45 Los autores de la presente invención han demostrado que la cantidad o el nivel de oligómeros de α -syn solubles en una muestra de un paciente con EP es típicamente de al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 3 veces mayor que la cantidad o nivel en una muestra de un individuo sin EP.

50 Sin embargo, la presente invención también implica la medición de la cantidad total de α -syn en una muestra, y la evaluación de la razón de la cantidad de oligómeros de α -syn solubles con respecto a la cantidad total de α -syn en la muestra.

55 De acuerdo con la presente invención, un incremento de la razón de oligómeros/ α -syn total indica que el individuo tiene EP. Por ejemplo, los autores de la presente invenciones han demostrado que cuando la razón de oligómeros/ α -syn total para una muestra dada se expresa como un porcentaje, un nivel de al menos 5%, preferiblemente al menos 6%, más preferiblemente al menos 7%, indica que el individuo tiene EP.

60 También de acuerdo con la presente invención, un incremento de la razón de oligómeros/ α -syn total en comparación con la razón del nivel de referencia indica que el individuo tiene EP. La razón del nivel de referencia es típicamente la razón de oligómeros/ α -syn total en una muestra de un individuo sin EP. El individuo sin EP es típicamente un individuo neurológicamente normal de la misma edad: referido en la presente memoria como un "individuo normal". Alternativamente, el individuo sin EP puede ser un paciente de la misma edad que ha sido diagnosticado de uno o más síntomas asociados con otro trastorno neurológico que no es EP. Por ejemplo, el individuo sin EP puede haber sido diagnosticado de uno o más síntomas de PSP o EA. El incremento de la razón de oligómeros/ α -syn total

asociado con EP es típicamente al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces o 3 veces con respecto a la razón del nivel de referencia.

5 La invención se lleva a cabo típicamente *in vitro* sobre una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida del individuo. La muestra puede ser procesada típicamente antes de ser analizada, por ejemplo por medio de centrifugación. La muestra también puede almacenarse antes del análisis, preferiblemente por debajo de -70°C.

10 Los métodos convencionales conocidos en la técnica pueden utilizarse para analizar el nivel de oligómeros de α -syn solubles. Estos métodos implican típicamente el uso de un agente para la detección de oligómeros de α -syn solubles. El agente típicamente se une específicamente a oligómeros de α -syn solubles. El agente puede ser un anticuerpo específico para oligómeros de α -syn solubles. Por específico, se entenderá que el agente o anticuerpo se une a oligómeros de α -syn solubles sin reactividad cruzada significativa para cualquier otra molécula, en particular cualquier otra proteína. Por ejemplo, un agente o anticuerpo específico para oligómeros de α -syn solubles no mostrarán reactividad cruzada significativa con α -syn monomérica. La reactividad cruzada puede ser evaluada por
15 medio de cualquier método adecuado.

Alternativamente, el autor de la presente invención ha desarrollado un nuevo método para la detección de oligómeros de α -syn solubles, particularmente en muestras de LCR. El método se basa en una técnica de ELISA sándwich. El ELISA es un análisis en fase sólida, heterogéneo que requiere la separación de los reactivos. La técnica de ELISA sándwich requiere dos agentes: un agente de captura y un agente de detección. El primer agente se une específicamente a la diana y está unido a un soporte sólido (está inmovilizado). El segundo agente se une a un marcador, típicamente un producto conjugado enzimático. Se utiliza un sustrato enzimático para cuantificar el complejo de diana-agente y por lo tanto la cantidad de diana en una muestra. Los soportes sólidos para las reacciones de ELISA contienen preferiblemente pocillos. Los agentes son típicamente anticuerpos.
20

25 El análisis desarrollado por el autor de la presente invención utiliza típicamente como agente de captura un anticuerpo monoclonal anti- α -syn específico. Sin embargo, a diferencia del ELISA convencional, el agente de detección en el análisis de la invención se une al mismo o a un sitio de solapamiento en α -syn como el agente de captura. Por ejemplo, cuando los agentes son anticuerpos, el agente de detección es típicamente un anticuerpo que reconoce el mismo epítipo que el agente de captura. La α -syn monomérica no puede proporcionar una señal en el análisis de la invención debido a que el agente de captura ocupa el único sitio de unión disponible en la proteína. Sin embargo, en el caso de las formas oligoméricas de α -syn, están disponibles múltiples sitios de unión, permitiendo la unión tanto del agente de captura como del agente de detección. El agente de captura y el agente de detección pueden tener sitios de reconocimiento de antígeno idénticos. En una realización preferida, el agente de detección es un anticuerpo biotinilado. La detección se consigue a continuación a través de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con avidina, verificado mediante incubación con un sustrato detectable apropiado, preferiblemente un sustrato quimioluminescente. Es decir, la "lectura" del análisis es un nivel de luminiscencia, mostrado típicamente como unidades de luminiscencia relativa.
30

35 Los niveles totales de α -syn se miden utilizando cualquier método convencional. Estos métodos implican típicamente el uso de un agente para la detección de todas las formas de α -syn. El agente típicamente se une específicamente a todas las formas de oligómeros de α -syn. El agente puede ser un anticuerpo específico para α -syn. Un método preferido es un ensayo ELISA sándwich convencional. Es decir, en donde los anticuerpos de captura y de detección son diferentes. Idealmente, la forma de la "lectura" para el método para medir los niveles totales de α -syn debe ser la misma que para el método para medir los niveles de oligómeros de α -syn solubles. Esto facilita el cálculo de la razón de oligómeros/ α -syn total.
40

También se describe un método alternativo para la detección de oligómeros de α -syn en una muestra de LCR, que se aprovecha de la presencia de diferentes componentes de la proteína que pueden estar presentes en dichos oligómeros. Típicamente un oligómero de α -syn también puede comprender, por ejemplo, proteína β -amiloide, proteína de Huntington o proteína amilina. Un oligómero que comprende múltiples proteínas diferentes puede normalmente ser denominado con el término general "oligómero de amiloide". Así, en el método de la invención se puede incubar la muestra de LCR con un primer reactivo que es específico de oligómeros de amiloide pero no se une específicamente a la α -sinucleína, y que está inmovilizado sobre una fase sólida. La detección de los oligómeros se logra a continuación mediante un reactivo de unión a α -sinucleína que no está inmovilizado y que se une específicamente a la proteína α -sinucleína, como en los métodos descritos anteriormente.
45

50 Un anticuerpo usado en cualquier método descrito en la presente memoria puede ser un anticuerpo completo o un fragmento del mismo que es capaz de unirse a la proteína deseada, por ejemplo la forma deseada de α -syn. El anticuerpo puede ser monoclonal. Tal anticuerpo completo es típicamente un anticuerpo que se produce por medio de cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener anticuerpos policlonales mediante inmunización de un mamífero, típicamente un conejo o un ratón, con α -syn en condiciones adecuadas y aislar moléculas de anticuerpo a partir de, por ejemplo, el suero de dicho mamífero. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante métodos basados en hibridomas o recombinantes.
60

Típicamente, 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 de camello. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de 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 es preferiblemente IgG. El fragmento de anticuerpo completo que puede ser utilizado en el método comprende un sitio de unión al antígeno, por ejemplo, fragmentos 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.

También se describe un kit de diagnóstico que comprende medios para medir el nivel de oligómeros de α -syn solubles en una muestra, y determinar de este modo si el individuo tiene EP. El kit contiene típicamente uno o más anticuerpos que se unen específicamente a α -syn. Por ejemplo, el kit puede comprender un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR o un anticuerpo humanizado. El anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina intacta o un fragmento del mismo tal como un fragmento Fab, F(ab')₂ o Fv. Si está presente más de un anticuerpo, los anticuerpos tienen preferiblemente determinantes superpuestos de tal manera que se pueden utilizar para detectar oligómeros de α -syn solubles pero no monómeros, de acuerdo con el análisis desarrollado por el autor de la presente invención.

El kit puede comprender adicionalmente medios para la medición de α -syn total en una muestra.

El kit puede comprender adicionalmente uno o más de otros reactivos o instrumentos que permiten llevar a cabo cualquiera de las realizaciones del método mencionado anteriormente. Dichos reactivos o instrumentos incluyen uno o más de los siguientes: uno o varios tampones adecuados (disoluciones acuosas), medios para aislar α -syn a partir de una muestra, medios para obtener una muestra del individuo (tal como un vaso o un instrumento que comprende una aguja) o un soporte que comprende pocillos en los que se pueden realizar reacciones cuantitativas. El kit puede, opcionalmente, comprender instrucciones para permitir que el kit sea utilizado en el método de la invención o detalles referentes a sobre qué individuos puede llevarse a cabo el método.

También se describe un método para retrasar o prevenir la aparición de síntomas de la EP en un individuo. El método comprende: (i) determinar si una persona tiene o no EP usando un método de acuerdo con la invención; y (ii) administrar a un individuo que se ha identificado que tiene EP en (i), una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe directa o indirectamente la agregación y/o toxicidad de α -syn, un agente que reduce la expresión de la proteína α -syn, un agente que aumenta o estimula directamente o indirectamente la degradación de los agregados de α -syn, o un agente neuroprotector. El agente neuroprotector es típicamente un anti-apoptótico, un anti-oxidante, un anti-glutamatergico, un inhibidor de la monoamino oxidasa B, un antagonista de 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 1

Sujetos y Métodos

Sujetos

Este estudio cumplió con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Kyoto (Universidad Prefectural of Medicine, Kyoto, Japón). Todos los sujetos proporcionaron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. Se inscribieron en este estudio 32 pacientes con EP clínicamente definida (18 hombres y 14 mujeres, con edades entre 43-83 [media \pm DT, 67,3 \pm 9,4 años], consulte la Tabla 1 para detalles clínicos), que fueron diagnosticados de acuerdo con los criterios del Banco de Cerebros de la Sociedad de la Enfermedad de Parkinson del Reino Unido.

Tres de los 32 pacientes con EP tenían demencia que se había desarrollado 1 año o más después de la aparición de los síntomas motores, y fueron diagnosticados de esta manera como EP con demencia, no como demencia con Cuerpos de Lewy. Los sujetos de la misma edad de control (18 hombres y 10 mujeres, con edades entre 29-86 [media \pm DT, 64,0 \pm 13,9] años) consistieron en individuos neurológicamente normales que fueron sometidos a punción lumbar como parte del proceso de diagnóstico (n = 15) y controles con diversos trastornos neurológicos (n = 13), incluyendo pacientes con infarto lacunar en pons (n = 1), epilepsia (n = 2), mielopatía (n = 1), neuropatía periférica (n = 6), y miopatía (n = 2). Ninguno de los 28 pacientes del grupo control de la misma edad tenía demencia. Las muestras de LCR frescas se obtuvieron de los pacientes con enfermedad de Parkinson y los sujetos de control, divididos en alícuotas, y a continuación se almacenaron a -80°C hasta su utilización para inmunoanálisis con los sistemas de ELISA de los autores de la presente invención.

Inmunoanálisis para determinar la α -Sinucleína total en LCR

La α -syn total en las muestras de LCR se midió utilizando un ensayo ELISA sándwich con alguna modificación para mejorar la sensibilidad del análisis para medir α -syn directamente de las muestras de LCR. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -syn humana 211 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) para la captura, y un se utilizó anticuerpo policlonal anti- α -syn humana FL-140 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) para la detección de antígeno a través de un análisis de quimioluminiscencia ligado a peroxidasa de rábano picante (HRP). La placa de ELISA (Nunc Maxisorb, NUNC, Dinamarca) se revistió para la incubación durante la noche a 4°C, con 1 μ g/ml de 211 (100 μ l/pocillo), en NaHCO₃ 200 mM, pH 9,6. Después de la incubación durante 2 horas con 200 μ l/pocillo de tampón de bloqueo (solución salina tamponada con fosfato (PBS) conteniendo 2,5% de gelatina y 0,05% de Tween 20), se añadieron a continuación 100 μ l de muestras de LCR a cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 3 hrs. Después de la incubación, se detectó la proteína α -syn capturada mediante reacción con 100 μ l/pocillo de anticuerpo FL-140 (0,2 μ g/ml), seguido de incubación con 100 μ l/pocillo (dilución 1:10000) de peroxidasa de rábano picante (HRP) marcada con anticuerpo anti-conejo (DAKO, Dinamarca). Las actividades unidas a HRP se analizaron mediante reacción quimioluminiscente (100 μ l/pocillo) utilizando un sustrato quimioluminiscente intensificado (SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitive Substrate, Pierce Biotechnology, Rockford, EE.UU.). La quimioluminiscencia en unidades relativas de luz se midió a 395 nm con un luminómetro de microplacas (SpectraMax L, Molecular Device, Tokio). La curva patrón para el análisis ELISA se llevó a cabo usando 100 μ l/pocillo de disolución de α -syn humana recombinante a diferentes concentraciones de la proteína en PBS. Todas las muestras y patrones se realizaron por triplicado el mismo día con el mismo lote de patrones. Las estimaciones de concentración relativa de α -syn total en el LCR se calcularon de acuerdo con cada curva patrón. La precisión intra-análisis e inter-análisis fue <9%.

Preparación del anticuerpo biotinilado

Sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce Biotechnology, Rockford, EE.UU.) (200 mg) se hizo reaccionar con el anticuerpo que iba a ser biotinilado (1 ml a 200 μ g/ml) en PBS y a continuación se colocó en hielo durante 2 hrs. La mezcla se desaló en columnas Bio-Spin-6 (Bio-Rad, Reino Unido) para eliminar el exceso de biotina no acoplada. Los anticuerpos biotinilados se almacenaron a 4°C hasta su uso.

ELISA para medir oligómeros de α -syn

Una placa de 384 pocillos ELISA se recubrió a través de incubación durante la noche a 4°C con 1 μ g/ml de anticuerpo monoclonal (MAb) de ratón no biotinilado 211 (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU.) en NaHCO₃ 200 mM (Sigma-Aldrich Company Ltd., Dorset, Reino Unido) a pH 9,6 (50 μ l/pocillo). La placa se lavó 4 veces con PBST (PBS que contenía 0,05% de Tween 20), y se incubó con 100 μ l/pocillo de tampón de bloqueo (PBS que contenía 2,5% de gelatina y 0,05% de Tween 20) durante 2 horas a 37°C. La placa se lavó a continuación 4 veces con PBST; se añadieron a cada pocillo 50 μ l de muestras de LCR que se iban a someter a ensayo, y la placa se incubó a 37°C durante otras 3 hrs. Después de lavar 4 veces con PBST, se añadió 50 μ l de 211 biotinilado diluido a 1 μ g/ml en tampón de bloqueo, y se incubó a 37°C durante 2 hrs. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBST y se incubaron con 50 μ l/pocillo de peroxidasa ExtrAvidin (Sigma-Aldrich Company Ltd., Dorset, Reino Unido) diluida (1:10.000) en tampón de bloqueo y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de lavar las placas se incubaron finalmente con 50 μ l/pocillo de un sustrato quimioluminiscente intensificado (SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce Biotechnology), después de lo cual se midió inmediatamente la quimioluminiscencia en unidades relativas de luz con un lector de microplacas Victor2 1420 (Wallac).

Para todos los análisis de ELISA, las muestras se mantuvieron continuamente en hielo, y los ensayos se realizaron sobre alícuotas de la muestra después de una sola descongelación después de la congelación inicial.

Análisis Estadístico

En cuanto a las diferencias entre los grupos EP y de control, los grupos se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney. El nivel de significación se fijó a $p < 0,05$. El análisis correlacional se llevó a cabo mediante una simple correlación de Pearson. Se analizaron las características operativas del receptor (ROC) para evaluar los valores de corte más apropiados para el nivel de oligómeros de α -syn del LCR y la razón de oligómero/ α -syn total en el LCR en la distinción entre los grupos EP y de control. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando soporte lógico GraphPad Prism (GraphPad Prism versión 4.0, soporte lógico GraphPad, San Diego, EE.UU.).

Resultados

En el presente estudio se investigaron 32 pacientes con EP y 28 sujetos control para determinar los niveles totales de α -syn. No se observó ninguna diferencia significativa en la proporción de edad o el sexo entre los dos grupos. Como se muestra en la Figura 1A, la comparación de las concentraciones de α -syn total en el LCR muestra una considerable superposición en las señales individuales entre los grupos con EP y de control. Sin embargo, los resultados demostraron concentraciones menores medias de α -syn total en LCR en los pacientes con EP (media \pm

ETM = 20,98 ± 0,76 ng/ml, n = 32) en comparación con los controles (24,40 ± 1,17, n = 28) (p = 0,0417, prueba U de Mann-Whitney U).

5 A continuación, se midieron los niveles de oligómeros de α -syn en LCR en las mismas alícuotas de LCR derivadas de los mismos sujetos. Para esta medición, se utilizó un sistema ELISA que puede medir solo oligómeros de α -syn solubles sin detectar las formas monoméricas de α -syn. Se muestra un gráfico del nivel de dispersión de oligómeros de α -syn en LCR para grupos de pacientes con EP y de control en la Figura 1B, en la que se muestran los niveles de oligómeros de α -syn en la intensidad de la señal de quimioluminiscencia (unidades relativas de luminiscencia/segundo (URL/seg)). Los niveles de oligómeros de α -syn en LCR fueron significativamente más altos en el grupo con EP (media ± ETM = 19,791 ± 2,458, n = 32) que en los sujetos control de la misma edad (9.569 ± 1.037, n = 28) (p <0,0001, prueba U de Mann-Whitney). Dado que la medición de α -syn total en LCR y medición de oligómeros de α -syn en LCR de cada sujeto se obtuvieron en URL/seg, estos permiten el cálculo de la proporción de oligómeros de α -syn con respecto a α -syn total (razón de oligómero/total, %) en LCR para cada paciente. Curiosamente, la razón en LCR fue significativamente mayor en el grupo con EP (media ± ETM = 12,92 ± 1,08, n = 32) en comparación con la del grupo control (4,58 ± 0,52, n = 28) (p <0,0001, prueba U de Mann-Whitney) (Figura 1C). No hubo diferencia significativa en la razón entre pacientes con EP masculinos y femeninos, así como entre pacientes con y sin demencia (datos no mostrados). Por otra parte, los niveles de LCR de oligómeros de α -syn no tienen ninguna correlación con la edad del sujeto (r = 0,06, p = 0,73), el grado de Hoehn-Yahr (r = -0,12, p = 0,51), o la duración de la enfermedad (r = 0,01, p = 0,95). Tampoco hubo ninguna correlación de la razón oligómeros/ α -syn total con la edad del sujeto (r = -0,17, p = 0,34), el grado de Hoehn-Yahr (r = -0,14, p = 0,44), o la duración de la enfermedad (r = -0,02, p = 0,89). Curiosamente, los niveles de oligómeros de α -syn y la razón de oligómeros/ α -syn total fueron aún mayores en los pacientes con EP leve (grado de Hoehn-Yahr 1 y 2, n = 8, p = 0,0046 para los niveles de oligómeros, y p = 0,0002 para la razón), y para los pacientes con enfermedad de Parkinson temprana (dentro del plazo de 24 meses después de la aparición, n = 12, p = 0,0002 para los niveles de oligómeros, y p <0,0001 para la razón), en comparación con el grupo control.

La figura 2 muestra la curva ROC para oligómeros de α -syn en LCR y la razón (oligómero/total, %) de α -syn en LCR en la discriminación de la EP de los controles. La curva ROC demostró que los valores de corte de 9.950 URL/seg para los oligómeros de α -syn en LCR y 6,165% para el oligómero/total más fiable que distingue la EP del grupo de control. El nivel de corte de 9.950 URL/seg para los oligómeros de α -syn en LCR produjo una sensibilidad de 75,0% (IC de 95%, 55,1-89,3%) y una especificidad del 87,5% (IC de 95%, 71,0-96,5%) con una área bajo la curva (AUC) de 0,859. Mientras que el nivel de corte de 6,165% para la razón de oligómero/total arrojó una sensibilidad de 89,3% (IC 95%, 71,8-97,7%) y una especificidad de 90,6% (IC 95%, 75,0-98,0%) con un AUC de 0,948.

Estos resultados demuestran que la cuantificación de las formas totales y oligoméricas de α -syn en el LCR tiene un gran valor como una herramienta no sólo para el diagnóstico de los pacientes con enfermedad de Parkinson, sino para el escrutinio pre-sintomático de personas de alto riesgo que son buenos candidatos para tratamiento neuroprotector.

Tabla 1. Detalles clínicos de los pacientes con enfermedad de Parkinson y niveles de α -sinucleína total y oligomérica en LCR

Caso	Género	Edad (a)	Duración de la Enfermedad (m)	Grado H-Y	Signo bulbar	α -syn total (ng/ml)	oligómero de α -syn (URL/seg)	razón oligómero/total (%)
1	M	67	12	2	-	19,7	18095	13,1
2	M	60	60	3	+	15,0	13315	14,4
3	M	77	60	2	+	30,9	81535	30,8
4	M	83	12	3	-	19,4	8863	6,6
5	M	80	6	3	-	19,0	30742	23,6
6	F	59	36	3	-	12,5	11794	16,7
7	M	67	24	3	-	23,6	18411	10,3
8	M	70	36	4	-	22,8	24921	14,7
9	M	64	36	2	-	17,9	8494	7,1
10	M	65	24	3	-	20,0	12156	8,7
11	F	71	6	3	-	23,1	11953	6,9
12	F	43	48	3	-	22,5	23233	13,9

ES 2 541 213 T3

Caso	Género	Edad (a)	Duración de la Enfermedad (m)	Grado H-Y	Signo bulbar	α -syn total (ng/ml)	oligómero de α -syn (URL/seg)	razón oligómero/total (%)
13	F	70	120	4	-	24,9	20624	10,7
14	M	74	24	3	-	19,4	18578	13,8
15	F	76	9	3	-	18,9	14875	11,5
16	F	51	18	2	-	14,9	17897	19,6
17	M	77	180	4	-	20,4	10483	7,2
18	M	66	72	3	-	27,5	26038	11,7
19	F	79	20	2	-	21,8	8606	5,4
20	M	56	60	4	-	23,2	28945	16,7
21	F	57	72	3	-	18,8	18867	14,7
22	F	59	228	3	-	19,0	24257	18,6
23	F	69	36	1	-	17,8	11621	9,8
24	F	72	24	3	+	25,4	11406	5,8
25	M	56	16	1	-	25,1	23548	12,1
26	F	66	24	3	-	17,3	29272	25,7
27	M	53	60	4	-	16,8	14359	13,1
28	F	75	15	3	-	31,2	44073	16,4
29	F	71	72	4	-	23,4	11188	6,4
30	M	75	96	3	-	22,9	11792	6,9
31	M	76	6	2	-	16,1	15510	15,2
32	M	70	70	4	-	20,2	7873	5,5

a = año; m = mes; M = macho; F = hembra; grado H-Y = grado de Hoehn-Yahr; URL = unidad relativa de luminiscencia; razón de oligómero/total = proporción de oligómeros de α -sinucleína con respecto a la α -sinucleína total en LCR.

Ejemplo 2

5 Un estudio transversal mayor examinó muestras de LCR de otra cohorte de 121 sujetos, incluidos los pacientes con diagnóstico clínico de EP (n = 25, edad 43-83 [media \pm DT, 68,6 \pm 10,4] años), enfermedad de Alzheimer (EA) (n = 35, 58 a 83 años de edad [media \pm DT, 74,1 \pm 5,6] años) y parálisis supranuclear progresiva (PSP) (n = 18, 51 a 78 años de edad [media \pm DT, 69,4 \pm 8,1] años) y sujetos control (n = 43, edad 35-88 [media \pm DT, 64,9 \pm 12,5] años). Los pacientes con EA cumplieron los criterios DSMIV para la EA y los criterios NINCDS-ADRDA para el diagnóstico clínico de 'EA probable' (McKhann et al; Neurology 1984; 34 págs. 939-944). Los pacientes con PSP cumplieron los criterios diagnósticos NINDS-SPSP para PSP clínicamente definida o clínicamente probable (Lityan et al; Mov. Disord 2003; 18 págs. 467-486).

15 Se analizaron las muestras de LCR para determinar los niveles de α -syn mediante ELISA como se describió anteriormente. Como en la primera cohorte, se observaron niveles significativamente más altos de oligómeros de α -syn en LCR en los casos de EP (n = 25) en comparación con PSP (n = 18; p <0,05, prueba de comparación múltiple de Dunn), EA (n = 35; p <0,001) y sujetos control (n = 43; p <0,05) (Figura 3). Esto confirma los resultados de la primera cohorte, y también indica que α -syn en LCR es útil para distinguir la EP de otros trastornos neurológicos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para identificar si es un individuo tiene o no la enfermedad de Parkinson (EP) y/o distinguir entre EP y otro trastorno neurológico que no sea EP, cuyo método comprende medir la cantidad de oligómeros de α -sinucleína solubles y la cantidad total de α -sinucleína en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) tomada del individuo, calculando la razón de:
- 10
$$\frac{\text{cantidad de oligómeros de } \alpha\text{-sinucleína}}{\text{cantidad total de } \alpha\text{-sinucleína}}$$
- y determinando de este modo si el individuo tiene o no EP.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la determinación de si el individuo tiene o no EP comprende la determinación de si la razón se incrementa o no con respecto a la razón en una muestra tomada de un individuo sin EP.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde se determina que el individuo tiene EP cuando la razón se incrementa al menos 3 veces con respecto a la proporción en la muestra tomada de un individuo sin EP.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la determinación de si el individuo tiene o no EP comprende la determinación de si la razón, cuando se expresa como un porcentaje, es o no de al menos 6%.
- 25 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el individuo es sospechoso de estar en riesgo de desarrollar EP u otro trastorno neurológico que no es EP.
- 30 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el individuo tiene una historia familiar de EP u otro trastorno neurológico que no es EP.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde el individuo (a) no tiene o no ha sido diagnosticado de cualquiera de los síntomas clínicos asociados con un diagnóstico de EP, o (b) tiene o ha sido diagnosticado con un cualquiera de los síntomas no motores de EP, o (c) tiene o ha sido diagnosticado de uno o más síntomas asociados con otro trastorno neurológico que no es EP.
- 35 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones en anteriores, en donde el individuo se clasifica como Hoehn-Yahr de grado 2 o inferior.

FIGURA 1

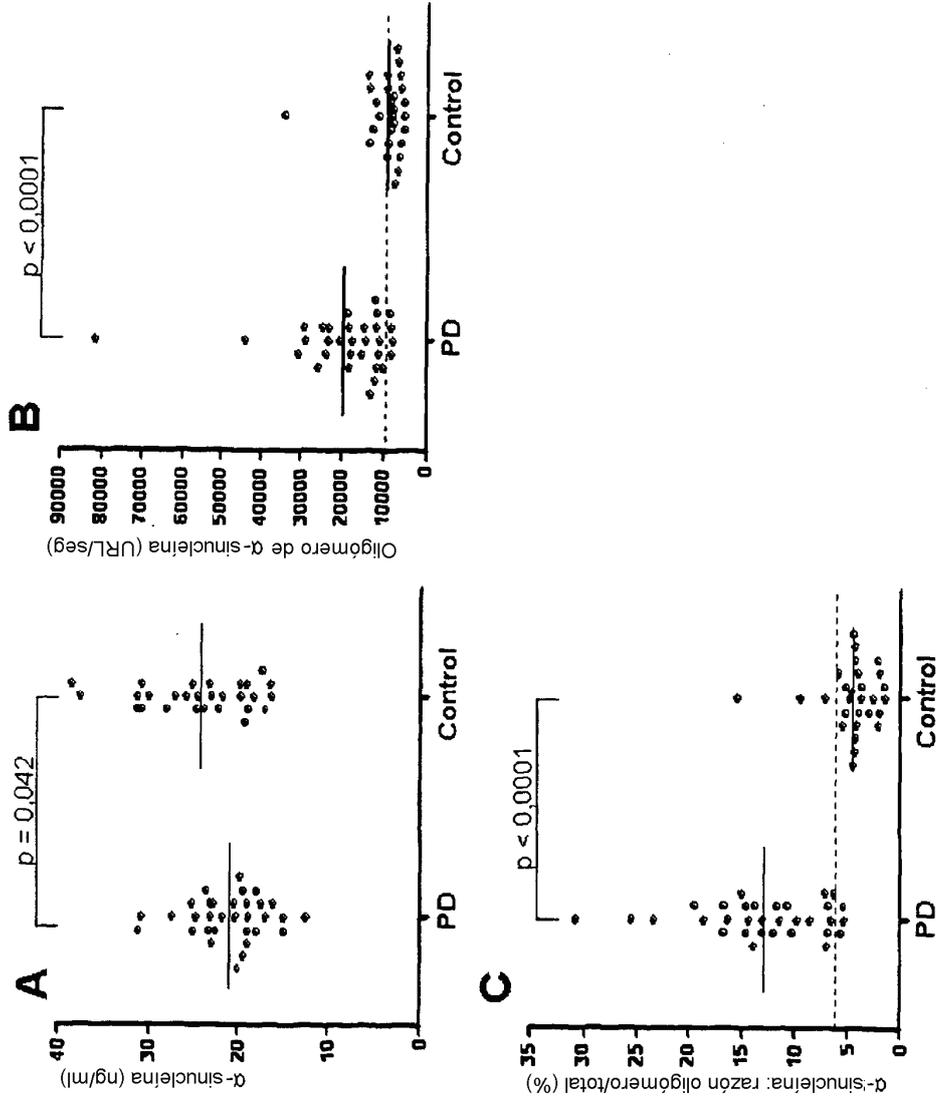


FIGURA 2

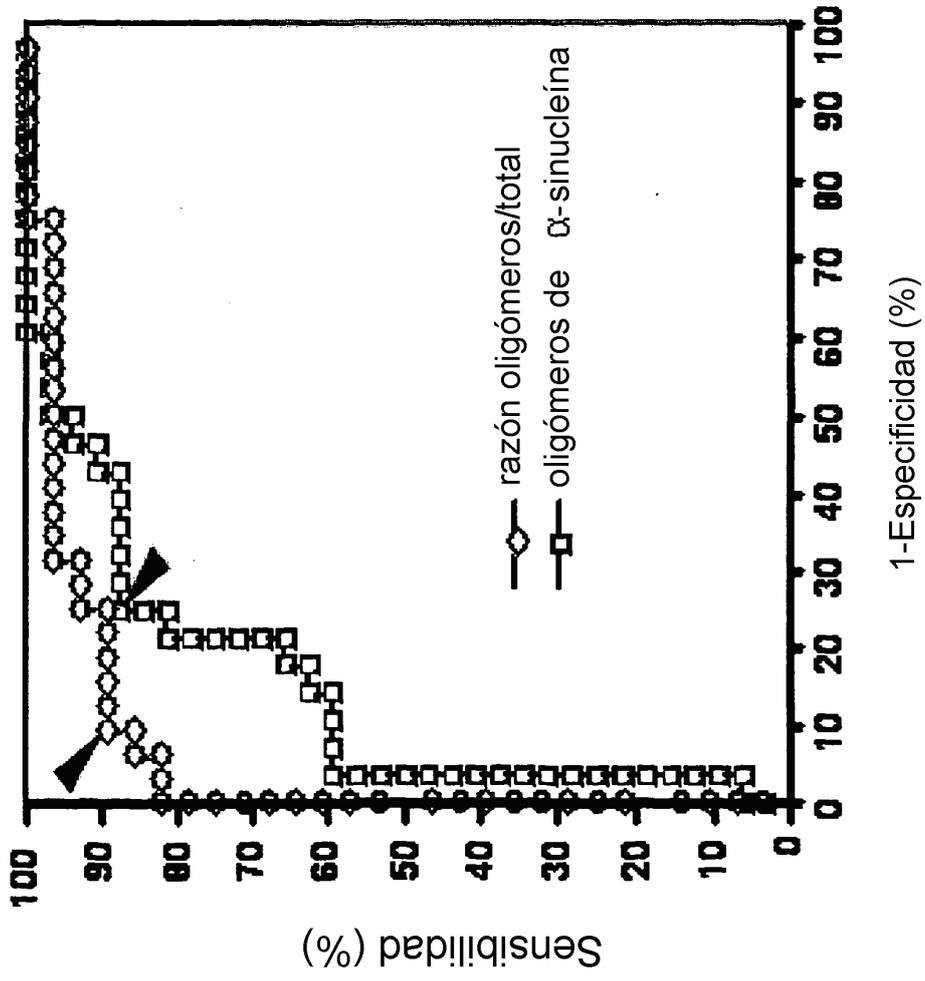


FIGURA 3

