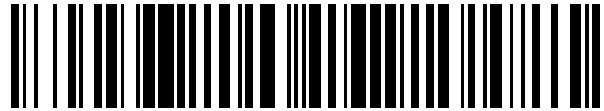


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 158**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2010 E 10752355 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2475992**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico y / o pronóstico del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

11.09.2009 DE 102009042160

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

02.03.2016

73 Titular/es:

**EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN
UNIVERSITÄTSKLINIKUM (100.0%)**

**Geissweg 3
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**BISKUP, SASKIA y
FUNK, NATALJA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 562 158 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

Procedimiento para el diagnóstico y / o pronóstico del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

5 La presente invención, se refiere a un procedimiento para el diagnóstico y / o para el pronóstico de enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades y, respectivamente, las dolencias neurodegenerativas, se caracterizan por una muerte lenta e imparable de las células nerviosas. Como enfermedades o dolencias neurodegenerativas, cabe citar, entre otras, a la esclorosis lateral amiotrófica, (ALS, [de sus siglas en idioma inglés] -), a las taupopatías, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, a las enfermedades de trinucleótidos, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Huntington (Corea de Huntington), a las enfermedades por priones, tales como, por ejemplo, las consistentes en la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, y a las sinucleinopatías, tales como las consistentes en la enfermedad de Parkinson. De una forma particular, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson son, además, una causa usual de la demencia, y de las necesidades resultantes a raíz de éstas, en las personas mayores.

Hasta el momento actual, no se conoce, en el mercado, ningún test de ensayo, mediante cuya ayuda, puedan diagnosticarse enfermedades neurodegenerativas, de una forma temprana y exenta de dudas, de una forma especial, aquéllas las cuales no sean genéticamente dependientes. Un diagnóstico temprano en las personas, las cuales tengan un riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa, sería deseable y conveniente, ya que en el caso de un diagnóstico tardío de las enfermedades neurodegenerativas, una gran parte de las células nerviosas, en las personas y / o en los pacientes concernientes, se habrán degenerado ya, y así, por lo tanto, una terapia aplicada a éstos, como consecuencia de ello, se aplicaría demasiado tarde. Mediante una identificación temprana de los pacientes en riesgo, y así mismo, también, mediante una terapia aplicada tempranamente, la pérdida de nuevas células nerviosas, por parte de dichos pacientes, se pararían, no obstante, por lo menos de una forma temprana.

En la solicitud de patente alemana DE 10 2007 024 382 A1, se describe un procedimiento para la diagnosis de una enfermedad neurodegenerativa, mediante el cual, se procede a analizar la expresión fuerte de la expresión genética de determinados genes, en una muestra de biopsia de un paciente. Este procedimiento, tiene no obstante el inconveniente de que, la extracción de la biopsia, para el paciente el cual se está sometiendo a examen de exploración, puede ser desagradable y dolorosa, y que, es necesaria una declaración fidedigna en cuanto al riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. De una forma adicional, el material necesario para llevar a cabo este procedimiento, así como los costes para ello, son grandes, ya que, para una diagnosis fidedigna, por regla general, deben comprobarse varios genes.

De una forma adicional, en el estado actual de la técnica, se conocen varias mutaciones del gen LRKK2, los cuales se encuentran manipuladas como marcadores genéticos para la enfermedad de Parkinson familiar. Sin embargo, no obstante, mediante estos marcadores, puede únicamente determinarse el riesgo de desarrollar una enfermedad específica, a cuyo efecto, adicionalmente, además, sólo representan marcadores familiares.

Lee et al. ("Reduced circulating angiogenic cells in Alzheimer disease", - Circulación reducida de las células angiogénicas en la enfermedad de Alzheimer -, (2009), Neurology 72: 1858 - 1863), describen el hecho consistente en la percepción de que, en la enfermedad de Alzheimer, circulan menos células angiogénicas, en la sangre, que en los pacientes sanos los cuales se han comparado. La percepción de esta constatación, conducen a los autores de esta solicitud de patente, de nuevo, a la conclusión de que, en las enfermedades de Alzheimer, se encuentra un número de CFU-EPC, más reducido, que en los pacientes sanos de control.

Choi et al. ("Impaired differentiation and apoptosis of hematopoietic precursors in a mouse model of myelodysplastic syndrome", - Diferenciación deficiente y apoptosis de los precursores hematopoyéticos en un modelo de ratón, del síndrome mielodiplástico (2008), Haematologica 93: 1394 - 1397), dan a conocer la utilización de un ensayo de CFC, mediante el cual se procede a aplicar un medio a base de metilcelulosa.

Así, por lo tanto, la presente invención, tiene como finalidad de proporcionar un procedimiento y, respectivamente, un nuevo marcador, mediante los cuales, puedan superarse los inconvenientes correspondientes al estado actual de la técnica, y también, mediante los cuales pueda pronosticarse, de una forma rápida, bien tolerada por parte de las personas examinadas, y de una forma fidedigna, el riesgo de que éstas puedan desarrollar enfermedades neurodegenerativas.

En concordancia con la presente invención, esta finalidad, se resuelve mediante un procedimiento para la diagnosis y / o el pronóstico o predicción del desarrollo de enfermedades degenerativas, en donde, el procedimiento, se describe en el apartado de las reivindicaciones anexas las cuales se incluyen en este documento de solicitud de patente.

Los inventores, han considerado, mediante el desarrollo del procedimiento en concordancia con la presente invención, el hecho consistente en que, a través de la sangre, y del sistema linfático, acontece un intercambio

continuo entre las células nerviosas y el cerebro, por un lado, y las células del sistema inmune, por otro lado. Las enfermedades neurodegenerativas, conducen, entre otras cosas, a la muerte de las células nerviosas individuales. Las causas para ello, pueden ser diversas. Las células perdidas, conducen, de nuevo, a la liberación de sustancias portadoras de señales, las cuales captan a los macrófagos residentes en el cerebro, así como a otras células adicionales del sistema inmune. La migración de las inmunocélulas, condiciona, a su vez, de nuevo, una pérdida de la células nerviosas, de tal forma que, esta circunstancia, conduce a una reacción la cual ya no es susceptible de poderse controlar, la cual, finalmente, constituye la base fundamental para un lento avance hacia una enfermedad neurodegenerativa progresiva. De una forma adicional, se proporcionan sustancias portadoras de señales (sustancias señalizantes) en la sangre y en el sistema linfático. Estas sustancias portadoras de señales, desarrollan así mismo, también, una acción, sobre los cuerpos blancos (glóbulos blancos) de la sangre, y en la periferia, así como sobre sus células precursoras o progenitoras, tal como, por ejemplo, en la médula ósea. Este hecho, puede conducir, entre otras cosas, al inicio de la proliferación y de la diferenciación de determinados cuerpos blancos o glóbulos blancos de la sangre. Este aumento de las células blancas precursoras o progenitoras, convierten en un elemento de utilidad, al procedimiento en concordancia con la presente invención.

El procedimiento en concordancia con la presente invención, consta así, por lo tanto, de las siguientes etapas:

a) el aislamiento de los glóbulos blancos (leucocitos), a partir de una muestra de sangre, procedente de una persona examinada,

b) el enriquecimiento y / o el cultivo de los glóbulos blancos las cuales se han aislado en la etapa a), mediante, por ejemplo, un medio, para la formación de diversas unidades de formación de colonias (CFUs); y

c) la determinación y la valoración del número de CFU-M, formados en la etapa b), con relación a las otras CFUs formadas.

De una forma adicional, la finalidad objeto de la presente invención, se cumplimenta mediante la utilización de un ensayo de CFU, y la utilización de un medio, el cual contiene metilcelulosa, procediendo a cultivar glóbulos blancos, mediante la formación de diversas colonias, para el diagnóstico y / o pronóstico o predicción del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Finalmente, la finalidad objeto de la presente invención, se cumplimenta mediante un equipo transportable a modo de "kit", el cual contiene un medio que contiene metilcelulosa, así como las instrucciones de manejo para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención.

La finalidad objeto de la presente invención, se cumplimenta, de este modo, en su totalidad.

Mediante el nuevo procedimiento, o respectivamente, mediante el nuevo procedimiento y el nuevo equipo transportable, a modo de "kit", es ahora posible, por primera vez, mediante el análisis de una muestra de sangre y, respectivamente, mediante el análisis de la formación de colonias, de los glóbulos blancos las cuales se aíslan a partir de ésta, el diagnosticar el hecho consistente en que, si la persona, a la cual pertenece la muestra de sangre analizada, porta el riesgo de desarrollar, o no, una enfermedad neurodegenerativa. Mediante el procedimiento en concordancia con la presente invención, se determina en qué proporción se encuentra presente el CFU-M, en la cantidad total de glóbulos blancos contenidos en las colonias. Los solicitantes de la presente solicitud de patente, han mostrado, por una parte, el hecho consistente en que, los pacientes afectados de la enfermedad de Parkinson, tienen n porcentaje de formación de CFU-M, el cual es superior, al correspondiente a las personas de control, sanas. De una forma adicional, mediante el procedimiento en concordancia con la presente invención, se ha mostrado el hecho de que, así mismo, también, en las personas las cuales portan mutaciones en un gen determinado, el cual sea válido como marcador para enfermedades de Parkinson familiares, la proporción en la formación de CFU-M, es mayor que en las personas de control. Así, por lo tanto, la presencia de una alta proporción de colonias de CFU-M, las cuales portan un gen determinado, permiten concluir el hecho, en una persona, de que ésta sea portadora de un riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa.

Mediante los términos "CFU" y "CFC", se entenderán, según el estado actual de la técnica, los siguientes significados: Las CFC ("colony-forming cells"; - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a células de formación de colonias] -) representan células madre / células precursoras o progenitoras, la cuales de forma contraria a lo que lo hacen las células madre, se encuentran adicionalmente diferenciadas, y las cuales se establecen sobre determinadas líneas de diferenciación celular. En el test de ensayo de cultivos de unidades de formación de colonias (CFU assay) – [CFU, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a colony-forming unit-culture]-), éstos pueden estimularse, mediante la aportación de factores de estimulación de las colonias (CSF), para la formación de colonias de esta línea celular. Las células de las colonias formadas, pueden entonces identificarse, a raíz de su morfología y su determinado marcador superficial, y fijarse las primeras etapas. Las CFU (unidades de formación de colonias – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a colony forming units] -) se clasifican: Así, de este modo, se efectúa una diferenciación, - y en el presente caso, caen bajo el concepto de "CFU", las siguientes – por ejemplo, CFU-Ba ("basophil"- [basófilo] -; los basófilos, son las células progenitoras o precursoras de la células

5 formadoras de la sangre, con el marcador de reconocimiento CD34); CFU-E (“erythrocyte” – [eritrocito] -; los eritrocitos, son las células precursoras o progenitoras de los eritrocitos); CFU-Eo (Eo-CFC, “eosinophil” – [eosinófilo] -; los eosinófilos, son las células precursoras o progenitoras de los Granulocitos eosinófilos) -; CFUG (G-CFU “granulocyte” – [granulocito] -; los granulocitos, son las células precursoras o progenitoras de los Granulocitos); CFU-GEMM (“granulocyte, erythrocyte, megakaryocyte, macrophage” – [granulocito, eritrocito, megacariocito, macrófago] -; son las células precursoras o progenitoras de los granulocitos, los eritrocitos, los megacariocitos, los macrófagos); CFU-GM (GM-CFC “granulocyte, macrophage” [granulocito, macrófago] -; son las células precursoras o progenitoras de los granulocitos, macrófagos); CFU-M (M-CFU “macrophage” –[macrófago] -; son las células precursoras o progenitoras de los macrófagos); CFU-MEG (“megacaryocyte” – [megacariocito] -; se trata de las células precursoras o progenitoras de los megacariocitos).

15 La células madre hematopoyéticas - y las células precursoras o progenitoras hematopoyéticas, se encuentran ubicadas no únicamente en la médula ósea, sino, así mismo, también, en la sangre periférica. Mediante el aislamiento de los glóbulos rojos, a partir de la sangre periférica, pueden aislarse, por lo tanto, las células precursoras o progenitoras, las cuales proliferan y se diferencian, bajo determinadas condiciones de cultivo, con objeto de formar las anteriormente mencionadas colonias. Así, dicho de otro modo, puede procederse a realizar un recuento de las células hematopoyéticas, en una muestra, a partir de la formación de colonias, en un ensayo de CFU.

20 Mediante el procedimiento en concordancia con la presente invención, se procede, en primer lugar, a aislar los glóbulos blancos de la sangre, a partir de una muestra de sangre, la cual se encuentre a disposición, y la cual, de una forma preferible, contenga sangre fresca (sangre periférica heparinizada), de los otros componentes de la sangre y, respectivamente, a cultivarlos, mediante una centrifugación por gradiente, o mediante anticuerpos, en un medio, el cual permita la formación de la colonia. El tiempo de cultivo, es el correspondiente a un período de tiempo de por lo menos 10 días, siendo éste, de una forma preferible, el correspondiente un período de tiempo que va desde los 14 días hasta los 20 días.

30 Los inventores, han mostrado ahora, mediante propios ensayos los cuales se han llevado a cabo, el hecho de que, tanto los pacientes los cuales se encuentran afectados de la enfermedad de Parkinson, como también las personas, las cuales son portadoras de la mutación anteriormente mencionada, arriba, en el gen consistente en el LRRK2-Gen (“Leucin-rich repeat Kinase 2”-Gen,- [Gen quinasa 2 de repetición, rica en leucina (pero, la cuales, todavía no muestran ningún signo de la enfermedad de Parkinson), los cuales muestran valores con respecto a la formación de CFU, los cuales se diferencian con respecto a aquéllos de las muestras de control. En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, es por lo tanto preferible, el hecho de que, en la etapa c), se proceda a determinar y a comparar el número relativo de por lo menos dos de las siguientes CFUs, a saber, la CFU-G (CFU-granulocito), y CFU-M (CFU-macrófago). En una forma adicional de presentación de la presente invención, se procede, de una forma adicional, a determinar el número relativo de CFU-GM (CFU-granulocito / macrófago).

40 Mediante la comparación o la igualación de los valores del número relativo de las diversas CFUs, puede determinarse el hecho de si, el valor para la CFU-M es mayor a, por ejemplo, para la CFU-G.

45 Globalmente, se muestra el hecho de que, en los pacientes afectados de la enfermedad de Parkinson, el número relativo de CFU-M, es mayor, que el correspondiente a las muestras de control; así, por lo tanto, en una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, es preferible y ventajoso, el hecho de que, se proceda a determinar, respectivamente, el número relativo de CFU-M y de CFU-G, y que, estos valores, se comparen, entre las personas enfermas y las personas sanas. Un valor incrementado, para la CFU-M, se encuentra asociado, además, con el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas.

50 De una forma adicional, la expresión “número relativo”, significa la proporción de una determinada formación de colonia, con respecto al número total de colonias formadas.

55 La muestra de sangre es, de una forma adicionalmente preferible, una muestra de sangre fresca, y que ésta se haya extraído previamente de una persona, la cual deba examinarse en cuanto a lo referente a desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. Se entenderá aquí, en este caso, de una forma adicional, el hecho de que, la persona o el paciente, será un ser humano, a cuyo efecto, el sexo y la edad, así como la constitución corporal, no desempeñan ningún rol interpretativo (es decir que, éstos, no tiene ninguna importancia), siempre y cuando no se subyazga ninguna enfermedad (resfriado, infección, etc.).

60 En el presente contexto – así como, también, en el correspondiente arte especializado de la técnica, en sí mismo -, bajo la denominación de células blancas de la sangre o cuerpos blancos de la sangre, glóbulos blancos de la sangre (leucocitos), se entenderán las células sanguíneas troncales o endoplásticas con una función de defensa o protección, y éstas abarcan a los granulocitos, a los linfocitos, y a los monolitos.

En una forma de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, se procede así, por lo tanto, a asociar, en la etapa C), un determinado y relativo número de CFU-M, con la existencia y / o con el curso o desarrollo y / o con la intensidad o violencia y / o con el pronóstico de enfermedades neurodegenerativas.

5 De una forma particular, es también preferible y ventajoso, así mismo, el hecho de asociar un número de colonias del CFU-M, correspondiente a un porcentaje > 25 %, calculado sobre el número total de colonias – con el valor el con la existencia y / o con el curso o desarrollo y / o con la intensidad o violencia y / o con el pronóstico o predicción de enfermedades neurodegenerativas.

10 De una forma adicional, se entenderá el hecho de que, en el ámbito de la presente invención, entren también en consideración, así mismo, unos valores, los cuales, correspondan a un porcentaje que se encuentra por debajo del 25 %, pero, los cuales, se encuentren así mismo, también en el ámbito correspondiente a los conocimientos de las personas expertas en el arte especializado de la técnica, a raíz de la lectura de la presente invención y bajo las consideraciones de eventuales fallos del recuento, así como también, las correspondientes al contexto de la
15 presente invención.

De una forma adicional, una forma de presentación en concordancia con la presente invención, es preferible y ventajosa, si el medio utilizado en la etapa b), para el cultivo, contiene metilcelulosa, o bien, otras sustancias del tipo gelatina.

20 Mediante la utilización de la metilcelulosa, o de otras sustancias del tipo gelatinoso, tales como, por ejemplo, la agarosa, se forma una matriz semisólida, en la cual pueden cultivarse las células. De una forma preferible y ventajosa, el medio de cultivo, contiene metilcelulosa, si bien se entenderá el hecho de que, será también posible, el aplicar cualquiera otra sustancia, la cual sea apropiada para la formación de una matriz semisólida, y para el cultivo de las células.
25

La presente invención, se refiere así mismo, también, a la utilización de un ensayo de CFC (CFC Assay), para la diagnosis y / o para el pronóstico del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

30 Mediante la denominación de Ensayo de formación de colonias de células (CFC Assay – [colony forming cell (CFC) assay] -), al cual se le denomina así mismo, también, como Ensayo de Metilcelulosa, se entenderá, en el presente contexto, tal como así mismo, también, en el arte especializado de la técnica, como un in vitro Assay – Ensayo in vitro -, el cual se basa en la capacidad de las células hematopoyéticas precursoras o progenitoras / de la etapa previa, en un medio semisólido (mediante la estimulación con citocinas), para proliferar en colonias y para diferenciarlas. Las colonias formadas, pueden entonces contarse, en cuanto a lo referente a su morfología. En concordancia con la
35 presente invención, puede procederse así, de este modo, a aplicar los CFC Assays (ensayos de CFC), para la diagnosis y / o para el pronóstico del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

40 Los inventores, han mostrado, por vez primera, en el presente contexto, el hecho de que, el uso de medios los cuales contengan metilcelulosa, así como del ensayo de CFC (CFC Assay) a aplicar con este medio, proporcionado un medio, mediante el cual, y con la ayuda del procedimiento en concordancia con la presente invención, puede determinarse el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas, por parte de una persona.

45 Se entenderá el hecho de que, los rasgos distintivos y características de las descripciones anteriormente descritas, arriba, así como los que se ilustrarán abajo, a continuación, son susceptibles de poderse utilizar y aplicar, no únicamente en la combinación respectivamente proporcionada, sino que, éstas son también susceptibles de poderse utilizar y aplicar, en otras combinaciones, o bien, de una forma individual, sin salirse, por ello, del ámbito de la presente invención.

50 La presente invención, se describirá, ahora, de una forma más detallada, en la parte que sigue de este documento de solicitud de patente, mediante la descripción y, respectivamente, mediante ejemplos de realización, así como también, con la ayuda de las figuras. En éstas:

La figura 1, representa una vista de conjunto, esquemática, de la hematopoyesis;

55 La figura 2, es una vista general de la distribución del ensayo de CFC Assay -, Diversas colonias procedentes de muestras de control (es decir, procedentes de personas de control, cultivadas mediante un medio de cultivo con eritropoyina – [Epo] -); Diagrama de control (A) y morfología microscópica de los respectivos clones (B);

60 La figura 3, es la distribución de las clones formados, en muestras procedentes de personas de control, en el ensayo (A), y en muestras procedentes de pacientes afectados de la enfermedad de Parkinson (B), en el CFC Assay (ensayo de CFC) (Medio de cultivo, exento de Epo), respectivamente representados en el diagrama de columnas.

La figura 4, es un diagrama, el cual reproduce la cantidad relativa (cantidad ésta proporcionada en %), de CFU-M de diversas poblaciones humanas, de los portadores de mutaciones de LRRK2 y pacientes afectados de la enfermedad de Parkinson, los cuales se relacionan en el eje de la parte baja (abcisa) del diagrama.

5 La figura 5, es una vista general, esquemática, de las etapas de una forma de representación del procedimiento en concordancia con la presente invención.

En la figura 1, se encuentra presentada, de una forma esquemática, una vista general de la hematopoyesis, en seres humanos, en donde, las abreviaturas relacionadas en ésta, tienen los siguientes significados: HCS; células madre hematopoyéticas; HPC; células progenitoras (precursoras) hematopoyéticas; CMP (CFU-S): “common myeloid precursor”, Progenitor (precursor) mieloide común; CLP: “common lymphoid precursor”, Progenitor (precursor linfóide común; CFU-GEMM: “Colony forming unit granulocyte erythroid megakaryocyte macrophage” Unidad de formación de diversas colonias de granulocitos, eritroides, megacariocitos, macrófagos; CFU-GM: “Colony forming unit granulocyte macrophage” Unidad de formación de colonias de granulocitos – macrófagos. La hematopoyesis, es un proceso de división y de maduración celular, mediante el cual se generan las células de la sangre. El desenlace de la formación de la sangre, es el consistente en las pluripotentes células madre hematopoyéticas, indiferenciadas (véase, a dicho efecto, la figura 1: HCS), la cual genera las primera etapas (o la células progenitoras o precursoras), las cuales no pueden renovarse por sí mismas, y que sólo hace madurar a un tipo especial de células. Las células progenitoras o precursoras inmaduras, pueden circular por la sangre, y establecerse de nuevo, en la médula ósea. La regulación de la formación de la sangre, aconteced mediante o factores del medio o factores del tipo humoral (tal como, por ejemplo, mediante factores tales como las citocinas, las hormonas, las calonas, la eritropoyetina. De una forma adicional, partiendo de los progenitores o precursores mieloides comunes, CMP1, se forman – mediante las etapas intermedias de CFU-GEMM, Granulocitos neutrófilos, eosinófilos, y basófilos (mediante las etapas adicionales de CFU-GM), así como eritrocitos, megacariocitos y monolitos.

EJEMPLO

Análisis de la distribución de clones, mediante muestras de control, y mediante el cultivo con EPO.

En ensayos de partida, se procedió a analizar muestras procedentes de personas de control, de distintos sexos y de distintas edades, en cuanto a lo referente a la distribución de los clones, después de haber procedido al cultivo de las células consistentes en lo glóbulos blancos de la sangre, a partir de estas muestras, y en un medio de cultivo con eritropoyetina. A dicho efecto, y después de haberse sometido a un proceso de centrifugación de gradiente, se procedió a la obtención de estos glóbulos blancos de la sangre, y éstos se lavaron, y se procedió a un recuento de éstos, y a continuación, éstos se incorporaron en un medio el cual contenía metilcelulosa y citocinas (Epo (Erythropoetin – eritropoyetina -), SCF (Factor de células madre – ítem cell factor), GM-CSF (Factor de estimulación de colonias de granulocitos – macrófagos), IL-3 (interleucina -3)(todos ellos, de procedencia de la firma R & Systems, Minneapolis, USA).

Después de un período de tiempo de incubación de 14 días, se evidenciaba la distribución la cual se reproduce en la figura 2: En la figura 2A, se reproducen los resultados obtenidos, en un diagrama de columnas, y así mismo, también, los crecimientos de los respectivos clones, en las fotografías las cuales se proporcionan debajo del diagrama de columnas (Fig. 2B), por debajo de los respectivos clones. Se evidencia, a raíz de estos resultados, el hecho consistente en que, los porciones en porcentaje, de las diversas células (CFU-E, BFU-E, CFU-G, CFU-M, CFU-GM, CFU-GEMM), casi no se diferencian (es decir, se diferencian muy poco), en las personas de control, independientemente del sexo y de la edad de éstas.

Análisis de la distribución de clones, mediante muestras de control, y mediante un cultivo sin EPO.

En los análisis llevados a cabo con posterioridad, se procedió a analizar muestras procedentes de personas de control, sanas, y muestras procedentes de pacientes los cuales se encuentran afectados de la enfermedad de Parkinson. A dicho efecto, se procedió a separar, respectivamente, 10 ml de sangre periférica heparinizada de personas / pacientes, respectivamente, mediante una centrifugación por gradiente de densidad, de Ficoll, y con los glóbulos blancos separados, se procedió a llevar a cabo un cultivo de células. Con objeto de llevar a cabo este cometido, se procedió a utilizar un medio de cultivo, el cual contenía metilcelulosa, y otros aditivos adicionales (SCF, GM-CSF, IL-3) (de procedencia de la firma R & Systems, Minneapolis, USA). El cultivo de células, se cultivó durante un transcurso de tiempo de 14 días, en una incubadora, en la cual, posteriormente, se efectúa un recuento de las células y, respectivamente, de las colonias.

Se evidenció el hecho de que, a partir de las muestras procedentes de las personas de control, se formó una cantidad correspondiente a un porcentaje de aprox. un 63 % de CFU-G, una cantidad correspondiente a un porcentaje de aprox. un 18 % de CFU-M, y una cantidad correspondiente a un porcentaje de aprox. un 63 % de CFU—GM (véase, a dicho efecto, la Fig. 3A). En el caso de las muestras procedentes de las personas afectadas de la enfermedad de Alzheimer (véase, a dicho efecto, la Fig. 3B), se evidenció, por el contrario, una distribución de los

resultados, consistente en una cantidad correspondiente a un porcentaje de aprox. un 45 % de CFU-G, una cantidad correspondiente a un porcentaje de aprox. un 33 % de CFU-M, y una cantidad correspondiente a un porcentaje de aprox. un 22 % de CFU—GM correspondiendo, estos resultados, a un considerable desfase de la formación de colonias, en el sentido de la CFU-M.

- 5 Análisis de muestras procedentes de personas con una mutación del LRRK2
- 10 En otros ensayos los cuales se llevaron a cabo de una forma adicional, se procedió a analizar muestras de personas, las cuales eran portadoras de diversas mutaciones en el Gen LRRK2. Las mutaciones, en el gen LRRK2 (LRRK2-Gen – [“Leucin-rich repeat Kinase 2” – Gen, – Gen quinasa 2 de repetición, rica en leucina] -), según los nuevos conocimientos existentes en el arte de la técnica especializada, son biomarcadores para enfermedad de Parkinson familiar; Hasta el momento actual, se han identificado las mutaciones G20192, Q930R, y L1114L, del gen LRRK2.
- 15 La realización de los ensayos, se llevó a cabo de la forma la cual se encuentra descrita anteriormente, arriba. La formación de las colonias a partir de las muestras procedentes de personas, portadoras de las citadas mutaciones, se comparó con las de las muestras procedentes de las personas de control, así como, también, con las procedentes de aquélla personas las cuales procedían de los pacientes afectados de la enfermedad de Parkinson (véase, a dicho efecto, la Fig. 4). Mediante los resultados obtenidos en la realización de estos ensayos, se confirman
- 20 los conocimientos existentes en el arte especializado de la técnica, y ya conocidos, para los pacientes los cuales estén afectados de la enfermedad de Parkinson, a saber, el hecho consistente en que, la porción porcentual relativa de las CFU-M, en los portadores de las mutaciones en cuestión, y para las personas afectadas de la enfermedad de Parkinson, era, en valor medio, mayor que la correspondiente a la de las personas de control.
- 25 Así, de este modo, mediante estas evidencias, los inventores demuestran el hecho consistente en que, el procedimiento en concordancia con la presente invención, representa un medio apropiado, mediante el cual, pueden realizarse afirmaciones, en cuanto al riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas.
- 30 Las muestras de sangre, se obtuvieron a raíz de un estudio científico de la Sección para Neurodegeneración, en el Hertie Institut fuer Hirnforschung, - Instituto Herti de la Investigación sobre el Cerebro -, Tübingen (Alemania). Existe a disposición, una instancia ética.
- 35 La sangre (una cantidad de aprox. 10 ml), se diluyó mediante una solución salina equilibrada, HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen, Carlsbad, USA), en un factor de relación de 1 : 1, y ésta se aplicó sobre 15 ml de Ficoll-Paque Plus (de procedencia de GE Healthcare). Mediante un proceso de centrifugación, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, a 400 x g, se obtuvieron los glóbulos blancos y, éstos, se lavaron 2 x con, respectivamente, 20 ml de tampón HBSS, en 10 ml de IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media, - Medio Iscove modificado Dulbecco -, de la firma Invitrogen), se recogieron, y se efectuó un recuento de éstos. Con objeto de
- 40 efectuar un cultivo adicional de los glóbulos blancos obtenidos, se procedió a utilizar medios de cultivo, con contenido en metilcelulosa, de procedencia de la firma R&D Systems (Human Methylcellulose Complete Media, - medio humano completo de metilcelulosa – y Human Methylcellulose Complete Media without Epo -, medio humano completo de metilcelulosa sin EPO). Se procedió a llevar a cabo un recubrimiento de las células, a razón de 500.000 células / ml de medio. El cultivo de las células se llevó a cabo en placas de cultivo de células de 3,5 cm (de procedencia de la firma BD Biosciences Falcon, San Jose, USA), a una temperatura de 37 °C, a un 5 % de CO₂, y a
- 45 un alto porcentaje de humedad. En el día 15, después del recubrimiento (es decir, desde el inicio del cultivo), se procedió a valorar las colonias, con la ayuda de un microscopio de luz, y se calcularon los porcentajes de la poblaciones de clones individuales.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para el diagnóstico y / predicción del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, en donde, el procedimiento, consta de las siguientes etapas:
- 10 a) el aislamiento de los glóbulos blancos (leucocitos), a partir de una muestra de sangre, procedente de una persona examinada,
- 15 b) el enriquecimiento y / o el cultivo de los glóbulos blancos las cuales se han aislado en la etapa a), para la formación de diversas unidades de formación de colonias (CFUs); mediante lo cual se forman CFU-M y otras CFU adicionales, y
- 20 c) la determinación y la valoración del número de CFU-M, formados en la etapa b), con relación a las otras CFUs formadas.
- 25 2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que, la etapa b), se lleva a cabo en un medio para el cultivo de diversas unidades de formación de colonias (CFUs).
- 30 3.- Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que, en la etapa c), se determina y se compara el número relativo de por lo menos dos de las CFUs formadas en la etapa b), a saber, de los CFU-G (CFU-Granulocito) y de las CFU-M (CFU-Macrófago).
- 35 4.- Procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado por el hecho de que, de una forma adicional, se determina el número relativo de CFU-GM (CFU-Granulocito / Macrófago).
- 40 5.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que, la determinación de un número relativo de CFU-M, el cual sea mayor que el correspondiente al número relativo de GFU-G, se asocia con la presencia y / o el curso y / o la intensidad y / o la predicción de enfermedades neurodegenerativas.
- 45 6.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que, en la etapa c), un determinado número relativo de CFU-M, se asocia con la presencia y / o el curso y / o la intensidad y / o la predicción de enfermedades neurodegenerativas.
- 50 7.- Procedimiento, según la reivindicación 6, caracterizado por el hecho de que, la determinación de un número de colonias de CFU-M, de por lo menos un porcentaje de aprox. el 25 %, se asocia con la presencia y / o el curso y / o la intensidad y / o la predicción de enfermedades neurodegenerativas.
- 8.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por el hecho de que, el medio utilizado en la etapa b), para el cultivo, contiene metilcelulosa.
- 9.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por el hecho de que, el aislamiento de los glóbulos blancos, a partir de las muestras de sangre, acontece mediante una centrifugación por gradiente de densidad, o mediante una purificación de anticuerpos específicos.
- 10.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por el hecho de que, el cultivo de los glóbulos blancos aislados, acontece durante un período de tiempo de por lo menos 10 días, y, de una forma preferible, durante un período de tiempo de 14 días.
- 11.- Uso de un ensayo de CFC, mediante la formación de colonias precursoras hematopoyéticas, en una muestra, para el diagnóstico y / o la predicción del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

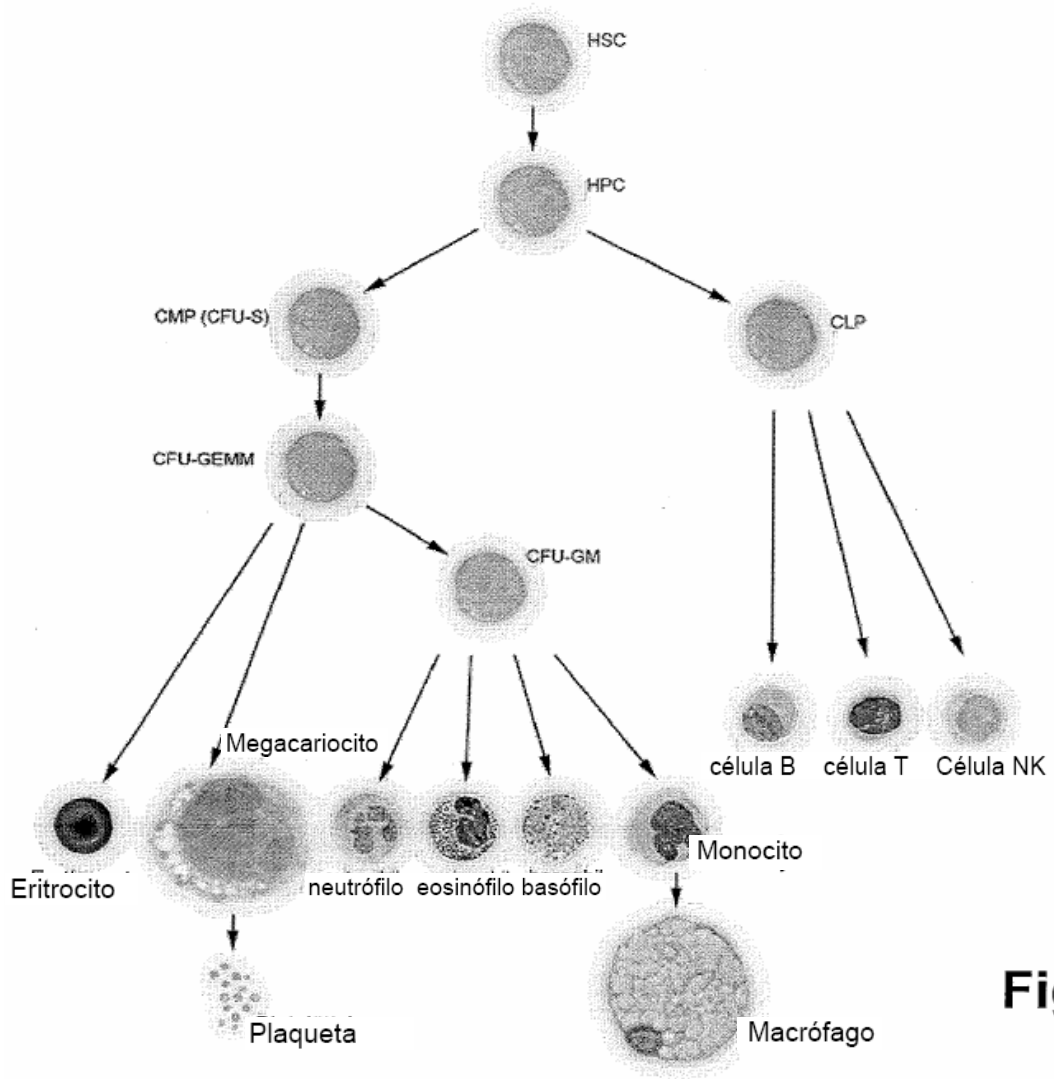


Fig. 1

Femenino, nacido en 1974
 Masculino, nacido en 1963
 Masculino, nacido en 1973
 Femenino, nacido en 1950
 Masculino, nacido en 1956
 Masculino, nacido en 1960

Fig. 2a

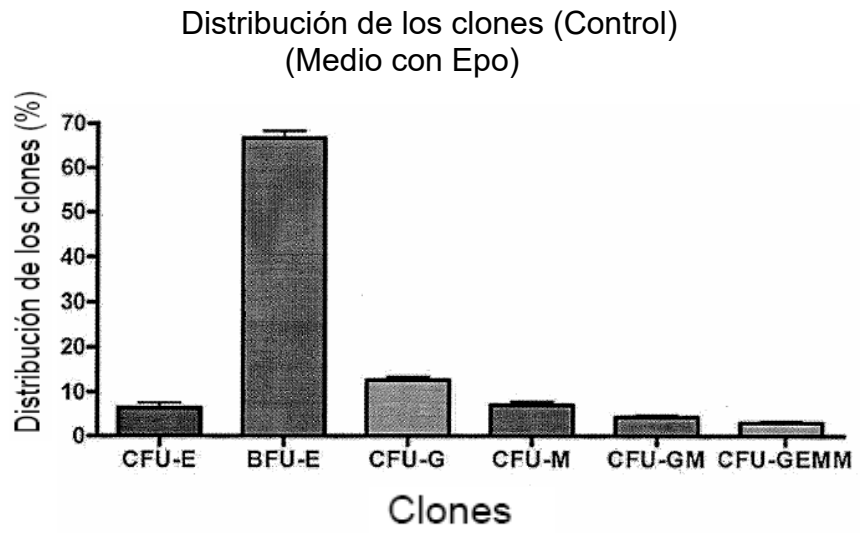
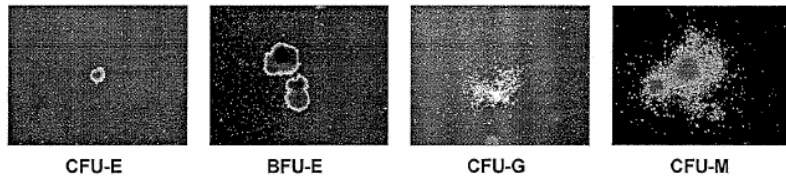


Fig. 2b



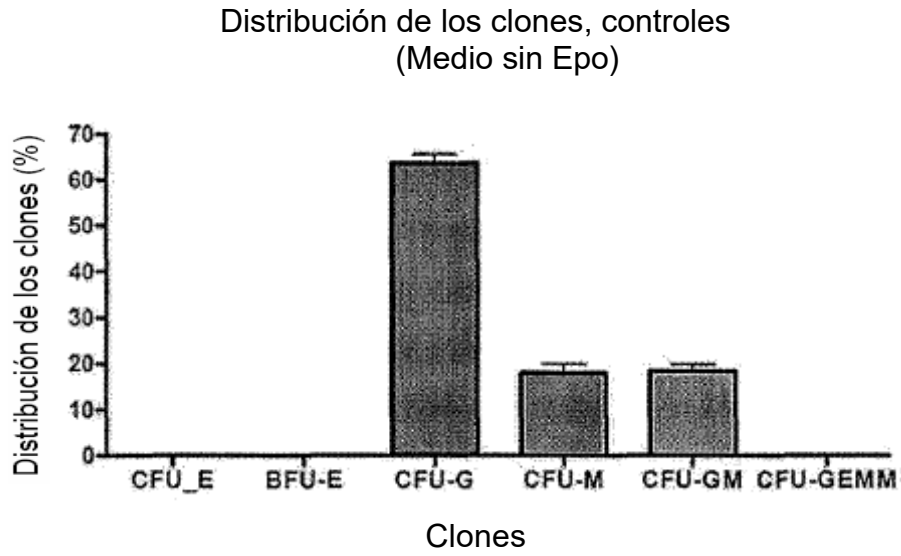


Fig. 3a

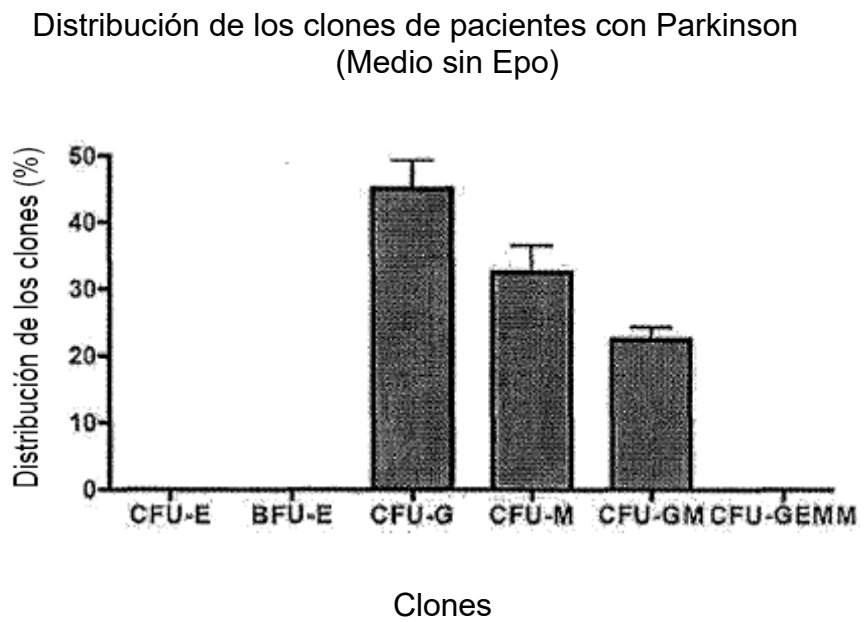


Fig. 3b

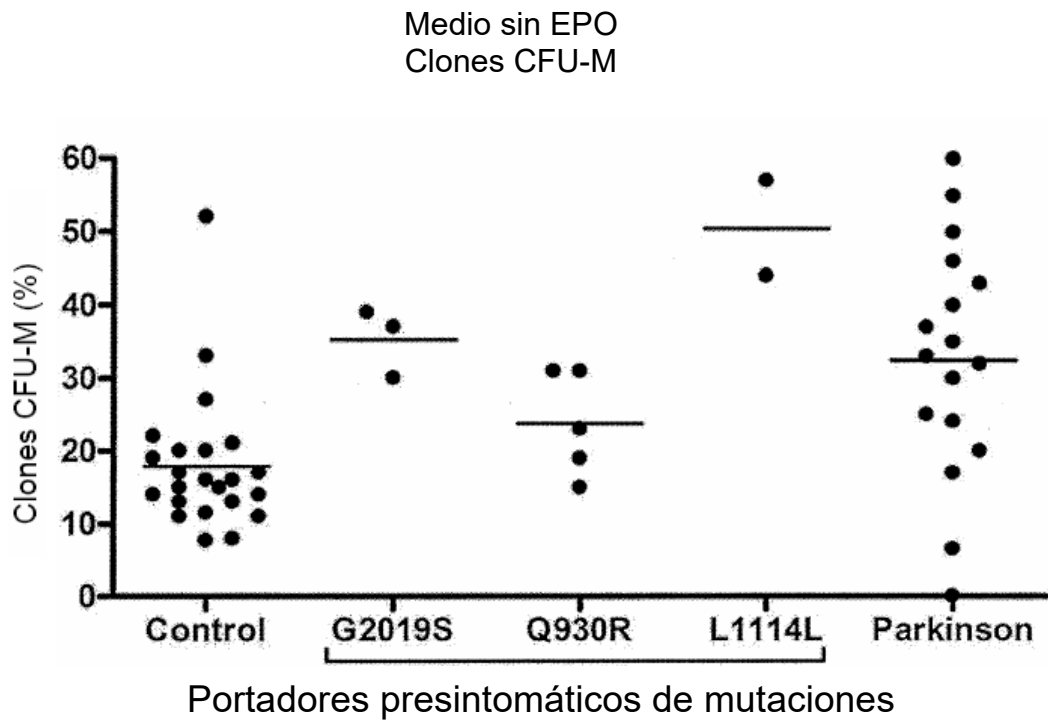


Fig.4

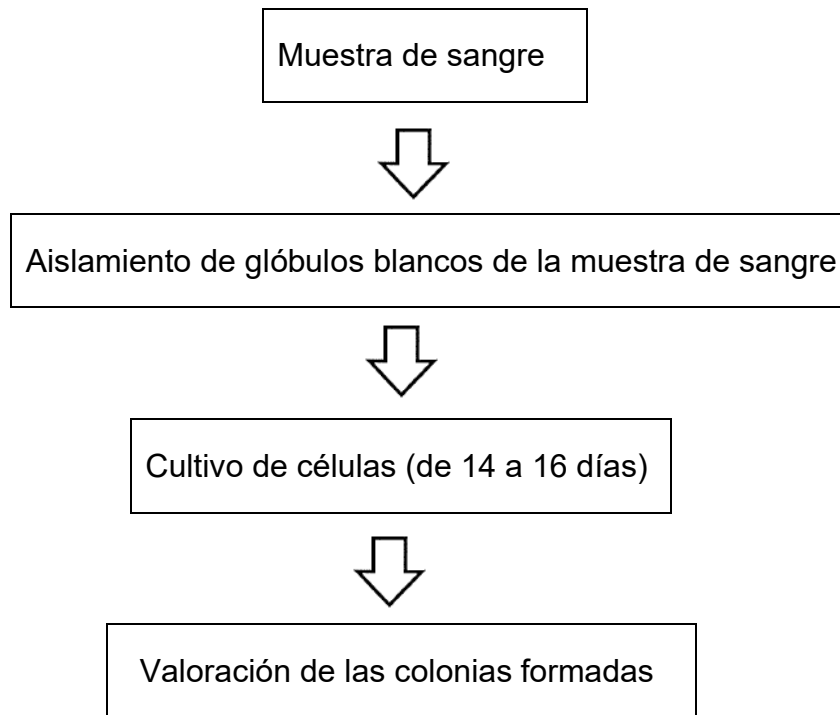


Fig. 5