

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 876**

51 Int. Cl.:

**A61B 6/00** (2006.01)

**G01N 33/534** (2006.01)

**G01T 1/00** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2012 PCT/US2012/056144**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13043745**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2012 E 12833356 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2750606**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, trastornos y procesos asociados**

30 Prioridad:

**19.09.2011 US 201161536300 P**

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

**08.05.2019**

73 Titular/es:

**C2N DIAGNOSTICS (100.0%)  
Center For Emerging Technologies 4041 Forest  
Park Avenue  
Saint Louis, MO 63108, US**

72 Inventor/es:

**WEST, TIM y  
PAOLETTI, ANDREW C.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 711 876 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

Métodos para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, trastornos y procesos asociados

### Campo de la invención

- 5 La invención se refiere en general a métodos para el pronóstico de la enfermedad de Parkinson y los procesos asociados, y más específicamente, a los niveles de sinucleína alfa y la correlación con dicha enfermedad.

### Información de los antecedentes

- 10 La proteína alfa-sinucleína se ha relacionado con la enfermedad de Parkinson (EP) a través de una variedad de estudios en humanos y animales. Estudios recientes han demostrado que la concentración de alfa-sinucleína en el CSF (por sus siglas en inglés) es significativamente menor en los pacientes con EP que en sujetos de control, lo que sugiere que el metabolismo de alfa-sinucleína está alterado en pacientes con EP. Al igual que otras enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas, el plegamiento de proteínas depende de la concentración. Por lo tanto, la disminución de la síntesis o el aumento del aclaramiento de la sinucleína es una forma potencial de desarrollar tratamientos para la EP y compañías farmacéuticas se han centrado en el metabolismo de esta proteína como un objetivo farmacológico.

- 15 El ensayo cinético de marcaje con isótopos estables (por sus siglas en inglés, SILK) se basa en la capacidad de detectar la incorporación metabólica de aminoácidos marcados con isótopos estables en proteínas y péptidos. Los isótopos estables agregan una pequeña cantidad de peso (2-100 Daltons) a los péptidos que contienen el isótopo estable y este peso adicional se puede medir mediante un espectrómetro de masas. Al medir la incorporación metabólica de isótopos estables en proteínas en el CSF en varios momentos después de la administración de un isótopo estable, el ensayo SILK se puede usar para medir la producción y el aclaramiento de proteínas en el sistema nervioso central humano.

- 20 A continuación se describe el protocolo para medir el metabolismo de alfa-sinucleína derivada del cerebro en un sujeto humano. Un participante en el estudio se identifica y se inscribe en el estudio. En el primer día del estudio del participante, se le colocarán catéteres IV y lumbares en el participante y se les administrará un isótopo estable durante un período de tiempo predeterminado. Las muestras de plasma y CSF se extraerán a través de los catéteres en tiempos predeterminados. La alfa-sinucleína se aislará después de las muestras biológicas y la incorporación del isótopo estable en la proteína se medirá mediante un espectrómetro de masas. El cambio en la alfa-sinucleína marcada a no marcada a lo largo del tiempo permitirá el cálculo de las velocidades de producción y aclaramiento de la proteína.

- 25 La medida del metabolismo de alfa-sinucleína puede proporcionar resultados para informar sobre las velocidades de síntesis y aclaramiento de alfa-sinucleína en estados normales y patológicos, así como un método para determinar directamente los efectos en humanos de tratamientos dirigidos a la síntesis y el aclaramiento de la alfa-sinucleína.

### Sumario de la invención

La invención es como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

- 35 En el presente documento se describen métodos mediante los cuales se aísla alfa-sinucleína de muestras biológicas mediante inmunoprecipitación usando un anticuerpo que reconoce la alfa-sinucleína. En esta realización, la proteína aislada se eluye del anticuerpo, por ejemplo, usando ácido fórmico y después se digiere con tripsina u otra proteasa. La incorporación de isótopos estables en péptidos alfa-sinucleína se analiza después en un espectrómetro de masas y se calcula una relación de alfa-sinucleína marcada a no marcada.

- 40 En una realización, se describe un método para determinar el pronóstico, diagnóstico o eficacia de un régimen terapéutico en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un isótopo detectable para detectar el nivel de alfa-sinucleína en la muestra.

- 45 En una realización, se describe un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína que comprende: (a) administración de un resto marcado a un sujeto sospechoso de tener una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína; (b) recolección de una muestra biológica del sujeto y una muestra normal correspondiente; (c) medida de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína sin marcar del sujeto y la muestra normal correspondiente; (d) determinación de la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína sin marcar del sujeto y la muestra normal correspondiente; (e) determinación del metabolismo de alfa-sinucleína a partir de las proporciones de la etapa (d); y (f) comparación del metabolismo de alfa-sinucleína del sujeto con el metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra normal correspondiente, en donde un cambio en el metabolismo de alfa-sinucleína del sujeto comparado con la muestra normal correspondiente es indicativo de un diagnóstico positivo de una enfermedad o trastorno relacionado con la alfa-sinucleína, que diagnostica una enfermedad o trastorno relacionado con la alfa-sinucleína.

En otra realización, se describe un método para determinar el pronóstico de una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína que comprende: (a) administración de un resto marcado a un sujeto sospechoso de tener una

- 5 enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína; (b) recolección de una muestra biológica del sujeto y una muestra normal correspondiente; (c) medida de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína sin marcar del sujeto y la muestra normal correspondiente; (d) determinación de la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína sin marcar del sujeto y la muestra normal correspondiente; (e) determinación del metabolismo de alfa-sinucleína a partir de las proporciones de la etapa (d); y (f) comparación del metabolismo de alfa-sinucleína del sujeto con el metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra normal correspondiente, en donde un cambio en el metabolismo de alfa-sinucleína del sujeto comparado con la muestra normal correspondiente es indicativo de una enfermedad o trastorno relacionado con la alfa-sinucleína, por lo que se pronostica una enfermedad o trastorno relacionado con la alfa-sinucleína.
- 10 En una realización adicional, se describe un método para determinar la eficacia de un régimen terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína que comprende: (a) administración de un resto marcado y un agente terapéutico a un sujeto sospechoso de tener una alfa-sinucleína relacionada con la sinucleína; (b) recolección de una muestra biológica del sujeto y una muestra normal correspondiente; (c) medida de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína sin marcar del sujeto y la muestra normal correspondiente; (d) determinación de la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína sin marcar del sujeto y la muestra normal correspondiente; y (e) determinación del metabolismo de alfa-sinucleína a partir de las proporciones de la etapa (d); (f) comparación del metabolismo de alfa-sinucleína del sujeto con el metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra normal correspondiente, en donde un cambio en el metabolismo de alfa-sinucleína del sujeto comparado con la muestra normal correspondiente es indicativo de la eficacia de un agente terapéutico régimen de un agente terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína, determinando así la eficacia de un régimen terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína.
- 15 En una realización, se describe un método in vivo para identificar un agente terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína que comprende: (a) administración de un resto marcado y un agente terapéutico a un sujeto sospechoso de tener una alfa-sinucleína relacionada con enfermedad o desorden; (b) recolección de una muestra biológica del sujeto y una muestra normal correspondiente; (c) medida de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína sin marcar del sujeto y la muestra normal correspondiente; (d) determinación de la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína sin marcar del sujeto y la muestra normal correspondiente; (e) determinación del metabolismo de alfa-sinucleína a partir de las proporciones de la etapa (d); y (f) comparación del metabolismo de alfa-sinucleína del sujeto con el metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra normal correspondiente, en donde un cambio en el metabolismo de alfa-sinucleína del sujeto comparado con la muestra normal correspondiente es indicativo de la identificación de un agente terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína, identificando así un agente terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína.
- 20 En una realización, se describe un método in vitro para identificar un agente terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína que comprende: (a) la administración de un resto marcado y un agente terapéutico a las células; (b) recolección de alfa-sinucleína de las células y una muestra normal correspondiente; (c) medida de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína sin marcar de las células y la muestra normal correspondiente; (d) determinación de la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína sin marcar de las células y la muestra normal correspondiente; (e) determinación del metabolismo de alfa-sinucleína a partir de las proporciones de la etapa (d); y (f) la comparación del metabolismo de alfa-sinucleína de las células con el metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra normal correspondiente, en donde un cambio en el metabolismo de alfa-sinucleína de las células comparado con la muestra normal correspondiente es indicativo de la identificación de un agente terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína, identificando así un agente terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína y una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína.
- 25 En una realización, se describe un método para predecir la respuesta del sujeto a un agente terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína que comprende: (a) administración de un resto marcado y un agente terapéutico a un sujeto sospechoso de tener una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína; (b) recolección de una muestra biológica del sujeto y una muestra normal correspondiente; (c) medida de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína sin marcar del sujeto y la muestra normal correspondiente; (d) determinación de la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína sin marcar del sujeto y la muestra normal correspondiente; (e) determinación del metabolismo de alfa-sinucleína a partir de las proporciones de la etapa (d); y (f) comparación del metabolismo de alfa-sinucleína del sujeto con el metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra normal correspondiente, en donde un cambio en el metabolismo de alfa-sinucleína del sujeto comparado con la muestra normal correspondiente es indicativo de la identificación de un agente terapéutico para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la alfa-sinucleína, diagnosticando así una enfermedad o trastorno relacionado con la alfa-sinucleína.
- 30 En un aspecto, el resto marcado es un aminoácido marcado. En un aspecto adicional, el aminoácido está marcado con un radioisótopo o un isótopo no radiomarcado. En un aspecto, el aminoácido se marca con un isótopo no radiomarcado. En un aspecto adicional, el isótopo no radiomarcado puede ser  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$  o  $^{18}\text{O}$  y  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  o  $^{36}\text{S}$ . En un aspecto adicional, el aminoácido puede ser leucina, isoleucina y fenilalanina. Además, el aminoácido marcado puede ser uno o más de leucina marcada con  $^{15}\text{N}_x$ , en donde  $x = 1-6$ ;  $^1\text{fenilalanina}$  marcada con  $^{13}\text{C}_x$ , en donde  $x = 1-9$  y isoleucina marcada con  $^{13}\text{C}_x$ , en donde  $x = 1-6$ . En un aspecto, el resto marcado es agua marcada. En un aspecto adicional, el agua marcada es agua deuterada ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ), agua oxígeno 18 ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) u otras moléculas similares. En un aspecto, la muestra biológica es un fluido corporal o una muestra de tejido. En un aspecto adicional, el fluido corporal
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

puede ser sangre, plasma, suero sanguíneo, fluido cefalorraquídeo (CSF), orina, saliva, transpiración y lágrimas. En un aspecto, el fluido corporal es CSF. En un aspecto adicional, la muestra de tejido es una muestra del SNC. En un aspecto adicional, la muestra del SNC puede ser tejido del sistema del SNC, tejido cerebral, tejido del cerebro anterior, tejido del cerebro intermedio, tejido del cerebro medio, tejido del cerebro posterior y tejido de la médula espinal.

5 En un aspecto, el agente terapéutico puede ser inhibidores de moléculas pequeñas de alfa-sinucleína, anticuerpos contra alfa-sinucleína, activadores de aclaramiento de alfa-sinucleína, inhibidores de sirtuina 2, inhibidores del proteosoma, inhibidores de moléculas pequeñas de polimerización de alfa-sinucleína, L-DOPA, inhibidores de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CEPT), inhibidores de metaloproteasa, inhibidores de colinesterasa, antagonistas de receptores NMDA, hormonas, agentes neuroprotectores e inhibidores de muerte celular. En un  
10 aspecto, el agente terapéutico es L-DOPA.

En una realización, se describe un kit para determinar el pronóstico, diagnóstico o eficacia de un régimen terapéutico en un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína. En un aspecto, el kit comprende uno o más restos marcados y un medio para administrar el uno o más restos a un sujeto. En un aspecto adicional, el kit comprende además un medio para obtener una muestra biológica e instrucciones para  
15 determinar la relación de alfa-sinucleína marcada a sin marcar.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de alfa-sinucleína (SEC ID NO: 1) que muestra los sitios de escisión tróptica.

20 La Figura 2 muestra una comparación de secuencias múltiples (SEC ID NOs: 1-3) que muestra diferencias en la secuencia de aminoácidos de alfa, beta y gamma-sinucleína.

La Figura 3 muestra péptidos trópticos que se originan a partir de alfa-sinucleína (SEC ID NOs: 4-13) observados en el espectrómetro de masas. Se han analizado alfa-sinucleína aislada de fuentes biológicas como líquido cefalorraquídeo, medios de cultivo de células condicionadas y lisados celulares, así como alfa-sinucleína recombinante.

25 La Figura 4 muestra el espectro de masas del péptido alfa-sinucleína 81-96 (SEC ID NO: 13). Contiene el aminoácido esencial fenilalanina (F). La presencia de una fenilalanina en el péptido tróptico 81-96 hace de este péptido un péptido que se puede usar para controlar el metabolismo de alfa-sinucleína mediante la administración de fenilalanina marcada con isótopos estables.

30 La Figura 5 muestra el espectro de masas del péptido alfa-sinucleína 33-43 (SEC ID NO: 6). Contiene aminoácido esencial leucina (L). La presencia de una leucina en el péptido tróptico 33-43 hace de este péptido un péptido que se puede usar para controlar el metabolismo de alfa-sinucleína mediante la administración de leucina marcada con isótopos estables.

35 La Figura 6 muestra el espectro de masas del péptido alfa-sinucleína 35-43 (SEC ID NO: 7). Contiene aminoácido esencial leucina (L). La presencia de una leucina en el péptido tróptico 35-43 hace de este péptido un péptido que se puede usar para controlar el metabolismo de alfa-sinucleína mediante la administración de leucina marcada con isótopos estables.

La Figura 7 muestra curvas estándar de alfa-sinucleína derivadas de muestras tomadas 3, 5 y 7 días después de la administración del resto marcado.

40 La Figura 8 muestra la intensidad relativa de iones alfa-sinucleína derivados de muestras tomadas 3, 5 y 7 días después de la administración del resto marcado.

La Figura 9 muestra la intensidad iónica relativa de alfa-sinucleína medida en muestras marcadas y no marcadas.

La Figura 10 muestra los niveles de proteína beta amiloide y alfa-sinucleína detectados mediante el ensayo SILK durante las 36 horas posteriores a la administración del resto marcado.

### 45 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento del marcaje con isótopos estables de biomoléculas conduce a pequeñas diferencias en el peso molecular de las biomoléculas, pero no altera las propiedades físicas o químicas de las biomoléculas. Utilizando las técnicas proporcionadas en el presente documento, el análisis de biomoléculas se puede usar para pronosticar a un sujeto que tiene o tiene riesgo de desarrollar un trastorno  
50 neurológico o neurodegenerativo, llamada, la enfermedad de Parkinson. Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos y kits útiles para medir el nivel de alfa-sinucleína en un sujeto.

La presente descripción también proporciona un método para evaluar si un agente terapéutico afecta la producción o la velocidad de aclaramiento de alfa-sinucleína en el sujeto. Por consiguiente, el método puede usarse para determinar

las dosis óptimas y/o los regímenes de dosificación óptimos del agente terapéutico. Además, el método puede usarse para determinar qué sujetos responden mejor a un agente terapéutico particular. Por ejemplo, los sujetos con mayor producción de alfa-sinucleína pueden responder mejor a un agente terapéutico, mientras que los sujetos con un aclaramiento reducido de alfa-sinucleína pueden responder mejor a otro agente terapéutico. Alternativamente, los sujetos con un genotipo particular pueden responder mejor a un agente terapéutico particular que aquellos con un genotipo diferente. Finalmente, al permitir la cuantificación específica de la isoforma, el método puede usarse para determinar si un agente terapéutico puede modular la producción de una alfa-sinucleína cambiando la producción de una isoforma a otra isoforma.

Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o pasos del tipo descrito en el presente documento que serán evidentes para los expertos en la materia al leer esta descripción, etc.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o en el ensayo de la invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier individuo o paciente al que se realizan los métodos del sujeto. En general, el sujeto es humano, aunque como apreciarán los expertos en la técnica, el sujeto puede ser un animal. Por lo tanto, otros animales, incluidos mamíferos como roedores (incluidos ratones, ratas, hámsters y cobayas), gatos, perros, conejos, animales de granja, como vacas, caballos, cabras, ovejas, cerdos, etc., y primates (incluidos monos, chimpancés, orangutanes y gorilas) están incluidos dentro de la definición de sujeto. Además, el término "sujeto" puede referirse a un cultivo de células, donde se realizan los métodos de la invención *in vitro* por ejemplo, evaluar la eficacia de un agente terapéutico.

Como se usa en el presente documento, los términos "muestra" y "muestra biológica" se refieren a cualquier muestra adecuada para los métodos proporcionados por la presente invención. Una muestra de células utilizadas en el presente método puede obtenerse a partir de muestras de tejido o líquido corporal de un sujeto, o tejido obtenido mediante un procedimiento de biopsia (*p.ej.*, una biopsia con aguja) o un procedimiento quirúrgico. En ciertas realizaciones, la muestra biológica de la presente invención es una muestra de fluido corporal, *p.ej.*, líquido cefalorraquídeo (CSF), sangre, plasma, orina, saliva y lágrimas.

El término "anticuerpo", como se usa en esta invención, pretende incluir moléculas intactas de anticuerpos policlonales o monoclonales, así como también fragmentos de los mismos, como Fab y F(ab')<sub>2</sub>, Fv y fragmentos de SCA que son capaces de unirse a un determinante epitópico. El término "se une específicamente" o "interactúa específicamente", cuando se usa en referencia a un anticuerpo significa que una interacción del anticuerpo y un epítopo particular tiene una constante de disociación de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  en general al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$ , en general al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$ , y en particular al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  o  $1 \times 10^{-10}$  o menos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "enfermedad o trastorno relacionado con alfa-sinucleína" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno en donde los niveles circulantes o la producción de alfa-sinucleína o metabolismo de alfa-sinucleína cambien de normal. Este cambio puede ser un aumento o disminución en los niveles de alfa-sinucleína o el metabolismo comparado con lo normal.

Como se describe en el presente documento, el isótopo estable de alfa-sinucleína marcado conduce a pequeñas diferencias en el peso molecular de la alfa-sinucleína, pero no altera las propiedades físicas o químicas generales de la alfa-sinucleína. Así, la alfa-sinucleína se unirá a los anticuerpos y se eluirá de una columna de cromatografía líquida de manera idéntica. Solo los instrumentos sensibles, como los espectrómetros de masas, proporcionan la capacidad de medir las pequeñas diferencias de peso entre la alfa-sinucleína marcada y la no marcada.

Se pueden usar varios restos diferentes para marcar alfa-sinucleína. En términos generales, los dos tipos de restos de marcaje utilizados en el método son isótopos radiactivos e isótopos no radiactivos (estables). En una realización, los isótopos no radiactivos pueden usarse y medirse mediante espectrometría de masas. Los isótopos estables preferidos incluyen deuterio (<sup>2</sup>H), <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>17</sup> o <sup>18</sup>O, y <sup>33</sup>, <sup>34</sup>, o <sup>36</sup>S, pero se reconoce que una cantidad de otros isótopos estables que cambian la masa de un átomo en más o menos neutrones de lo que se ve en la forma nativa prevalente también serían efectivos. Un marcador adecuado en general cambiará la masa de alfa-sinucleína de manera que se pueda detectar en un espectrómetro de masas. Alternativamente, se puede usar un isótopo radiactivo, y la alfa-sinucleína marcada se puede medir con un contador de centelleo (o mediante escintigrafía nuclear), así como con un espectrómetro de masas. Se pueden usar uno o más restos marcados simultáneamente o en secuencia.

Por lo tanto, en una realización, cuando el método se emplea para medir el metabolismo de alfa-sinucleína, el resto marcado normalmente será un aminoácido. Los expertos en la materia apreciarán que pueden usarse varios aminoácidos para proporcionar el marcador de alfa-sinucleína. En general, la elección del aminoácido se basa en una variedad de factores, tales como: (1) el aminoácido en general está presente en al menos un residuo de alfa-sinucleína. (2) El aminoácido en general puede alcanzar rápidamente el sitio de producción de proteínas y equilibrarse

rápidamente a través de la barrera hematoencefálica u otro tejido o barrera celular. (3) El marcador de aminoácidos en general no influye en el metabolismo de la proteína de interés (*p.ej.*, dosis muy grandes de leucina pueden afectar el metabolismo muscular). Y (4) la disponibilidad del aminoácido deseado (*es decir.*, algunos aminoácidos son mucho más caros o más difíciles de fabricar que otros).

- 5 En una realización, el aminoácido es un aminoácido esencial (no producido por el cuerpo), por lo que se puede lograr un mayor porcentaje de marcado. En otra realización, el aminoácido es un aminoácido no esencial. Los aminoácidos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, leucina, isoleucina y fenilalanina. Como tal, en una realización, el aminoácido marcado es uno o más de un Aminoácido marcado con  $^{15}\text{N}$ , una fenilalanina marcada con  $^{13}\text{C}_x$ , donde  $x = 1$  a 9, una isoleucina marcada con  $^{13}\text{C}_x$ , donde  $x = 1$  a 6. Por ejemplo,  $^{13}\text{C}_6$ -fenilalanina, que contiene seis  $^{13}\text{C}$  átomos de C, se pueden usar para marcar alfa-sinucleína. En otra realización,  $^{13}\text{C}_6$ -leucina se puede usar para marcar alfa-sinucleína.

10 Existen numerosas fuentes comerciales de aminoácidos marcados, tanto isótopos no radiactivos como isótopos radiactivos. En general, los aminoácidos marcados pueden producirse biológicamente o sintéticamente. Los aminoácidos producidos biológicamente pueden obtenerse de un organismo (*p.ej.*, algas/algas marinas) cultivadas en una mezcla enriquecida de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , u otro isótopo que se incorpora a los aminoácidos a medida que el organismo produce proteínas. Los aminoácidos se separan y se purifican. Alternativamente, los aminoácidos pueden prepararse con procesos químicos sintéticos conocidos.

15 En una realización, cuando el método se emplea para medir el metabolismo de alfa-sinucleína, el resto marcado normalmente se marcará con agua. En un aspecto el agua marcada es agua deuterada ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ). En otro aspecto, el agua marcada es agua oxígeno 18 ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ). En un aspecto adicional, el agua marcada es una molécula similar al agua deuterada o al agua oxígeno 18.

El resto marcado (*p.ej.*, aminoácido marcado) puede administrarse a un sujeto por varios métodos. Las vías de administración adecuadas incluyen la administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular u oral. En una realización, el resto marcado puede administrarse por infusión intravenosa. En otra realización, el resto marcado puede ingerirse por vía oral.

- 25 El resto marcado puede administrarse lentamente durante un período de tiempo, como una gran dosis única, dependiendo del tipo de análisis elegido (*p.ej.*, estado estacionario o bolo/persecución), o lentamente durante un período de tiempo después de una dosis inicial de bolo. Para lograr niveles de estado estacionario de la alfa-sinucleína marcada, el tiempo de marcado en general debe ser de una duración suficiente para que la alfa-sinucleína marcada pueda cuantificarse de manera fiable. En una realización, el resto marcado se administra como una dosis oral única.
- 30 En otra realización, el resto marcado se administra durante un período de tiempo que varía de aproximadamente una hora a aproximadamente 36 horas. En otra realización, el resto marcado se administra durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas. En otra realización más, el resto marcado se administra durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 12 horas. En otra realización más, el resto marcado se administra durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 9
- 35 horas a aproximadamente 24 horas. La velocidad de administración del resto marcado puede variar desde aproximadamente 0,5 mg/kg/h hasta aproximadamente 5 mg/kg/h. En una realización, la velocidad de administración de leucina marcada es desde aproximadamente 1 mg/kg/h hasta aproximadamente 3 mg/kg/h. En otra realización, la velocidad de administración de leucina marcada es de 1,8 mg/kg/h a aproximadamente 2,5 mg/kg/h. En otra realización, la leucina marcada puede administrarse como un bolo de entre aproximadamente 50 y aproximadamente
- 40 500 mg/kg de peso corporal del sujeto, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal del sujeto, o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal del sujeto. En otra realización más, la leucina marcada puede administrarse como un bolo de aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal del sujeto. En una realización alternativa, la leucina marcada puede administrarse por vía intravenosa como se detalla anteriormente después de un bolo inicial de entre aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/kg, entre
- 45 aproximadamente 1 a aproximadamente 4 mg/kg, o aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal de tema. En otra realización, el agua se administrará diariamente durante 1-7 días.

Los expertos en la técnica apreciarán que la cantidad (o dosis) del resto marcado puede variar y variará. En general, la cantidad depende de (y se estima por) los siguientes factores: (1) El tipo de análisis deseado. Por ejemplo, para lograr un estado estacionario de aproximadamente 15% de leucina marcada en plasma se requieren aproximadamente

50 2 mg/kg/h durante aproximadamente 9 horas después de un bolo inicial de 3 mg/kg durante 10 min. Por el contrario, si no se requiere un estado estacionario, un gran bolo del resto marcado (*p.ej.*, 1 o 5 gramos de leucina marcada) pueden administrarse inicialmente. (2) La velocidad de metabolismo de la alfa-sinucleína. Por ejemplo, si la alfa-sinucleína se produce rápidamente, es posible que se necesite menos tiempo de marcaje y que se necesite menos marcaje, tal vez tan poco como 0,5 mg/kg durante 1 hora. Sin embargo, la mayoría de las proteínas tienen una vida

55 media de horas a días y, por lo tanto, es más probable que se pueda usar una infusión continua durante 9, 12 o 24 horas a una dosis de 0,5 mg/kg a 4 mg/kg. Y (3) la sensibilidad de detección del marcador. Por ejemplo, a medida que aumenta la sensibilidad de la detección de marcadores, la cantidad de marcadores necesaria puede disminuir.

Debe entenderse que puede usarse más de un resto marcado en un solo sujeto. Esto permitiría el etiquetado múltiple de alfa-sinucleína y podría proporcionar información sobre la producción o aclaramientode alfa-sinucleína en diferentes

60 momentos. Por ejemplo, puede realizar un primer marcado al sujeto durante un período de tiempo inicial, seguido de

un agente farmacológico (medicamento), y después puede administrarse un segundo marcador. En general, el análisis de las muestras obtenidas del sujeto proporcionaría una medida del metabolismo de la alfa-sinucleína antes y después de la administración del fármaco, midiendo directamente el efecto farmacodinámico del fármaco en el mismo sujeto. Alternativamente, se pueden usar múltiples marcadores al mismo tiempo para aumentar el marcado de alfa-sinucleína.

5 Los métodos proporcionan que se obtenga una muestra del sujeto de manera que pueda determinarse el metabolismo de la alfa-sinucleína. En una realización, la muestra es un fluido corporal. Los líquidos corporales adecuados incluyen, entre otros, líquido cefalorraquídeo (CSF), plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, saliva, transpiración y lágrimas. En otra realización, la muestra es una muestra de tejido, tal como una muestra de tejido del sistema nervioso central (SNC). La muestra en general se recolectará usando procedimientos estándar bien conocidos por los expertos en la técnica.

10 En una realización, la muestra es una muestra del SNC, que incluye, pero no se limita a, tejido del sistema nervioso central, que comprende tejido cerebral y tejido de la médula espinal. En una realización, la muestra del SNC puede tomarse de tejido cerebral, que incluye, pero no limita a, el tejido del cerebro anterior (*p.ej.*, corteza cerebral, ganglios basales, hipocampo), el cerebro intermedio (*p.ej.*, tálamo, hipotálamo, subtálamo), el cerebro medio (*p.ej.*, tectum, tegmentum), o el cerebro posterior (*p.ej.*, pons, cerebelo, médula oblongata). En otra realización, la muestra del SNC se puede recoger del tejido de la médula espinal. En otras realizaciones más, se pueden tomar muestras del SNC de más de una región del SNC. Por consiguiente, el metabolismo de la alfa-sinucleína se puede medir en diferentes muestras del SNC, por ejemplo, en la corteza y el hipocampo, simultáneamente.

15 Las muestras del SNC pueden obtenerse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, el tejido cerebral o el tejido de la médula espinal puede obtenerse mediante disección o resección. Alternativamente, las muestras del SNC pueden obtenerse mediante microdisección con láser.

20 En una realización, la muestra se obtiene del sujeto en un solo punto de tiempo predeterminado, por ejemplo, dentro de una hora de marcado. En general, para proteínas con metabolismo rápido, las muestras obtenidas durante las primeras 12 a 18 horas después del inicio de la administración del resto marcado se pueden usar para determinar la velocidad de producción de alfa-sinucleína, y muestras tomadas durante las 24 a 36 horas posteriores al inicio de la administración del resto marcado se pueden usar para determinar la velocidad de aclaramiento de alfa-sinucleína. En general, para proteínas con metabolismo lento, las muestras obtenidas durante los primeros 1-4 días después del inicio de la administración del resto marcado se pueden usar para determinar la velocidad de producción de alfa-sinucleína, y las muestras tomadas durante 4-14 días después del inicio de la administración del resto marcado se pueden usar para determinar la velocidad de aclaramiento de alfa-sinucleína. En otra realización, la muestra se obtiene del sujeto cada hora de 0 a 12 horas, de 0 a 24 horas, o de 0 a 36 horas. En otra realización más, se pueden tomar muestras de una hora a días o incluso semanas de diferencia, dependiendo de las velocidades de producción y aclaramiento de alfa-sinucleína.

25 Aquellos expertos en la técnica apreciarán que el resto marcado debe administrarse de manera oportuna, lo que permitirá la observación de la incorporación del resto marcado en alfa-sinucleína. El marcado de alfa-sinucleína se llevará a cabo a medida que la proteína se sintetice dentro de la célula. Pero la incorporación del marcador en la alfa-sinucleína solo se mide una vez que la proteína ha salido de la célula y ha entrado en el líquido cefalorraquídeo o en el torrente sanguíneo. Si la proteína experimenta un procesamiento complejo para salir de la célula, el tiempo desde la síntesis hasta la aparición en el fluido corporal podría ser significativo. Por lo tanto, si tarda 24-48 horas para que aparezca la alfa-sinucleína en el CSF, la administración del marcador puede ocurrir entre 24 y 48 horas antes del inicio del muestreo del CSF. Alternativamente, si se tarda 48-72 horas para que aparezca alfa-sinucleína en el CSF, la administración del marcador puede tener lugar entre 48 y 72 horas antes del inicio del muestreo del CSF. Además, si la alfa-sinucleína tarda de 3 días a una semana en aparecer en el CSF, es posible que la administración del marcador tenga que realizarse de 3 días a una semana antes del inicio del muestreo del CSF.

30 Debe entenderse que si se desean muestras en diferentes puntos de tiempo, se puede usar más de un sujeto. Por ejemplo, un sujeto puede usarse para una muestra de referencia, otro sujeto para un punto de tiempo de una hora después de la administración del resto marcado, otro sujeto para un punto de tiempo seis horas después de la administración del resto marcado.

35 En consecuencia, la presente descripción proporciona que la detección de la cantidad de alfa-sinucleína marcada y la cantidad de alfa-sinucleína no marcada en la muestra se puede usar para determinar la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína no marcada, que a su vez, puede ser utilizado para estimar las velocidades de producción y aclaramiento de alfa-sinucleína en el sujeto. Los medios ilustrativos para detectar diferencias en la masa entre la alfa-sinucleína marcada y no marcada incluyen, entre otros, espectrometría de masas con cromatografía líquida, espectrometría de masas con cromatografía de gases, espectrometría de masas MALDI-TOF y espectrometría de masas en tándem.

40 Sin embargo antes de detectar la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína no marcada, puede ser conveniente aislar y/o separar la alfa-sinucleína de otras biomoléculas en la muestra. Por lo tanto, en una realización, la inmunoprecipitación puede usarse para aislar y purificar la alfa-sinucleína antes de que se analice. En otra realización, la alfa-sinucleína puede aislarse o purificarse mediante cromatografía de afinidad o cromatografía de inmutafinidad. Alternativamente, los espectrómetros de masas que tienen configuraciones de cromatografía pueden

usarse para separar biomoléculas sin inmunoprecipitación, y después la alfa-sinucleína puede medirse directamente. En una realización ilustrativo, la alfa-sinucleína puede inmunoprecipitarse y después analizarse mediante un sistema de cromatografía líquida interconectado con una unidad de MS en tándem equipada con una fuente de ionización por electrospray (LC-ESI- MS tandem).

5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona que el metabolismo de múltiples biomoléculas en la misma muestra puede medirse simultáneamente. Es decir, tanto la cantidad de biomolécula marcada como no marcada se pueden detectar y medir por separado o al mismo tiempo para múltiples biomoléculas. Como tal, la presente descripción proporciona un método útil para detectar cambios en la producción y aclaramiento de una o más biomoléculas a gran escala (*es decir.*, proteómica/metabolómica) y proporciona un medio sensible para detectar y  
10 medir biomoléculas involucradas en la fisiopatología subyacente. En un aspecto, la presente descripción también proporciona un medio para medir múltiples tipos de biomoléculas. En este contexto, por ejemplo, una proteína y un lípido pueden medirse de forma simultánea o secuencial. Por ejemplo, tanto alfa-sinucleína como A $\beta$  podrían aislarse de una muestra de CSF y la producción y el aclaramiento de las dos proteínas individuales podrían determinarse en el mismo sujeto.

15 Una vez que la cantidad de alfa-sinucleína marcada y no marcada se haya detectado en una muestra, la relación o el porcentaje de alfa-sinucleína marcada con respecto a la alfa-sinucleína no marcada puede determinarse dividiendo la cantidad de alfa-sinucleína marcada con la cantidad de alfa-sinucleína sin marcar. Si se usa un espectrómetro de masas para la detección de alfa-sinucleína, la relación se calcularía dividiendo la intensidad de iones de alfa-sinucleína marcada con la intensidad de iones de la alfa-sinucleína sin marcar.

20 La presente descripción permite la medida de la proteína marcada y no marcada al mismo tiempo, de modo que se puede hacer la relación de proteína marcada a no marcada, así como otros cálculos. Como las medidas de las relaciones de marcaje se combinan en diferentes tiempos de muestreo después de la infusión del isótopo estable, los datos pueden combinarse para formar un perfil metabólico. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con los modelos cinéticos de primer orden de marcado que pueden usarse con el método de la presente descripción. Por  
25 ejemplo, se puede calcular la velocidad de síntesis fraccional (por sus siglas en inglés, FSR). El FSR es igual a la velocidad inicial de aumento de la proteína marcada a no marcada dividida por el enriquecimiento del precursor. Asimismo, se puede calcular la velocidad de aclaramiento fraccional (por sus siglas en inglés, FCR). Además, otros parámetros, como la velocidad de rotación fraccional (por sus siglas en inglés, FTR), el tiempo de demora y el estado estacionario del trazador isotópico, pueden determinarse y usarse como medidas del metabolismo y la fisiología de la  
30 proteína. Además, se puede realizar un modelado en los datos para ajustar modelos de múltiples compartimentos para estimar la transferencia entre compartimentos. Por supuesto, el tipo de modelado matemático elegido dependerá de los parámetros individuales de síntesis y aclaramiento (*p.ej.*, una agrupación, agrupaciones múltiples, estado estacionario, estado no estacionario, modelado compartimental, etc.). Como se usa en presente documento, "estado estacionario" se refiere a un estado durante el cual hay un cambio insignificante en el parámetro medido durante un  
35 período de tiempo específico.

Se ha demostrado que la metodología del marcaje cinético de isótopos estables (SILK) detecta la incorporación metabólica de isótopos (no radiactivos) estables en proteínas recién sintetizadas en el líquido cefalorraquídeo de un sujeto vivo. Para información detallada sobre SILK, ver Pub. EE.UU. N $^{\circ}$ s. 2008/0145941 y 2009/0142766, y PCT Internacional Pub. No. WO 2006/107814). SILK permite medir las velocidades de producción y aclaramiento de  
40 proteínas en el sistema nervioso central. Hasta ahora, esta metodología se ha aplicado para medir la producción y el aclaramiento de la proteína beta amiloide (A $\beta$ ) implicada en la enfermedad de Alzheimer (EA).

Sin embargo, hasta ahora, la versión actual del ensayo SILK mide solo el metabolismo de A $\beta$ . En los datos que se muestran en el presente documento, se muestra que el método SILK también se puede aplicar a la alfa-sinucleína. Este ensayo es distinto en el uso de un anticuerpo que se une específicamente a la alfa-sinucleína para el aislamiento  
45 de la alfa-sinucleína del fluido biológico y en la selección de péptidos específicos de la alfa-sinucleína para controlar la incorporación de isótopos estables en la alfa-sinucleína.

Por consiguiente, la producción de proteínas se basa habitualmente en la velocidad de aumento de la relación de proteínas marcadas/no marcadas con el tiempo (*es decir.*, la pendiente, la curva de ajuste exponencial o un ajuste de modelo compartimental definen la velocidad de producción de proteínas). Para estos cálculos, en general se requiere  
50 un mínimo de una muestra (se podría estimar el marcador de referencia), se prefieren dos y se prefieren las múltiples muestras para calcular una curva precisa de la captación del marcador en la proteína (*es decir.*, la velocidad de producción). Si se usan o prefieren múltiples muestras, no es necesario que las muestras se tomen del mismo tema. Por ejemplo, las proteínas se pueden marcar en cinco sujetos diferentes en el punto cero del tiempo, y después tomar una sola muestra de cada sujeto en un punto de tiempo diferente después del marcado.

55 A la inversa, una vez que finaliza la administración del aminoácido marcado, la velocidad de disminución de la relación de la proteína marcada a la no marcada refleja habitualmente la velocidad de aclaramiento de esa proteína. Para estos cálculos, en general se requiere un mínimo de una muestra (podría estimarse el marcador de referencia), se prefieren dos y se prefieren las múltiples muestras para calcular una curva precisa de la disminución del marcador de la proteína a lo largo del tiempo (*es decir.*, la velocidad de liquidación). Si se usan o prefieren múltiples muestras, no es necesario que las muestras se tomen del mismo tema. Por ejemplo, las proteínas se pueden marcar en cinco sujetos diferentes  
60



en el punto cero del tiempo, y después tomar una sola muestra de cada sujeto en un punto de tiempo diferente después del marcado. La cantidad de proteína marcada en una muestra del SNC en un momento dado refleja la velocidad de producción o la velocidad de aclaramiento (*es decir.*, aclaramiento o destrucción) y en general se expresa como porcentaje por hora o la masa/tiempo (*p.ej.*, mg/h) de la proteína en el sujeto.

- 5 Los métodos de la presente descripción se pueden usar para diagnosticar o monitorear la progresión de una enfermedad neurológica o neurodegenerativa mediante la medida *in vivo* del metabolismo de alfa-sinucleína en un sujeto. Además, los métodos pueden usarse para monitorear el tratamiento de una enfermedad neurológica o neurodegenerativa mediante la medida *in vivo* del metabolismo de alfa-sinucleína en un sujeto. El metabolismo de la alfa-sinucleína puede estar vinculado a una enfermedad neurológica o neurodegenerativa, de manera que cualquier
- 10 aumento o disminución puede ser indicativo de la presencia o progresión de la enfermedad. Por lo tanto, el metabolismo de la alfa-sinucleína puede compararse con el metabolismo de la alfa-sinucleína en una muestra normal correspondiente, con el metabolismo de la alfa-sinucleína en un sujeto con un estado de enfermedad neurológica o neurodegenerativa conocida, con el metabolismo de la alfa-sinucleína el mismo sujeto determinado en un tiempo anterior, o cualquier combinación de los mismos.
- 15 Además, tales métodos pueden ayudar a identificar a un individuo que tiene una predisposición para el desarrollo de la enfermedad, o pueden proporcionar un medio para detectar la enfermedad antes de la aparición de síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir que los profesionales de la salud empleen medidas preventivas o un tratamiento agresivo antes, lo que evita el desarrollo o la progresión de la enfermedad.

20 Como se usa en presente documento, una "muestra normal correspondiente" se refiere a una muestra del mismo órgano y/o del mismo tipo que la muestra que se examina. En un aspecto, la muestra normal correspondiente comprende una muestra de células obtenidas de un individuo sano. Dicha muestra normal correspondiente puede, pero no es necesario, de un individuo de la misma edad y/o del mismo sexo que el individuo que proporciona la muestra que se está examinando. En otro aspecto, la muestra normal correspondiente comprende una muestra de células obtenidas de una parte del tejido del sujeto, por lo demás sano, del cual se obtiene la muestra que se está analizando.

25 Con referencia al metabolismo de alfa-sinucleína en un sujeto con un estado de enfermedad neurológica o neurodegenerativa conocida incluye un metabolismo predeterminado de alfa-sinucleína unido a una enfermedad neurológica o neurodegenerativa. Por lo tanto, el metabolismo puede compararse con un metabolismo conocido de alfa-sinucleína obtenido de una muestra de un solo individuo o puede ser de una línea celular establecida del mismo tipo que la del sujeto. En un aspecto, la línea celular establecida puede ser una de un panel de tales líneas celulares,

30 en donde el panel puede incluir diferentes líneas celulares del mismo tipo de enfermedad y/o diferentes líneas celulares de diferentes enfermedades asociadas con alfa-sinucleína. Dicho panel de líneas celulares puede ser útil, por ejemplo, para practicar el presente método cuando solo puede obtenerse un pequeño número de células del sujeto a tratar, proporcionando así una muestra sustituta de las células del sujeto, y también puede ser útil incluir como control las muestras en la práctica de los métodos actuales.

35 Las enfermedades neurológicas o neurodegenerativas ilustrativos que pueden estar relacionadas con el metabolismo de alfa-sinucleína incluyen, entre otras pero no limitan a, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, los accidentes cerebrovasculares, las demencias frontotemporales (FTD), los trastornos relacionados con el envejecimiento y las demencias, la enfermedad corporal de Lewy, Lesión cerebral traumática (por sus siglas en inglés, TBI ) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig). También se prevé que el método de la

40 invención pueda usarse para estudiar la fisiología normal, el metabolismo y la función del SNC.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para evaluar si un agente terapéutico usado para tratar una enfermedad neurológica o neurodegenerativa afecta el metabolismo de alfa-sinucleína en el sujeto. Por ejemplo, el metabolismo de la alfa-sinucleína se puede medir para determinar si un agente terapéutico dado produce un aumento, o una disminución en la producción o aclaramiento de la alfa-sinucleína. En una realización, el método

45 se realiza *in vivo*, como se describe en el presente documento. En otra realización, el método se realiza *in vitro* utilizando un cultivo de células, donde el cultivo de células es el "sujeto" en los métodos descritos en el presente documento. Por consiguiente, el uso de los métodos proporcionados en el presente documento permitirá a los expertos en la técnica determinar con precisión el grado de cambio en el metabolismo de la alfa-sinucleína, y correlacionar estas medidas con el resultado clínico del tratamiento modificador de la enfermedad. Los resultados de este aspecto

50 de la presente descripción, por lo tanto, pueden ayudar a determinar las dosis óptimas y la frecuencia de las dosis de un agente terapéutico, pueden ayudar en la toma de decisiones con respecto al diseño de ensayos clínicos y, en última instancia, pueden acelerar la validación de agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de enfermedades neurológicas o neurodegenerativas.

Por lo tanto, el método de la presente descripción puede usarse para predecir qué sujetos responderán a un agente terapéutico particular. Por ejemplo, los sujetos con metabolismo aumentado de alfa-sinucleína pueden responder a un agente terapéutico particular de manera diferente que los sujetos con metabolismo disminuido de alfa-sinucleína. En particular, los resultados del método pueden utilizarse para seleccionar el tratamiento apropiado (*p.ej.*, un agente que bloquea la producción de alfa-sinucleína o un agente que aumenta el aclaramiento de alfa-sinucleína) para un sujeto en particular. De manera similar, los resultados del método pueden usarse para seleccionar el tratamiento apropiado

60 para un sujeto que tiene un genotipo particular.

El método para predecir qué sujetos responderán a un agente terapéutico particular incluye administrar un agente terapéutico y un resto marcado al sujeto, en donde el resto marcado se incorpora a alfa-sinucleína a medida que se produce en el sujeto. En una realización, el agente terapéutico puede administrarse al sujeto antes de la administración del resto marcado. En otra realización, el resto marcado puede administrarse al sujeto antes de la administración del agente terapéutico. El período de tiempo entre la administración de cada uno puede ser de varios minutos, una hora, varias horas o muchas horas. En otra realización más, el agente terapéutico y el resto marcado pueden administrarse simultáneamente. El método incluye además recolectar al menos una muestra biológica, que incluye alfa-sinucleína marcada y no marcada, determinar una relación de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína no marcada en la muestra, y calcular el metabolismo de la alfa-sinucleína en el sujeto. Posteriormente, una comparación del metabolismo calculado con un valor de control determinará si el agente terapéutico altera el metabolismo (*p.ej.*, alterando la velocidad de producción o la velocidad de aclaramiento) de alfa-sinucleína en el sujeto.

Los expertos en la técnica apreciarán que el agente terapéutico puede variar y dependerá de la enfermedad o trastorno neurológico o neurodegenerativo a tratar. Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos adecuados incluyen inhibidores de moléculas pequeñas de la producción de alfa-sinucleína, anticuerpos humanizados contra la alfa-sinucleína, activadores de aclaramiento del SNC de la alfa-sinucleína, inhibidores de sirtuina 2, inhibidores del proteosoma, inhibidores de moléculas pequeñas de la polimerización de alfa-sinucleína.

Otros agentes terapéuticos de la EA adecuados incluyen inhibidores de la proteína de transferencia de colesterilester (CETP), inhibidores de la metaloproteasa, inhibidores de la colinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, hormonas, agentes neuroprotectores, inhibidores de la producción de A $\beta$ , tales como inhibidores y moduladores de las secretasas gamma y beta, anticuerpos anti-ap, anticuerpos tau, e inhibidores de la muerte celular. Muchos de los agentes terapéuticos mencionados anteriormente también pueden afectar al metabolismo *in vivo* de otras proteínas implicadas en trastornos neurodegenerativos.

El agente terapéutico puede administrarse al sujeto de acuerdo con métodos conocidos. Habitualmente, el agente terapéutico se administrará por vía oral, pero también se pueden usar otras vías de administración tales como parenteral o tópica. La cantidad de agente terapéutico que se administra al sujeto puede y variará dependiendo del tipo de agente, el sujeto y el modo particular de administración. Los expertos en la materia apreciarán que las dosis pueden determinarse con la orientación de Goodman & Goldman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Décima edición (2001), Apéndice II, páginas 475-493, y el *Physicians' Desk Reference*.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un kit para realizar los métodos descritos en presente documento. En una realización, se proporciona un kit para diagnosticar y/o controlar la progresión o el tratamiento de una enfermedad neurológica o neurodegenerativa en un sujeto. El kit incluye uno o más restos marcados (*p.ej.*, aminoácidos marcados) y un medio para administrar uno o más aminoácidos al sujeto. El kit puede incluir además un medio para obtener una muestra biológica a intervalos regulares de tiempo del sujeto. En ciertas realizaciones, el kit también incluirá instrucciones para detectar y determinar la relación de alfa-sinucleína marcada y sin marcar a lo largo del tiempo y para calcular el metabolismo de la alfa-sinucleína. En una realización, las instrucciones divulgarán métodos para comparar la concentración calculada con ciertos estándares y/o controles como se describe en presente documento.

En otra realización, el kit de la presente descripción proporciona un vehículo compartimentado que incluye uno o más recipientes que contienen el resto marcado y los diversos medios para realizar los métodos de la invención.

En esta realización, se demuestra la viabilidad de un ensayo de alfa-sinucleína de cinética de marcaje de isótopos estables (SILK). La Figura 1 muestra los sitios de escisión tríptica en la secuencia alfa-sinucleína y, por lo tanto, una lista de posibles péptidos trípticos que se originan a partir de alfa-sinucleína. Pueden usarse otras proteasas en lugar de tripsina y producirán diferentes patrones de escisión y diferentes péptidos. Cuando se digiere alfa-sinucleína recombinante o alfa-sinucleína aislada de fuentes biológicas, se observa varios péptidos trípticos que se originan a partir de la alfa-sinucleína. La Figura 3 muestra una lista de péptidos que ha observado a partir de alfa-sinucleína recombinante o de alfa-sinucleína que se ha aislado de CSF u otras fuentes biológicas.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar con más detalle las ventajas y características de la presente descripción, pero no pretenden limitar el alcance de la invención. Si bien son habituales de los que podrían usarse, alternativamente se pueden usar otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

### Ejemplos

50 Ejemplo 1: Medida de incorporación de leucina  $^{13}\text{C}_6$  en alfa-sinucleína producida por células

Las células de cultivo de tejidos (SH-SY5Y) se transfectaron de forma estable con un constructo que conduce a la sobreexpresión de alfa-sinucleína. Las células se cultivaron en medios que contienen relaciones conocidas de leucina marcada con  $^{13}\text{C}_6$  a  $^{12}\text{C}_6$  (relación trazadora/traza; TTR) (TTR = 0.00, 0.0127, 0.0256, 0.0526, 0.111, 0.25). Los medios se recolectaron después de 3, 5 y 7 días de crecimiento en los medios marcados. La alfa-sinucleína se aisló a partir de muestras de medios mediante inmunoprecipitación utilizando C2N-ASMAB3. Las proteínas aisladas se digirieron con tripsina y se analizaron en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ-Vantage para monitorear el péptido alfa-sinucleína 35-43 marcado y no marcado. Se calculó la relación de alfa-sinucleína marcada a no marcada para cada muestra. La concentración aproximada de alfa-sinucleína medida por la intensidad de la alfa-sinucleína

marcada y no marcada aumentó de la colección inicial a las colecciones subsiguientes a medida que las células se volvieron más confluentes. Además, la relación de alfa-sinucleína marcada y no marcada coincidía más con las concentraciones esperadas a medida que las células giraban sobre la alfa-sinucleína originalmente sin marcar y producían una nueva alfa-sinucleína utilizando la mezcla de aminoácidos marcados y no marcados.

5 Ejemplo 2: Medida de incorporación de leucina <sup>13</sup>C<sub>6</sub> en alfa-sinucleína producida por seres humanos

A un voluntario humano se le administró leucina <sup>13</sup>C<sub>6</sub> durante 9 horas y se tomaron muestras de CSF cada hora durante 36 horas a partir de la infusión de leucina. Alfa-sinucleína se aisló de las muestras de CSF, así como de muestras de la curva estándar de alfa sinucleína de leucina <sup>13</sup>C<sub>6</sub> por inmunoprecipitación y digestión con tripsina. Incorporación de <sup>13</sup>C<sub>6</sub> Se analizó la leucina en el péptido 35-43 para cada muestra mediante un espectrómetro de masas.

10 **Listado de secuencias**

<110> C2N DIAGNOSTICS WEST, Tim PAOLETTI, Andrew C.

15 <120> MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS Y NEURODEGENERATIVAS, TRASTORNOS Y PROCESOS ASOCIADOS

<130> C2N11110-2WO

<150> US 61/536,300

20 <151> 2011-09-19

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

25 <211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

30

ES 2 711 876 T3

<210> 2  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

```

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val
 1          5          10          15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
 20          25          30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val
 35          40          45

Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser
 50          55          60

His Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala
 65          70          75          80

Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu
 85          90          95

Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met
 100         105         110

Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln
 115         120         125

Glu Tyr Glu Pro Glu Ala
 130
  
```

<210> 3  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 3

```

Met Asp Val Phe Lys Lys Gly Phe Ser Ile Ala Lys Glu Gly Val Val
 1          5          10          15

Gly Ala Val Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
 20          25          30

Thr Lys Glu Gly Val Met Tyr Val Gly Ala Lys Thr Lys Glu Asn Val
 35          40          45

Val Gln Ser Val Thr Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Asn
 50          55          60
  
```

ES 2 711 876 T3

Ala Val Ser Glu Ala Val Val Ser Ser Val Asn Thr Val Ala Thr Lys  
 65 70 75 80

Thr Val Glu Glu Ala Glu Asn Ile Ala Val Thr Ser Gly Val Val Arg  
 85 90 95

Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Val Ala Ser  
 100 105 110

Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp  
 115 120 125

5 <210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Lys Glu Gly Val Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys  
 1 5 10

10 <210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 5

Ala Lys Glu Gly Val Val Ala Ala Ala Glu Lys  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys  
 1 5 10

25 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys  
 1 5

30 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 8

Thr Lys Glu Gly Val Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys  
 1 5 10 15

40 <210> 9  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Gly Val Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys  
 1 5 10

45 <210> 10  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10

ES 2 711 876 T3

Thr Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val  
 1 5 10 15

Thr Ala Val Ala Gln Lys  
 20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala  
 1 5 10 15

Val Ala Gln Lys  
 20

<210> 12

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys  
 1 5 10 15

Lys

15 <210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 13

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys  
 1 5 10 15

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para medir el nivel de alfa-sinucleína *in vitro* que comprende:  
poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un isótopo detectable;  
medir el nivel de alfa-sinucleína marcada en una muestra; y
- 5      comparar el nivel de alfa-sinucleína marcada en la muestra con una muestra normal correspondiente;  
en donde se determina que un cambio en el nivel de sinucleína alfa de la muestra comparado con la muestra normal correspondiente para pronosticar la enfermedad neurológica o neurodegenerativa, y/o identifica la eficacia de un régimen terapéutico; y  
en donde la enfermedad neurológica o neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson.
- 10     2. Un método para medir los niveles de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína no marcada *in vitro* que comprende:  
(a) medida de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína no marcada de una muestra biológica de un sujeto que ha sido administrado con un resto marcado y de la muestra normal correspondiente;  
(b) determinación de la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína no marcada a partir de la muestra y la muestra normal correspondiente;
- 15     (c) determinación del metabolismo de alfa-sinucleína a partir de las proporciones de la etapa (b); y  
(d) comparación del metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra con el metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra normal correspondiente,  
en donde el marcador es un isótopo detectable;  
en donde se determina un cambio en el metabolismo de la alfa sinucleína de la muestra comparado con la muestra normal correspondiente para pronosticar la enfermedad neurológica o neurodegenerativa y/o predecir la respuesta del sujeto a un agente terapéutico; y  
en donde la enfermedad neurológica o neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson.
- 20     3. Un método para medir los niveles de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína no marcada. *in vitro* que comprende:  
(a) medida de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína no marcada a partir de una muestra biológica de un sujeto administrado con el resto marcado y un agente terapéutico y la muestra normal correspondiente;
- 25     (b) determinación de la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína no marcada a partir de la muestra y la muestra normal correspondiente;  
(c) determinación del metabolismo de alfa-sinucleína a partir de las proporciones de la etapa (b); y  
(d) comparación del metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra con el metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra normal correspondiente;
- 30     en donde el marcador es un isótopo detectable;  
en donde se determina un cambio en el metabolismo de la alfa sinucleína de la muestra comparado con el nivel en la muestra normal para identificar la eficacia de un régimen terapéutico; y  
en donde la enfermedad neurológica o neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson.
- 35     4. Un método para identificar un agente terapéutico para tratar una enfermedad neurológica o neurodegenerativa, en donde el método comprende:  
(a) proporcionar una muestra biológica de un sujeto administrado con un resto marcado y un agente terapéutico y una muestra normal correspondiente;
- 40     (b) medida de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína sin marcar en la muestra biológica del sujeto y la muestra normal correspondiente;  
(c) determinación de la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína no marcada de la muestra y la muestra normal correspondiente;  
(d) determinación del metabolismo de alfa-sinucleína a partir de las proporciones de la etapa (c);

(e) comparación del metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra con el metabolismo de alfa-sinucleína de la muestra normal correspondiente;

en donde el marcador es un isótopo detectable;

5 en donde la enfermedad neurológica o neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson; y en donde un cambio en el metabolismo de la alfa sinucleína de la muestra comparado con la muestra normal correspondiente indica si

el agente terapéutico es eficaz para tratar la enfermedad neurológica o neurodegenerativa, identificando así un agente terapéutico para tratar la enfermedad neurológica o neurodegenerativa.

5. Un método *in vitro* para identificar un agente terapéutico para tratar una enfermedad neurológica o neurodegenerativa que comprende:

10 (a) administración de un resto marcado y un agente terapéutico a las células *in vitro*

(b) colección de alfa-sinucleína de las células y una muestra normal correspondiente *in vitro*

(c) medida de alfa-sinucleína marcada y alfa-sinucleína sin marcar de las células y la muestra normal correspondiente;

15 (d) determinación de la relación de alfa-sinucleína marcada a alfa-sinucleína sin marcar de las células y la muestra normal correspondiente;

(e) determinación del metabolismo de alfa-sinucleína a partir de las proporciones de la etapa (d); y

(f) comparación del metabolismo de la alfa-sinucleína de las células con el metabolismo de la alfa-sinucleína de la muestra normal correspondiente;

en donde el marcador es un isótopo detectable;

20 en donde la enfermedad neurológica o neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson; y en donde un cambio en el metabolismo de la alfa sinucleína de la muestra comparado con la muestra normal correspondiente indica si

el agente terapéutico es eficaz para tratar la enfermedad neurológica o neurodegenerativa por lo que se identifica un agente terapéutico para tratar la enfermedad neurológica o neurodegenerativa.

6. El método de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el resto marcado es un aminoácido marcado o agua marcada.

25 7. El método de la reivindicación 6, en donde el aminoácido está marcado con un radioisótopo o un isótopo no marcado con radio.

8. El método de la reivindicación 7, en donde el aminoácido está marcado con un isótopo no radiomarcado.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el isótopo no radiomarcado se selecciona del grupo que consiste en:  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$  o  $^{18}\text{O}$  y  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  o  $^{36}\text{S}$ .

30 10. El método de la reivindicación 6, en donde el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en leucina, isoleucina y fenilalanina.

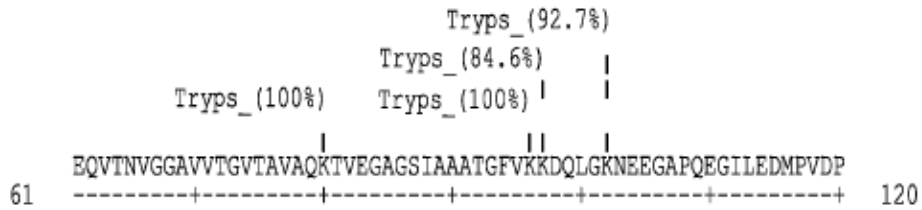
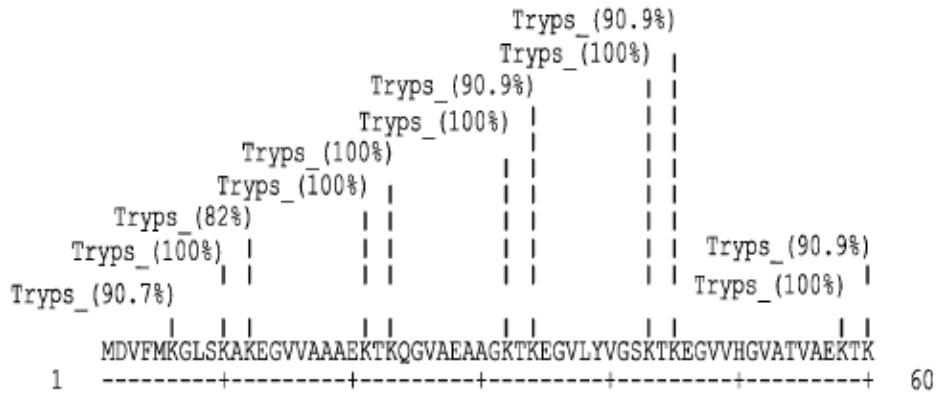
11. El método de las reivindicaciones 2-5, en donde el resto marcado es un agua marcada.

12. El método de las reivindicaciones 2-5, en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en: un fluido corporal o una muestra de tejido.

35 13. El método de las reivindicaciones 3-5, en donde en el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: inhibidores de molécula pequeña de alfa-sinucleína, anticuerpos contra alfa-sinucleína, activadores de aclaramiento de alfa-sinucleína, inhibidores de sirtuina 2, inhibidores de proteosoma, inhibidores de molécula pequeña de la polimerización de alfa-sinucleína, L-DOPA, inhibidores de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CEPT), inhibidores de la metaloproteasa, inhibidores de la colinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, hormonas,  
40 agentes neuroprotectores e inhibidores de la muerte celular.



MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAEAAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVAT  
 VAEKTKEQVTN VGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQ  
 EGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA



121 DNEAYEMPSEEGYQDYEPEA 140

**FIG. 1**

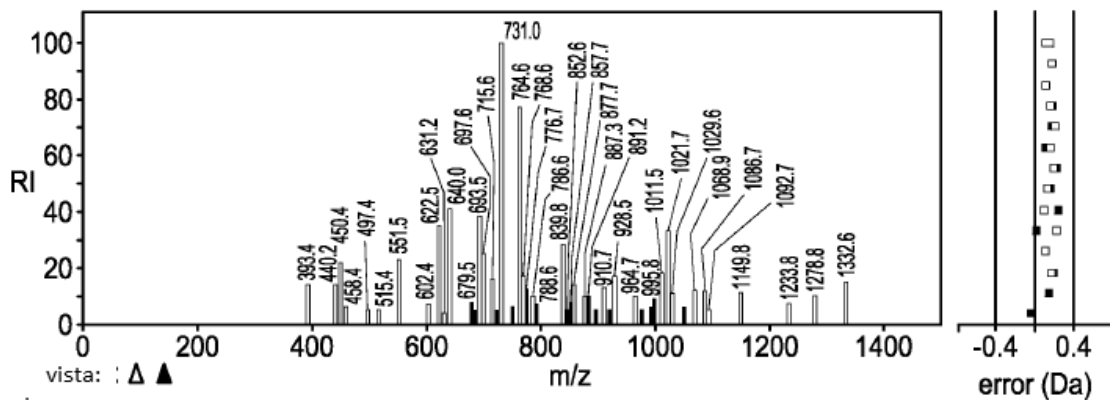


Inicio	Secuencia de péptidos	Final
11	AKEGVVAAAEEKTK	23
11	AKEGVVAAAEEK	21
33	TKEGVLYVGSK	43
35	EGVLYVGSK	43
44	TKEGVVHGVATVAEK	58
46	EGVVHGVATVAEK	58
59	TKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQK	80
61	EQVTNVGGAVVTGVTAVAQK	80
81	TVEGAGSIAAATGFVKK	97
81	TVEGAGSIAAATGFVK	96

**FIG. 3**

# log(e) log(l) m+h delta z secuencia | validar | estudio | mmm  
 9020 -12.7 5.28 1478.785 0.328 2 81 TVEGAGSIAAATGVK<sup>96</sup> (1902)  
 CGItemp52639 scan 9020 (carga 2)

T V E G A G S I A A A T G F V K



vista:  $\Delta$   $\blacktriangle$

enlace	+1y	+1y-17	+1y-18	+1b	+1b-17	+1b-18
T <sub>1</sub>	1377.737	1360.711	1359.727	102.055	85.028	84.044
V <sub>2</sub>	+1.21278.669	1261.642	1260.658	201.123	184.097	183.113
E <sub>3</sub>	1149.626	1132.600	1131.616	330.166	313.139	312.155
G <sub>4</sub>	1092.605	1075.578	1074.594	387.187	370.161	369.177
A <sub>5</sub>	1021.568	1004.541	1003.557	458.225	441.198	440.214
G <sub>6</sub>	964.546	947.520	946.536	515.246	498.219	497.235
S <sub>7</sub>	877.514	860.488	859.504	602.278	585.251	584.267
I <sub>8</sub>	764.430	747.404	746.420	715.362	698.336	697.352
A <sub>9</sub>	693.393	676.366	675.382	+1.2786.399	769.373	768.389
A <sub>10</sub>	622.356	605.329	604.345	857.436	840.410	839.426
A <sub>11</sub>	551.319	534.292	533.308	928.473	911.447	910.463
T <sub>12</sub>	450.271	433.245	432.261	+1.21029.521	1012.495	1011.511
G <sub>13</sub>	393.250	376.223	375.239	1086.543	1069.516	1068.532
F <sub>14</sub>	246.181	229.155	228.171	1233.611	1216.584	1215.600
V <sub>15</sub>	147.113	130.086	129.102	1332.679	1315.653	1314.669

FIG. 4

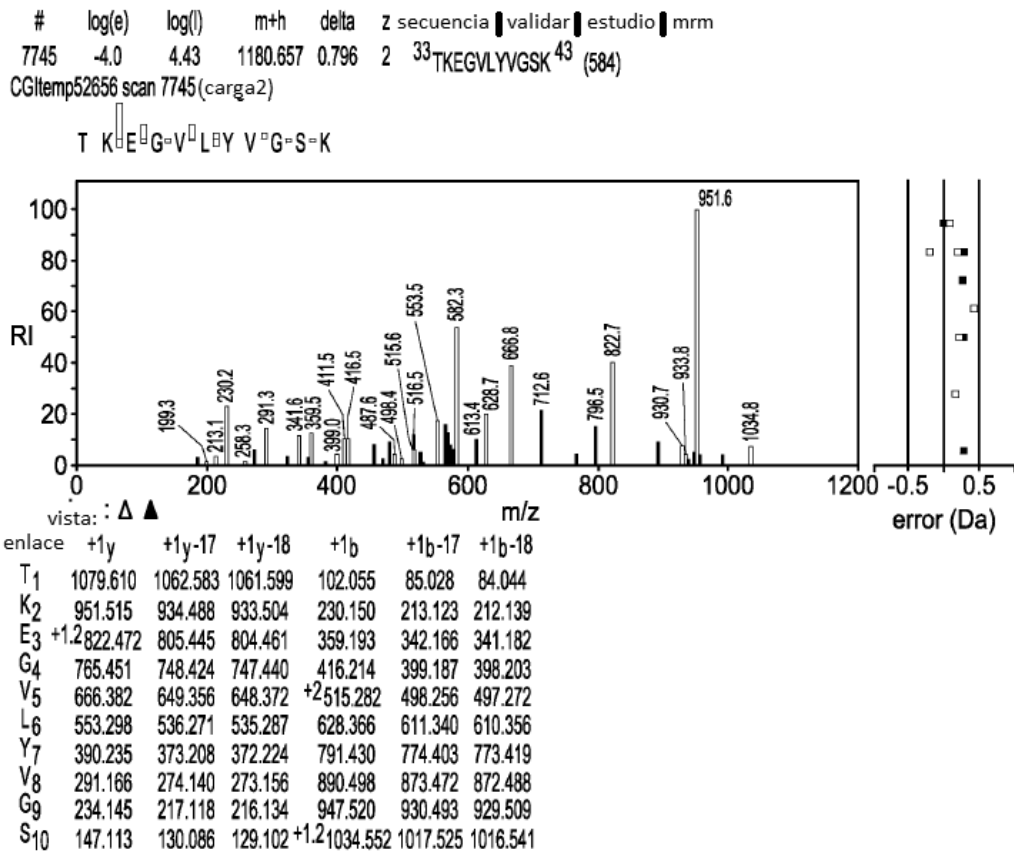


FIG. 5

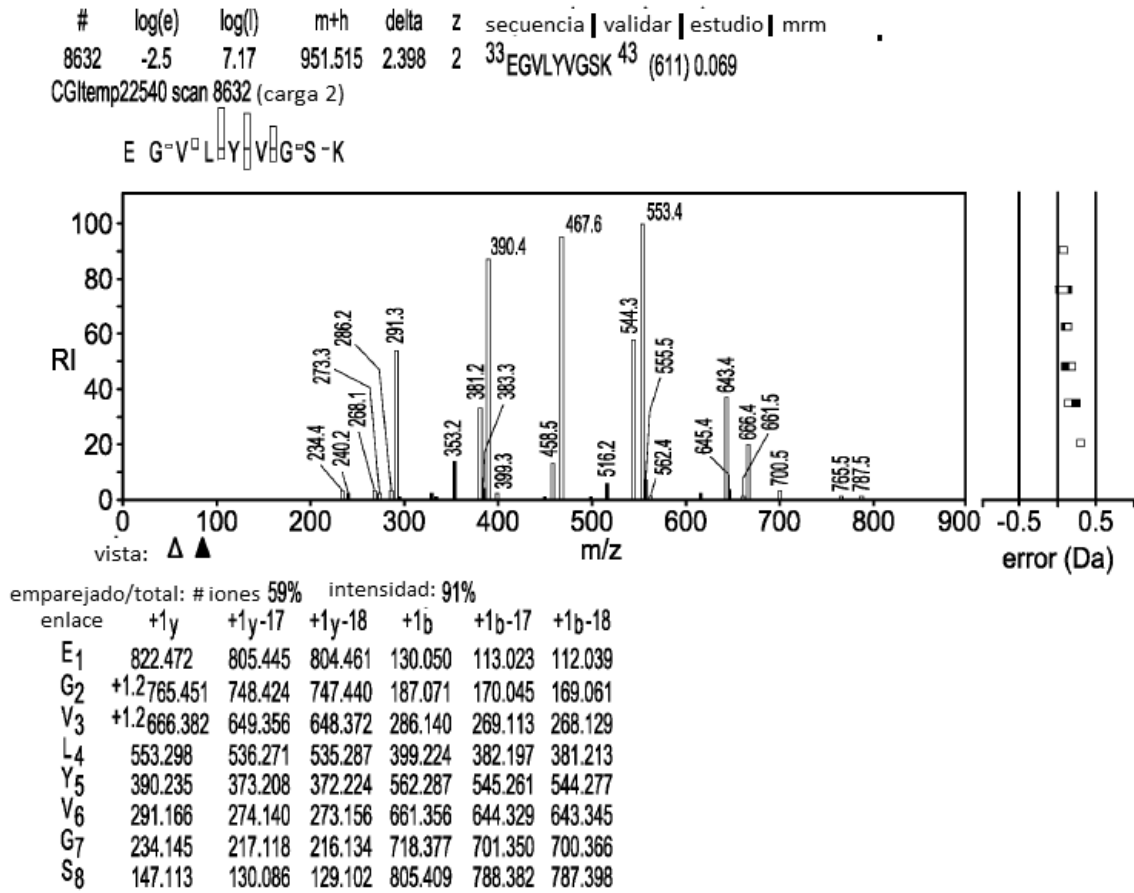
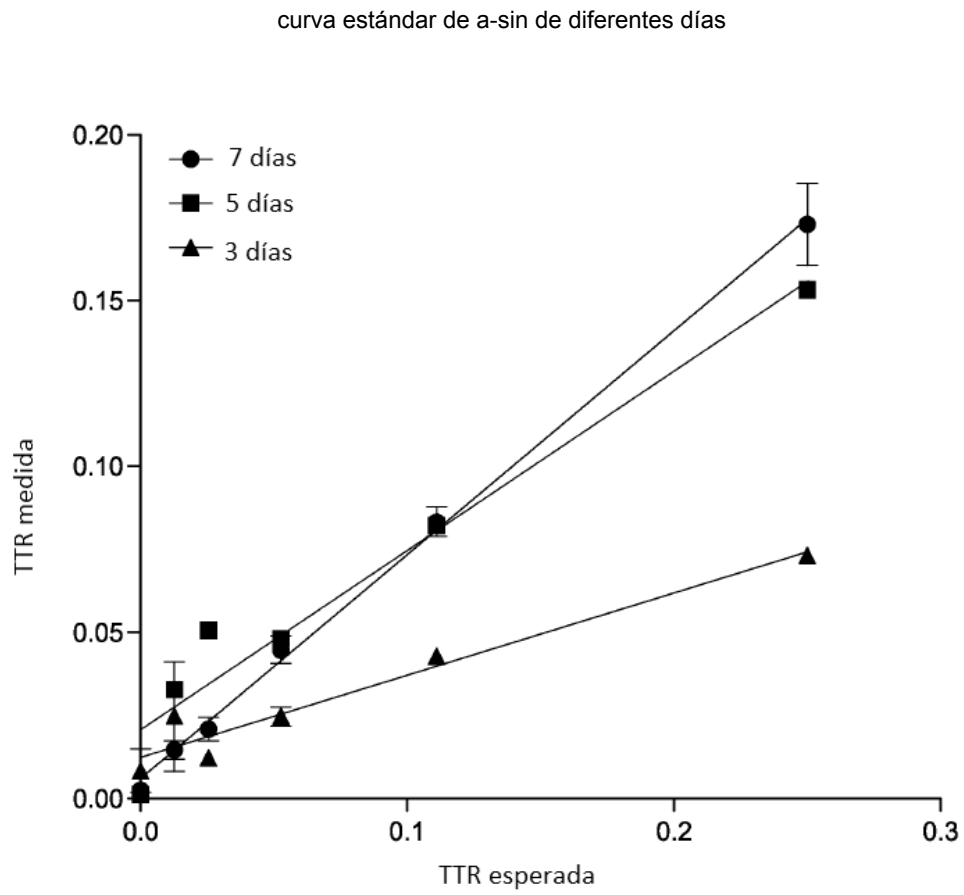
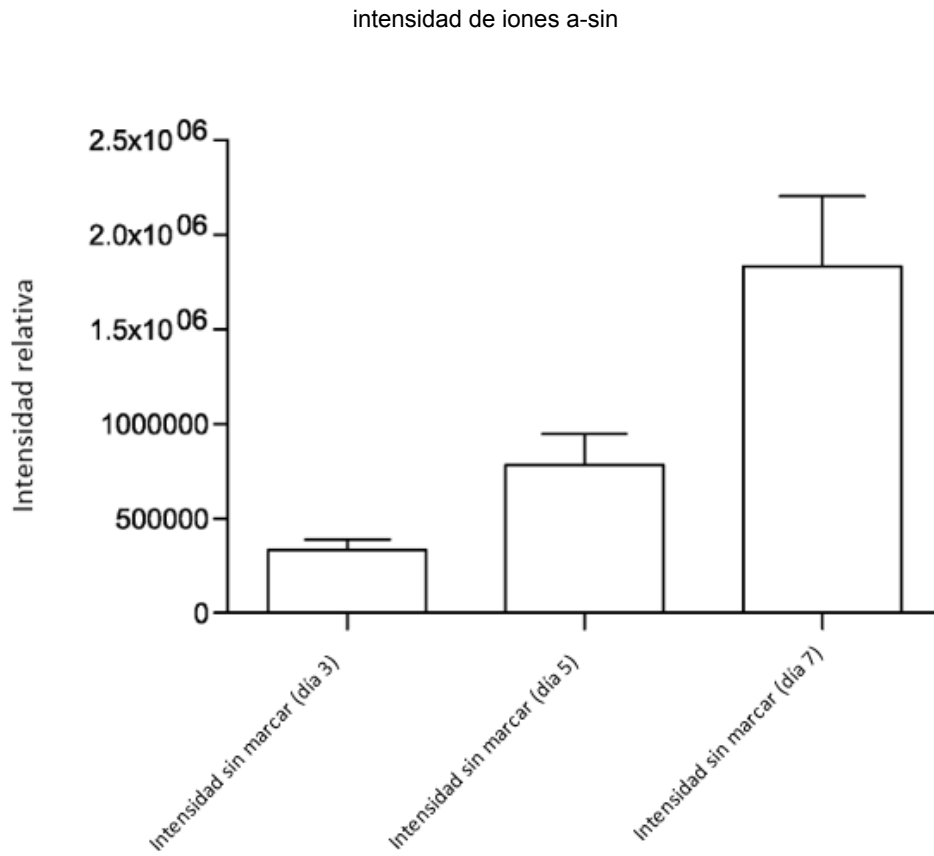


FIG. 6

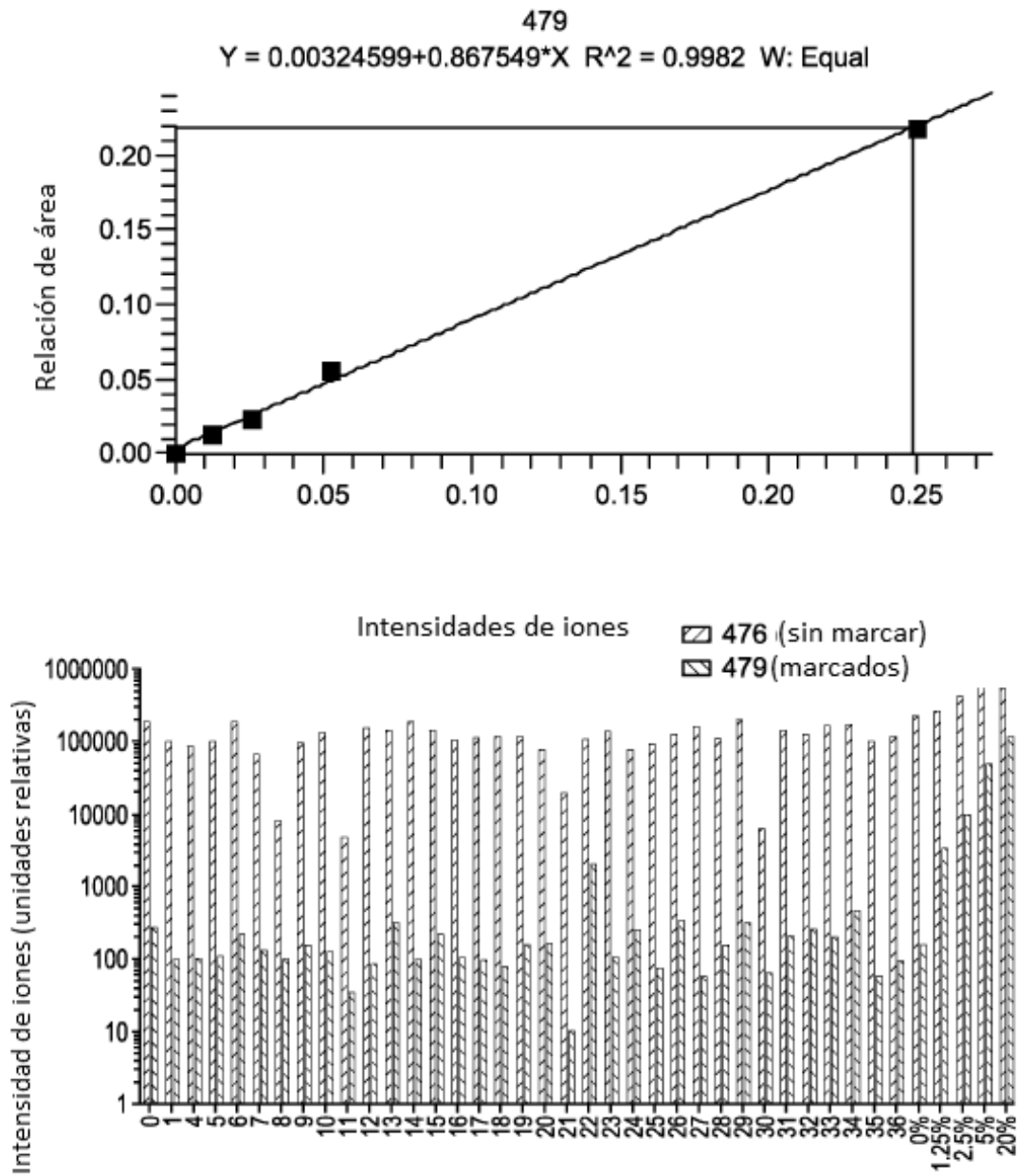


**FIG. 7**

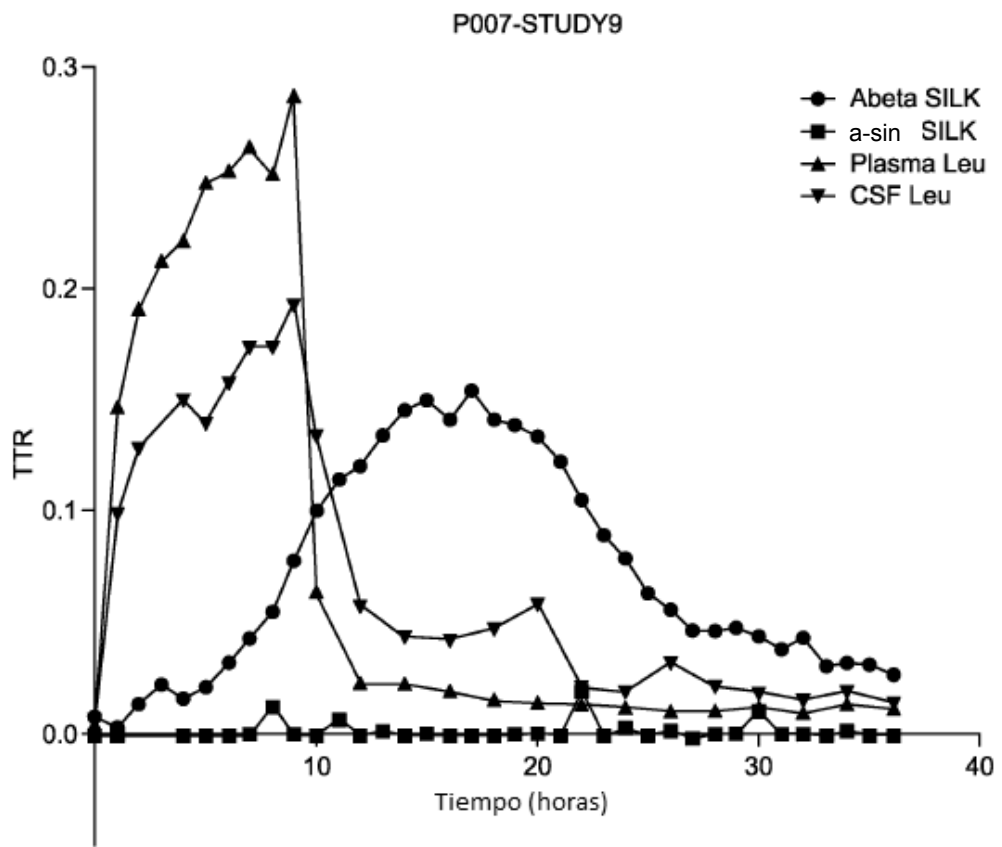


**FIG. 8**





**FIG. 9**



**FIG. 10**