

ENSAYO DE DETECCIÓN DE ALFA-SINUCLEÍNA

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reclama la prioridad de la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 63/581,272, presentada el 7 de septiembre de 2023, la cual se incorpora por referencia aquí en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] Se ha enviado un Listado de Secuencias electrónicamente en formato XML y por la presente se incorpora por referencia en su totalidad. La copia XML, creada el 4 de septiembre de 2024, se llama UE-FA-AS-PCT_ST26.xml y tiene un tamaño de 2,097 bytes.

ANTECEDENTES

[0003] La alfa-sinucleína (a-syn) es una proteína pequeña y ácida muy conservada de 140 aminoácidos y un peso molecular de 19kDa que está codificada por el gen SNCA ubicado en el cromosoma 4. Se localiza en alta concentración en las terminales nerviosas presinápticas dentro del sistema nervioso central, donde desempeña un papel en la biología de las vesículas sinápticas. Las sinucleinopatías son un conjunto de trastornos neurodegenerativos asociados con el depósito de agregados fibrilares de a-syn dentro de poblaciones selectivas de neuronas y glía. Estos depósitos pueden encontrarse dentro del soma neuronal como cuerpos de Lewy (LB) o en neuritas distróficas en enfermedades como la enfermedad de Parkinson (PD) o la Demencia con cuerpos de Lewy (DLB); o en inclusiones citoplasmáticas gliales en la atrofia multisistémica (MSA).

[0004] La presencia de a-syn ha sido detectada en fluidos biológicos como el líquido cefalorraquídeo (CSF) y el suero. La medición de las concentraciones de a-syn en CSF mediante ELISAs se ha propuesto como un biomarcador para trastornos relacionados con a-syn. Sin embargo, a pesar de que muchos estudios muestran una reducción en los niveles de a-syn en CSF en PD y en DLB, los resultados generales no son consistentes. Incluso en aquellos estudios donde se ha demostrado una reducción de a-syn en CSF, las diferencias son pequeñas, y existe una superposición considerable dentro de los grupos de pacientes y entre los grupos de pacientes y de control. Además, la estandarización de la medición de a-syn en CSF entre laboratorios ha demostrado ser difícil.

[0005] Las propiedades de agregación de la a-syn han sido comparadas recientemente con la proteína priónica, cuya agregación causa encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs). De hecho, existe mucho debate en la literatura actual sobre si las alfa-sinucleinopatías son realmente enfermedades similares a priones. Una técnica descrita recientemente llamada conversión inducida por agitación en tiempo real (RT-QuIC), que

explota la capacidad de la proteína priónica para inducir la autoagregación, se ha utilizado para desarrollar una prueba diagnóstica en CSF para la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD), la forma humana más común de TSE.

[0006] Sin embargo, dadas las diferencias significativas entre las proteínas priónicas y la a-syn, estas técnicas han fallado en detectar de manera confiable la presencia de a-syn o la agregación de a-syn en una muestra biológica. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de un ensayo confiable para detectar la presencia de a-syn y la agregación de a-syn en una muestra biológica.

[0007] Al menos un objetivo de la presente invención es proporcionar un ensayo mejorado para detectar la presencia de a-syn y/o la agregación de a-syn en una muestra biológica.

SUMARIO

[0008] De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia de agregación de alfa-sinucleína en una muestra biológica, el método comprendiendo los pasos: (i) proporcionar una muestra biológica; (ii) proporcionar una muestra de reacción que comprende una población de perlas, un fluoróforo adaptado para unirse a agregados de proteínas y para aumentar la fluorescencia cuando se une a agregados de proteínas, y alfa-sinucleína o un fragmento o variante de la misma; (iii) combinar la muestra biológica y la muestra de reacción para formar una mezcla de reacción; (iv) incubar la mezcla de reacción con ciclos de agitación intermitentes; (v) iluminar la mezcla de reacción con una longitud de onda de luz que excita el fluoróforo; y (vi) determinar el nivel de fluorescencia de la mezcla de reacción durante la incubación, en donde los pasos (iv) a (vi) se llevan a cabo al mismo tiempo, y un aumento significativo en la fluorescencia de la mezcla de reacción durante los pasos (iv) a (vi) es indicativo de la presencia de agregados de alfa-sinucleína en la mezcla de reacción, y en donde la presencia de agregados de alfa-sinucleína en la mezcla de reacción es indicativa de la presencia de agregados de alfa-sinucleína en la muestra biológica.

[0009] El experto en la materia entenderá que los términos "alfa-sinucleína", "a-syn", "a-sinucleína", y α -syn" se refieren a la proteína alfa-sinucleína y se usan indistintamente en todo el texto. Por ejemplo, en modalidades donde la muestra biológica se obtiene de un sujeto humano, la alfa-sinucleína es alfa-sinucleína humana que tiene la secuencia SEQ ID NO.1:

[0010] SEQ ID NO.1:

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH

GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL

GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

[0011] El término "fragmento", con referencia a la alfa-sinucleína, se refiere a un polinucleótido de al menos 10, 20, 30, 50, 100, 120, 130 o 140 nucleótidos contiguos de la secuencia de alfa-sinucleína, o cualquier subconjunto de ellos; los fragmentos preferidos son aquellos capaces de agregarse bajo las condiciones del método de la invención. Por ejemplo, el fragmento puede comprender la secuencia de aminoácidos 1-60 o 61-140 de la secuencia nativa de alfa-sinucleína.

[0012] Por "variante" con referencia a la alfa-sinucleína se entiende una proteína alfa-sinucleína con al menos una sustitución, inserción y/o delección de aminoácido en la secuencia de péptido o polipéptido o una alteración a una porción químicamente unida a la proteína.

[0013] Sustitución conservativa: Una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo de 1, 2, 5 o 10 residuos) por residuos de aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares. Típicamente, las sustituciones conservativas tienen poco o ningún impacto en la actividad de un péptido o polipéptido resultante. Por ejemplo, una sustitución conservativa en la alfa-sinucleína puede ser una sustitución de aminoácido que no afecta sustancialmente la capacidad del péptido para agregarse en las condiciones de reacción del método de la invención. En un ejemplo particular, una sustitución conservativa en la alfa-sinucleína es una sustitución de aminoácido que no altera significativamente la capacidad de la proteína para agregarse bajo las condiciones de reacción del método de la invención. La detección de variantes de alfa-sinucleína puede usarse para identificar qué residuos de aminoácidos pueden tolerar una sustitución de aminoácido.

[0014] En un ejemplo, la alfa-sinucleína puede ser alfa-sinucleína humana y se puede incluir una sustitución conservativa en el péptido, como una sustitución conservativa en SEQ ID NO:1. En otro ejemplo, se incluyen 10 o menos sustituciones conservativas en el péptido, como cinco o menos. Un péptido o proteína de la invención puede, por lo tanto, incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones conservativas. Un polipéptido puede ser producido para contener una o más sustituciones conservativas manipulando la secuencia de nucleótidos que codifica ese polipéptido utilizando, por ejemplo, procedimientos estándar como la mutagénesis dirigida o PCR. Alternativamente, un polipéptido puede ser producido para contener una o más sustituciones conservativas usando métodos de síntesis de péptidos, por ejemplo, los conocidos en el arte.

[0015] Las variantes de sustitución son aquellas en las que al menos un residuo en la secuencia de aminoácidos ha sido eliminado y un residuo diferente ha sido insertado en su lugar. Ejemplos de aminoácidos que

pueden ser sustituidos por un aminoácido original en una proteína y que se consideran sustituciones conservativas incluyen: Ser por Ala; Lys por Arg; Gln o His por Asn; Glu por Asp; Asn por Gln; Asp por Glu; Pro por Gly; Asn o Gln por His; Leu o Val por Ile; Ile o Val por Leu; Arg o Gln por Lys; Leu o Ile por Met; Met, Leu o Tyr por Phe; Thr por Ser; Ser por Thr; Tyr por Trp; Trp o Phe por Tyr; e Ile o Leu por Val.

[0016] En una modalidad, las sustituciones son entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre Asp y Glu; entre Asn y Gln; entre Lys y Arg; y/o entre Phe y Tyr.

[0017] Puede encontrarse más información sobre sustituciones conservativas, entre otros lugares, en Ben-Bassat et al., (J. Bacteriol. 169:751-7, 1987), O'Regan et al., (Gene 77:237-51, 1989), Sahin-Toth et al., (Protein Sci. 3:240-7, 1994), Hochuli et al., (Bio/Technology 6:1321-5, 1988), WO 00/67796 (Curd et al.) y en libros de texto estándar de genética y biología molecular.

[0018] Normalmente, la alfa-sinucleína forma un tetrámero plegado de forma estable que resiste la agregación. Sin embargo, se ha sugerido que las mutaciones en la alfa-sinucleína promueven la agregación, y que estos agregados de alfa-sinucleína son un bloque de construcción primario de las fibrillas que se cree están involucradas en alfa-sinucleinopatías como la Demencia con cuerpos de Lewy y la enfermedad de Parkinson.

[0019] Por lo tanto, la detección o determinación de si una muestra biológica comprende agregados de alfa-sinucleína puede permitir la detección de tales patologías sin requerir técnicas invasivas o costosas y puede permitir la detección de tales patologías antes de lo que sería posible utilizando métodos estándar.

[0020] Los ensayos como la conversión inducida por agitación en tiempo real (RT-QuIC) no han podido hasta la fecha detectar la presencia de agregados de alfa-sinucleína. Los inventores han descubierto sorprendentemente que el método RT-QuIC modificado de la invención permite la detección de alfa-sinucleína con una sensibilidad y especificidad muy altas, y permite diferenciar las patologías relacionadas con los agregados de alfa-sinucleína de otras patologías relacionadas con agregados de proteínas.

[0021] La frase "aumento significativo en la fluorescencia" significa un aumento en la fluorescencia de al menos la fluorescencia relativa media más dos veces la desviación estándar de la fluorescencia relativa media de los controles negativos o la fluorescencia de línea base en un punto de tiempo adecuado, típicamente dentro de 90-120 horas.

[0022] Típicamente, la muestra biológica es una muestra de fluido corporal. Sin embargo, la muestra biológica puede ser una muestra de tejido basada en células. La muestra biológica puede tomarse de un sujeto

para análisis usando el método de la invención, para permitir a un profesional de la salud determinar si el sujeto puede tener una enfermedad que esté asociada con la presencia de agregados de alfa-sinucleína.

[0023] El fluido corporal puede ser seleccionado del grupo que incluye líquido cefalorraquídeo, sangre o fracciones de sangre, fluido o tejido nasal, orina, heces y linfa. Preferiblemente, el fluido corporal se selecciona del grupo que incluye líquido cefalorraquídeo, plasma sanguíneo u otra fracción, y tejido o fluido nasal. Por ejemplo, el fluido corporal puede ser líquido cefalorraquídeo. En otro ejemplo, el fluido corporal puede ser tejido o fluido nasal que ha sido extraído usando un hisopo nasal, por ejemplo. En un ejemplo adicional, el fluido corporal puede ser una muestra de sangre o fracción de sangre.

[0024] En consecuencia, el método de la invención puede permitir la detección de una enfermedad asociada con la agregación de alfa-sinucleína a partir de una muestra biológica tomada de un sujeto, permitiendo un método no invasivo de diagnóstico o pronóstico.

[0025] La muestra biológica se toma típicamente de un sujeto mamífero, preferiblemente de un sujeto humano. Sin embargo, la muestra biológica puede tomarse de un sujeto piscícola, aviar, reptil o anfibio.

[0026] La muestra de reacción típicamente comprende un solvente. El solvente puede ser un solvente acuoso tal que la muestra de reacción sea una solución acuosa.

[0027] La muestra de reacción puede ser una muestra de reacción tamponada para mantener sustancialmente el pH de la muestra de reacción. Por ejemplo, la muestra de reacción puede comprender un tampón biológicamente aceptable como tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), solución salina tamponada con fosfato (PBS), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), ácido Piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES) o tampón fosfato de Sorensen, por ejemplo.

[0028] Típicamente, la muestra de reacción está tamponada para mantener el pH de la muestra de reacción desde aproximadamente pH 6 hasta aproximadamente pH 8,5. Preferiblemente, la muestra de reacción está tamponada para mantener el pH de la muestra de reacción desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 8,5. Por ejemplo, la muestra de reacción puede estar tamponada para mantener el pH de la muestra en pH 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8,0, 8,2 u 8,4.

[0029] Preferiblemente, la muestra de reacción está tamponada para mantener un pH de menos de un pH de 9,0.

[0030] Preferiblemente, la muestra de reacción está tamponada para mantener un pH de la muestra de reacción en pH 8,0, 8,2 u 8,4.

[0031] El fluoróforo de la muestra de reacción típicamente cambia de fluorescencia cuando se une a agregados de proteínas. Por ejemplo, el fluoróforo puede emitir fluorescencia débilmente cuando está libre en solución y puede emitir fluorescencia fuertemente cuando está unido a agregados de proteínas. Alternativamente, el fluoróforo puede no emitir fluorescencia cuando el fluoróforo está libre en solución y puede emitir fluorescencia cuando el fluoróforo está unido a agregados de proteínas.

[0032] Los agregados de proteínas pueden comprender un contenido significativo de láminas beta, y la proteína no agregada puede carecer de un contenido significativo de láminas beta, y el fluoróforo puede estar configurado para unirse a láminas beta de la proteína.

[0033] Los espectros de emisión del fluoróforo pueden desplazarse cuando el fluoróforo se une a la proteína agregada. Por ejemplo, los espectros de emisión del fluoróforo pueden desplazarse hacia el rojo cuando el fluoróforo se une a los agregados de proteínas. Alternativamente, los espectros de emisión del fluoróforo pueden desplazarse hacia el azul cuando el fluoróforo se une a los agregados de proteínas.

[0034] Típicamente, el fluoróforo es una tioflavina. Preferiblemente, el fluoróforo es tioflavina T (ThT).

[0035] Alternativamente, el fluoróforo puede ser cianina T-284 u otro fluoróforo que aumente la fluorescencia cuando se une a agregados de proteínas como los agregados de alfa-sinucleína.

[0036] En RT-QuIC estándar, una pequeña cantidad de la proteína que debe agregarse se incluye en la muestra de reacción para actuar como sustrato para la agregación de proteínas. En consecuencia, la muestra de reacción puede comprender menos de 1 mg/mL de alfa-sinucleína para actuar como sustrato de agregación. La muestra de reacción puede comprender menos de 0,5 mg/mL de alfa-sinucleína. La muestra de reacción puede comprender menos de 0,1 mg/mL de alfa-sinucleína.

[0037] La muestra de reacción puede comprender desde aproximadamente 0,01 mg/mL de alfa-sinucleína hasta aproximadamente 10 mg/mL de alfa-sinucleína para actuar como sustrato de agregación. La muestra de reacción puede comprender desde aproximadamente 0,1 mg/mL hasta aproximadamente 1 mg/mL de alfa-sinucleína para actuar como sustrato de agregación.

[0038] La alfa-sinucleína de la muestra de reacción puede ser alfa-sinucleína recombinante, de especies humanas u otras. La alfa-sinucleína de la muestra de reacción puede ser un fragmento de alfa-sinucleína de

longitud completa. Por ejemplo, el fragmento puede comprender los aminoácidos 1-60 o 61 a 140 de la alfa-sinucleína de longitud completa.

[0039] Las perlas de la población de perlas de la muestra de reacción pueden comprender circonia, sílice, vidrio, cuarzo o un polímero como poliestireno, politetrafluoroetileno (PTFE), polimetilmetacrilato (PMMA) o combinaciones de los mismos.

[0040] Típicamente, la población de perlas tiene un diámetro medio de las perlas desde aproximadamente 1mm hasta aproximadamente 0,001mm.

[0041] El diámetro medio de la población de perlas puede ser desde aproximadamente 1mm hasta aproximadamente 0,1mm. Por ejemplo, el diámetro medio de las perlas puede ser de 1mm, 0,5mm o 0,1mm.

[0042] La población de perlas puede tener una distribución estándar de diámetros de aproximadamente más o menos 10% del diámetro medio. En consecuencia, el diámetro de las perlas puede ser sustancialmente homogéneo.

[0043] La muestra de reacción puede comprender desde aproximadamente 1mg hasta aproximadamente 150mg de perlas por 100µL de mezcla de reacción. La muestra de reacción puede comprender desde aproximadamente 10mg hasta aproximadamente 100mg de perlas por 100µL de mezcla de reacción. La mezcla de reacción puede comprender aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50mg de perlas por 100µL de mezcla de reacción, o una cantidad intermedia. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede comprender desde aproximadamente 10 a 50mg de perlas por 100µL de mezcla de reacción, de 20 a 50mg de perlas por 100µL de mezcla de reacción, o de 30 a 50mg de perlas por 100µL de mezcla de reacción.

[0044] La presencia de agregados de alfa-sinucleína en la muestra biológica es indicativa de una enfermedad asociada con la agregación anormal de alfa-sinucleína. Por ejemplo, la enfermedad puede ser Demencia con cuerpos de Lewy o la enfermedad de Parkinson, u otras alfa-sinucleinopatías.

[0045] La mezcla de reacción puede ser incubada por más de 40 horas, más de 60 horas, más de 80 horas o más de 120 horas. La mezcla de reacción puede ser agitada por un periodo y dejarse reposar por un periodo. Típicamente, el periodo dentro del cual se agita la mezcla de reacción es significativamente más corto que el periodo dentro del cual se permite que la mezcla de reacción repose sin agitación. La mezcla de reacción puede ser agitada por un periodo de al menos 1 minuto, al menos 2 minutos o al menos 5 minutos. La mezcla de reacción puede dejarse reposar por un periodo de al menos 10 minutos, al menos 15 minutos o al menos 20 minutos. Por

ejemplo, la mezcla de reacción puede ser agitada por un periodo de un minuto y dejarse reposar sin agitación por un período de catorce minutos.

[0046] Los ciclos de agitación intermitente pueden comprender ciclos de temblor intermitente. Los ciclos de temblor pueden mover la mezcla de reacción en un movimiento circular u orbital y, por lo tanto, la velocidad del temblor puede definirse en términos de rotaciones por minuto, por ejemplo. Alternativamente, los ciclos de temblor pueden mover la mezcla de reacción de ida y vuelta a lo largo de un solo eje y, por lo tanto, la velocidad del temblor puede definirse en términos de repeticiones por minuto.

[0047] La mezcla de reacción puede someterse a agitación a una velocidad fija. A continuación, la velocidad de agitación se expresa en rotaciones por minuto, pero puede aplicarse igualmente a repeticiones por minuto para modalidades donde el temblor sigue un movimiento lineal. La mezcla de reacción puede someterse a agitación a al menos 100 rotaciones por minuto. La mezcla de reacción puede someterse a agitación a al menos 150 rotaciones por minuto. La mezcla de reacción puede someterse a agitación a al menos 200 rotaciones por minuto. La mezcla de reacción puede someterse a agitación desde al menos 100 rotaciones por minuto hasta al menos 300 rotaciones por minuto. La mezcla de reacción puede someterse a agitación desde al menos 150 rotaciones por minuto hasta al menos 250 rotaciones por minuto. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede someterse a agitación a 150, 200 o 250 rotaciones por minuto. Preferiblemente, la mezcla de reacción se somete a agitación a 200 rotaciones por minuto.

[0048] La velocidad requerida de agitación de la mezcla de reacción puede variar dependiendo del orbital de temblor del agitador. La velocidad requerida de agitación de la mezcla de reacción puede variar dependiendo de la muestra biológica utilizada en el método. Por ejemplo, en modalidades donde la muestra biológica es una fracción de sangre como plaquetas en plasma, por ejemplo, la mezcla de reacción puede agitarse a una velocidad de 400, 600, 800, 900 o 1000 rotaciones por minuto.

[0049] Los ciclos de agitación intermitente pueden comprender sonicación intermitente de la mezcla de reacción. La sonicación de la mezcla de reacción puede agitar la mezcla de reacción para promover la agregación. También se pueden usar métodos alternativos de agitación de la mezcla de reacción.

[0050] El método de la invención puede llevarse a cabo a una temperatura de 25°C a 45°C. El método de la invención puede llevarse a cabo a una temperatura de 30°C a 40°C. Por ejemplo, el método puede llevarse a cabo a una temperatura de 30°C, 32°C, 34°C, 36°C, 38°C o 40°C, y valores intermedios.

[0051] En una modalidad, el método de la invención puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 30°C. En una modalidad alternativa, el método de la invención puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 35°C o aproximadamente 37°C.

[0052] La muestra biológica puede ser tratada antes del método de la invención para concentrar la alfa-sinucleína en la muestra biológica. La muestra biológica puede ser tratada antes del método de la invención para extraer alfa-sinucleína de una muestra biológica compleja.

[0053] La muestra biológica puede ser tratada con una población de perlas. Las perlas pueden comprender un material magnético. Por ejemplo, las perlas pueden comprender un material paramagnético, y las perlas pueden permitir la separación del material que se une específicamente a la superficie de las perlas usando campos magnéticos aplicados externamente para extraer las perlas de una mezcla compleja. Las perlas magnéticas pueden permitir la extracción o concentración de alfa-sinucleína en una muestra biológica antes del método de la invención.

[0054] Por ejemplo, las perlas pueden comprender óxido de hierro superparamagnético, u otro material paramagnético y la alfa-sinucleína puede unirse a las perlas y la aplicación de un campo magnético puede permitir que las perlas, y por lo tanto la alfa-sinucleína, sean separadas o concentradas en una muestra biológica.

[0055] En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para diagnosticar alfa-sinucleinopatías, el método comprendiendo los pasos: (i) proporcionar una muestra biológica de un sujeto; (ii) proporcionar una muestra de reacción que comprende una población de perlas, un fluoróforo adaptado para unirse a agregados de proteínas y para aumentar la fluorescencia cuando se une a agregados de proteínas, y alfa-sinucleína o un fragmento o variante de la misma; (iii) combinar la muestra biológica y la muestra de reacción para formar una mezcla de reacción; (iv) incubar la mezcla de reacción con ciclos de agitación intermitentes; (v) iluminar la mezcla de reacción con una longitud de onda de luz que excita el fluoróforo; y (vi) determinar el nivel de fluorescencia de la mezcla de reacción durante la incubación, en donde los pasos (iv) a (vi) se llevan a cabo al mismo tiempo, y un aumento significativo en la fluorescencia de la mezcla de reacción durante los pasos (iv) a (vi) es indicativo de que el sujeto tiene una alfa-sinucleinopatía.

[0056] La alfa-sinucleinopatía es típicamente Parkinson o Demencia con Cuerpos de Lewy.

[0057] La invención se extiende en un tercer aspecto a la provisión de un kit de partes para detectar la presencia de agregación de alfa-sinucleína en una muestra biológica, el kit de partes comprendiendo: una muestra de reacción que comprende: (i) una población de perlas; (ii) un fluoróforo; (iii) alfa-sinucleína o un fragmento o

variante de la misma; y, opcionalmente, (iv) una solución acuosa tamponada. La solución acuosa tamponada puede comprender un tampón fosfato. El tampón fosfato puede ser elegido entre tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), solución salina tamponada con fosfato (PBS), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), o tampón fosfato de Sorensen.

[0058] El kit de partes puede ser usado como la muestra de reacción para los métodos del primer y segundo aspecto.

[0059] Las características preferidas y opcionales para el primer aspecto de la invención son características preferidas y opcionales para el segundo y tercer aspecto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0060] Las modalidades de la presente invención se describirán ahora, a modo de ejemplo no limitante, con referencia a los dibujos adjuntos.

[0061] **Figura 1:** Un diagrama esquemático que muestra el proceso de RT-QuIC estándar;

[0062] **Figura 2:** Trazos de RT-QuIC para muestras de homogeneizado de cerebro (BH) de pacientes con Demencia con Cuerpos de Lewy (DLB), enfermedad de Alzheimer (AD) y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD) con pacientes sin evidencia neuropatológica de enfermedad que murieron repentinamente (SD) como controles;

[0063] **Figura 3:** Trazos de RT-QuIC para muestras de BH de pacientes con patologías mixtas;

[0064] **Figura 4:** Trazos de RT-QuIC para muestras de líquido cefalorraquídeo (CSF) de pacientes confirmados con DLB y sCJD;

[0065] **Figura 5:** Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de control y una muestra de BH de un paciente con DLB;

[0066] **Figura 6:** Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de pacientes con AD y una muestra de BH de un paciente con DLB;

[0067] **Figura 7:** Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de pacientes con DLB y una muestra de BH de un paciente con DLB;

[0068] **Figura 8:** Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de pacientes con DLB y AD y una muestra de BH de un paciente con DLB;

- [0069] Figura 9:** Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de pacientes con Enfermedad de Parkinson (PD) y muestras de CSF de sujetos de control;
- [0070] Figuras 10A-10B:** Trazos de RT-QuIC para muestras de SD BH A) con perlas y B) sin perlas;
- [0071] Figuras 11A-11B:** Trazos de RT-QuIC para muestras de DLB BH A) con perlas y B) sin perlas;
- [0072] Figuras 12A-12B:** Trazos de RT-QuIC para muestras de líquido cefalorraquídeo (CSF) de Enfermedad de Parkinson A) con perlas y B) sin perlas;
- [0073] Figuras 13A-13B:** Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de Demencia con Cuerpos de Lewy A) con perlas y B) sin perlas;
- [0074] Figuras 14A-14C:** Trazos de RT-QuIC para muestras de BH de Demencia con Cuerpos de Lewy con A) sin perlas B) 18,7mg de perlas por pozo y C) 37,5mg de perlas por pozo;
- [0075] Figuras 15A-15C:** Trazos de RT-QuIC para BH de sujetos de control (SDBH), pacientes con enfermedad de cuerpos de Lewy (LBDBH), Enfermedad de Alzheimer (ADBH) o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJDBH) o sin sembrar para (A) perlas de circonia/sílice de 0,1mm, (B) perlas de circonia/sílice de 0,5mm y (C) perlas de circonia/sílice de 2,3mm;
- [0076] Figuras 16A-16C:** Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de pacientes con enfermedad de Cuerpos de Lewy (LB) o de sujetos de control con la adición de 37mg de (A) perlas de circonia/sílice de 0,1mm, (B) perlas de circonia/sílice de 0,5mm y (C) perlas de circonia/sílice de 2,3mm;
- [0077] Figuras 17A-17B:** Trazos de RT-QuIC para muestras de BH de sujetos de control (SDBH), pacientes con enfermedad de cuerpos de Lewy (LBDBH) y Enfermedad de Alzheimer (ADBH) y comparadas a esas reacciones dejadas sin sembrar usando (A) perlas de acero de 0,5mm o (B) perlas de vidrio de 0,5mm;
- [0078] Figuras 18A-18B:** Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de sujetos de control, y pacientes con enfermedad de cuerpos de Lewy (LBDBH) y comparadas a esas reacciones dejadas sin sembrar usando (A) perlas de acero de 0,5mm o (B) perlas de vidrio de 0,5mm;
- [0079] Figura 19:** Trazos de RT-QuIC para muestras de plaquetas aisladas de muestras de sangre anti-coagulada con EDTA de sujetos con PD y control;

[0080] Figuras 20A-20B: Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de pacientes con Enfermedad de Parkinson (PD) o de sujetos de control negativos con la adición de (A) 37mg o (B) 18 mg de perlas de óxido de circonio de 1mm;

[0081] Figuras 21A-21B: Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de pacientes con Enfermedad de Parkinson (PD) o de sujetos de control negativos con la adición de (A) 37mg o (B) 18 mg de perlas de circonia/sílice de 1mm; y

[0082] Figuras 22A-22B: Trazos de RT-QuIC para muestras de CSF de pacientes con Enfermedad de Parkinson (PD) o de sujetos de control negativos con la adición de (A) 37mg o (B) 18 mg de perlas de vidrio de 1mm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0083] Si bien la elaboración y el uso de varias modalidades de la presente invención se discuten en detalle a continuación, debe apreciarse que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que pueden ser incorporados en una amplia variedad de contextos específicos. Las modalidades específicas discutidas en la presente son meramente ilustrativas de formas específicas de hacer y usar la invención y no delimitan el alcance de la invención.

[0084] Para facilitar la comprensión de esta invención, un número de términos se definen a continuación. Los términos definidos aquí tienen los significados tal como son entendidos comúnmente por una persona con habilidad ordinaria en las áreas relevantes para la presente invención. Los términos como "un", "una" y "el" o "la" no pretenden referirse a una entidad singular únicamente, sino que incluyen la clase general de la cual se puede usar un ejemplo específico para ilustración. La terminología aquí se usa para describir modalidades específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, excepto como se indica en las reivindicaciones.

MÉTODOS

Conversión inducida por agitación en tiempo real para la agregación de alfa-sinucleína

[0085] El tampón de reacción (RB) de RT-QuIC estaba compuesto por un tampón fosfato de 100mM (pH 8,2), Tioflavina T 10µM (ThT), y 0,1 mg/mL de alfa-sinucleína humana recombinante de longitud completa (1-140aa) (Stratech, Cambridge, Reino Unido) (SEQ ID NO.: 1) o un fragmento o una variante de la misma. Cada pozo de una placa negra de 96 pozos con un fondo transparente (Nalgene Nunc International, Fisher Scientific Ltd, Reino Unido) contenía 98µL, 90µL o 85µL de RB (dependiendo del volumen de semilla añadido) y ya sea

37 ± 3mg de perlas de circonia/sílice de 0,5mm (Thistle Scientific Ltd, Glasgow, Reino Unido), 37 ± 3mg de perlas de óxido de circonio de 1mm, 37 ± 3mg de perlas de circonia/sílice de 1mm, 37 ± 3mg de perlas de vidrio de 1mm, 18 ± 3mg de perlas de óxido de circonio de 1mm, 18 ± 3mg de perlas de circonia/sílice de 1mm, o 18 ± 3mg de perlas de vidrio de 1mm. Las reacciones fueron sembradas con 2µL de fuerza de trabajo de homogeneizado de cerebro (BH), 5 µl, 10µl o 15µl de CSF sin diluir a un volumen de reacción final de 100µl. Las placas fueron selladas con una película selladora de placas (Fisher Scientific Ltd, Reino Unido) e incubadas en un lector de placas BMG OPTIMA FluoSTAR a 30°C por 120h con ciclos de agitación intermitente: doble orbital con agitación de 1 minuto (200rpm), descanso de 14 minutos. Las medidas de fluorescencia de ThT (excitación de 450nm y emisión de 480nm) se tomaron cada 15 minutos. Cada muestra se corrió en duplicado o triplicado.

Grupos de Pacientes

[0086] La fase inicial del desarrollo de RT-QuIC en CSF se llevó a cabo en 99 muestras de CSF obtenidas de la cohorte OPTIMA (Oxford Project to Investigate Memory and Ageing) con diagnóstico clínicamente y neuropatológicamente confirmado de DLB puro (n=12), PD (n=2), parálisis supranuclear progresiva (PSP) (n=2), degeneración corticobasal (n=3), DLB con patología de AD (n=17), AD con LBs incidentales (n=13), AD puro (n=30) y controles (n=20). OPTIMA iniciado en 1988, es un estudio clínico-patológico prospectivo y longitudinal de demencia y envejecimiento que incluye la recolección de CSF en múltiples puntos de tiempo durante el seguimiento clínico. Todos los protocolos clínicos y patológicos han sido descritos en detalle y fueron aprobados por el comité de ética local y los participantes proporcionaron consentimiento informado antes de la inscripción. La fase de validación de RT-QuIC se llevó a cabo en muestras de CSF (20 PD, 15 controles y 3 en riesgo) obtenidas de la cohorte Oxford Discovery, la cual es una de las cohortes de PD longitudinales más grandes y mejor caracterizadas clínicamente hasta la fecha. Los detalles clínicos completos de esta cohorte han sido descritos previamente. En resumen, los pacientes con PD idiopática diagnosticados dentro de los 3,5 años según los criterios de diagnóstico del UK PD Society Brain Bank fueron reclutados entre septiembre de 2010 y septiembre de 2014 de una población de 2,9 millones (estudio de ética 10/H0505/71). La duración media de la enfermedad entre 20 pacientes con PD fue de 1,6 ± 1.1 años (rango 0.1-3.2 años) y el estadio de Hoehn y Yahr 1,9 ± 0.4 (rango 1-3, máxima puntuación posible 5). La población de control fue reclutada de los cónyuges y amigos de los pacientes que tomaron parte en el estudio, así como del público en general. El grupo en riesgo comprendió a pacientes con comportamiento del sueño REM confirmado por polisomnografía nocturna, de los cuales se ha demostrado que el 80% desarrolla el trastorno de cuerpos de Lewy con el tiempo. La información demográfica se da en la Tabla 1.

Tabla 1: Información demográfica de los pacientes para los pacientes de Optima y Discovery investigados

Pacientes de OPTIMA (n)	Edad al morir Media $\pm$ DE (rango)	F/M
LBD puro (12)	80,8 $\pm$ 6,5 (71-92)	4/8
Enfermedad de Parkinson (2)	77,5 $\pm$ 7,8 (72-83)	0/2
LBD/AD mixto (17)	80,1 $\pm$ 6,4 (69-90)	10/7
AD con LB incidental (13)	79,8 $\pm$ 7,8 (67-91)	9/4
AD puro (30)	77,7 $\pm$ 8,6 (61-93)	17/13
Parálisis supranuclear progresiva (PSP) (2)	69,5 $\pm$ 3,5 (67-72)	2/0
Degeneración corticobasal (CBD) (3)	64,0 $\pm$ 10,6 (52-72)	1/2
Controles (20)	82,9 $\pm$ 6,9 (68-93)	10/10
Pacientes de Discovery (n)		
Enfermedad de Parkinson (20)	65,1 $\pm$ 9,1 (42-80)	6/14
Pacientes con RBD en riesgo	67,6 $\pm$ 7,7 (59-74)	0/3

Controles (15)	65,8 ± 7,4 (55-83)	8/7
----------------	--------------------	-----

Homogeneizados de Cerebro

[0087] El tejido cerebral fue proporcionado por el MRC Brain Bank en el NCJDRSU (licencia ética 11/ES/0022). Todo el tejido se congeló a -80°C dentro de las 2 horas de haber sido tomado como muestra y almacenado a -80°C antes del análisis. Los tejidos cerebrales habían sido almacenados entre 2 y 18 años antes de su uso.

[0088] El tejido de la corteza frontal se tomó de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD); enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD); y demencia con Cuerpos de Lewy difusos (DLB). Además, se obtuvo la corteza frontal de individuos sin enfermedades neurodegenerativas del banco de cerebros y tejidos de muerte súbita (MRC Sudden Death Brain and Tissue Bank) (controles de Muerte Súbita (SD)). Se obtuvo tanto tejido de corteza frontal como de sustancia negra de pacientes con AD/DLB mixto; sCJD/DLB mixto y AD/PD mixto. Todos los casos utilizados habían sido examinados histológicamente y el diagnóstico alcanzado mediante el uso de criterios aceptados internacionalmente. Inicialmente se prepararon homogeneizados de cerebro (BH) al 10% p/v utilizando solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene EDTA 1mM, NaCl 150mM, Triton X al 0,5% y cóctel completo de inhibidores de proteasas de Roche. Las muestras de trabajo posteriores de BH se prepararon diluyendo lo anterior a 1:20,000 con PBS.

Muestras de Líquido Ceforraquídeo

[0089] Las muestras de CSF se almacenaron en alícuotas de 0,5 mL en tubos de polipropileno a -80°C antes de ser analizadas. 99 muestras de CSF de la cohorte OPTIMA y 38 muestras de CSF del estudio Discovery del Oxford Parkinson's Disease Centre (OPDC) fueron recibidas del Departamento de Neurociencias Clínicas de Nuffield, Universidad de Oxford. Todas las muestras de CSF fueron transportadas de Oxford a Edimburgo en hielo seco y se almacenaron a -80°C a su llegada. Además, se analizaron muestras de CSF de pacientes con sCJD o DLB confirmados neuropatológicamente del Banco de CSF de NCJDRSU. La aprobación ética para el uso de muestras de CSF del Banco de CSF de NCJDRSU estuvo cubierta por el Comité de Ética de Investigación Multicéntrico para Escocia 05/MRE00/67. Todo el CSF fue centrifugado y almacenado a -80°C antes de ser analizado.

Resultados

[0090] El desarrollo de RT-QuIC se emprendió utilizando BH de corteza frontal de pacientes con diagnóstico clínico-patológico de DLB, enfermedad de Alzheimer (AD) y sCJD. Los pacientes sin evidencia neuropatológica de enfermedad neurológica que murieron repentinamente y fueron parte del banco de cerebros del MRC de Muerte Súbita fueron usados como controles (SD) (Fig. 2). Las reacciones RT-QuIC sembradas con BH de DLB tuvieron una fase de latencia de 50 horas, después de la cual se vio una creciente señal fluorescente de tioflavina T que alcanzó su máximo a las 70 horas. Ninguna de las reacciones sembradas con BH de pacientes con otros desórdenes de mal plegamiento de proteínas (AD o sCJD) o los controles SD, dieron una respuesta positiva incluso después de 120 horas.

[0091] Muchas patologías de enfermedades a menudo coexisten, especialmente la patología relacionada con AD y a-syn. Para investigar si la presencia de un desorden alternativo de mal plegamiento de proteínas puede interferir con la agregación de a-syn inducida ya sea por DLB o PD, se examinaron los BH de la corteza frontal de pacientes con patologías mixtas (Fig. 3). La presencia de un segundo trastorno de mal plegamiento de proteínas como AD o sCJD no inhibe la reacción RT-QuIC inducida por BH de DLB o PD (Figs. 2 y 3). Para investigar si el método RT-QuIC desarrollado era suficientemente sensible para detectar a-syn en CSF, se analizaron dos muestras de CSF de pacientes con DLB confirmado neuropatológicamente y 1 CSF de un caso confirmado neuropatológicamente de sCJD (Fig. 4). Ambas muestras de CSF de los pacientes con DLB dieron respuestas positivas con una fase de latencia entre 60 y 100 horas.

[0092] Se analizó un conjunto exploratorio de 99 muestras in vivo de CSF obtenidas como parte del estudio OPTIMA de pacientes con enfermedad posterior confirmada neuropatológicamente a tres diferentes volúmenes (es decir, 5, 10 y 15µl) para investigar la sensibilidad y especificidad de RT-QuIC y para calcular el volumen de CSF óptimo para el análisis (Tabla 2). Usando un volumen de 15µl, se obtuvo una sensibilidad de 92% para muestras de CSF de DLB (Figs. 7 y 8), y se obtuvo una sensibilidad de 65% para muestras de CSF de pacientes con patología mixta DLB/AD. Ninguna de las muestras de CSF de los sujetos de control (Fig. 5) o pacientes con AD puro (Fig. 6), CBD o PSP fue positiva. Usando este conjunto exploratorio de muestras de CSF, una respuesta positiva se definió como un valor de unidad de fluorescencia relativa (rfu) de >2DE (desviaciones estándar) por encima del promedio de los controles negativos a 120 horas de al menos uno de los duplicados de CSF.

[0093] Tabla 2. Reacciones positivas de RT-QuIC sembradas con muestras de CSF de pacientes con DLB confirmado neuropatológicamente, DLB/AD mixto, AD con LB incidental, AD, PD y controles sanos (Grupo

Exploratorio) y pacientes con PD diagnosticado clínicamente, PD en riesgo, degeneración corticobasal confirmada neuropatológicamente y parálisis supranuclear progresiva y controles de PD (Grupo Confirmatorio). Una respuesta positiva de RT-QuIC se clasificó como un valor de unidad de fluorescencia relativa (rfu) de >2DE por encima de la media de los controles negativos a las 120 horas en al menos uno de los duplicados de CSF.

Exploratorio	Número de RT-QuIC Positivos (%) usando 5µl	Número de RT-QuIC Positivos (%) usando 10µl	Número de RT-QuIC Positivos (%) usando 15µl
AD con LB incidental (13)	2 (15%)	4 (31%)	2 (15%)
Controles Sanos (20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
DLB/AD Mixto (17)	9 (53%)	11 (65%)	11 (65%)
Enfermedad de Parkinson (2)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
Parálisis Supranuclear Progresiva (2)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Degeneración corticobasal (3)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
AD puro (30)	2 (7%)	1 (3%)	0 (0%)
DLB puro (12)	10 (83%)	11 (92%)	11 (92%)
Sensibilidad (DLB)	83%	92%	92%
Especificidad (vs controles)	100%	100%	100%
Especificidad (vs AD)	93%	97%	100%
Especificidad (vs Controles + AD)	96%	98%	100%
Confirmatorio			Número de RT-QuIC Positivos (%) usando 15µl
Enfermedad de Parkinson (20)	/	/	19 (95%)

Pacientes con PD en riesgo (3)	/	/	3 (100%)
Controles de la enfermedad de Parkinson (15)	/	/	0 (0%)
Sensibilidad (PD)	/	/	95%
Especificidad	/	/	100%

[0094] La segunda fase del estudio fue aplicar estas condiciones analíticas y criterios de corte a un conjunto de muestras confirmatorias in vivo de CSF de 20 pacientes con PD diagnosticado clínicamente, 15 pacientes de control y 3 pacientes con trastorno del comportamiento del sueño REM (RBD) reconocidos por tener alto riesgo de desarrollar futuras alfa-sinucleinopatías, obtenidas de la gran cohorte prospectiva OPDC Discovery. Estas muestras de CSF fueron codificadas, analizadas y reportadas sin conocimiento previo del diagnóstico final. Después de que las muestras fueron decodificadas, los resultados mostraron que 19 de los 20 pacientes con PD tenían una respuesta positiva de RT-QuIC (Fig. 9), y ninguno de los 15 controles se encontró que fuera positivo. Esto resultó en una sensibilidad y especificidad de RT-QuIC para PD de 95% y 100% respectivamente (Tabla 2). Curiosamente, los tres pacientes en riesgo de desarrollar PD tuvieron una respuesta positiva en RT-QuIC. Estos pacientes tenían RBD, de los cuales se ha demostrado que el 80% progresa para desarrollar un trastorno de cuerpos de Lewy.

Beneficios Terapéuticos

[0095] El diagnóstico temprano tanto de DLB como de PD se ve obstaculizado por la falta de pruebas de diagnóstico clínico sensibles y confiables. Ambas condiciones están sustentadas por la deposición neuropatológica de una forma agregada de a-syn que se libera en el CSF. La capacidad de la a-syn agregada para inducir mayor agregación de a-syn no agregada de forma cíclica se ha explotado para desarrollar una técnica que puede detectar

a-syn anormal de CSF en DLB y PD con una sensibilidad de 92% y 95% respectivamente con 100% de especificidad. De manera única, 3 pacientes con RBD que se encontró estaban en alto riesgo futuro de desarrollar un trastorno de cuerpos de Lewy dieron una respuesta positiva a RT-QuIC, sugiriendo que esta prueba podría usarse como una prueba de diagnóstico temprano para el PD prodrómico. Futuros trabajos enfocados en la validación de pruebas en una cohorte mayor de pacientes con RBD, seguidos por una evaluación longitudinal continua, probarán la utilidad del ensayo en la estratificación de riesgos de aquellos individuos prodrómicos más en riesgo de conversión temprana a PD en quienes se podrían ensayar terapias neuroprotectoras. Las muestras de CSF de pacientes con CBD y PSP no dieron respuestas positivas a RT-QuIC. Estos son trastornos del movimiento asociados con anomalías en la proteína tau en lugar de a-syn que pueden confundirse con PD en las primeras etapas. Por lo tanto, RT-QuIC ofrece un nuevo enfoque a la detección de a-syn anormal y uno que tiene el potencial de mejorar el diagnóstico clínico temprano de PD y DLB además de otras alfa-sinucleinopatías como MSA.

El papel de las perlas en un ensayo modificado de RT-QuIC para la detección de alfa-sinucleína

[0096] Con referencia a las Figuras 10-13, para mostrar el papel que juegan las perlas utilizadas en los ensayos anteriores, se llevaron a cabo ensayos en paralelo para muestras de Homogeneizado de Cerebro (BH) de Muerte Súbita (SD) A) con perlas y B) sin perlas, muestras de BH de Demencia con Cuerpos de Lewy A) con perlas y B) sin perlas, muestras de líquido cefalorraquídeo (CSF) de Enfermedad de Parkinson A) con perlas y B) sin perlas, y muestras de CSF de Demencia con Cuerpos de Lewy A) con perlas y B) sin perlas. Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando el mismo método general descrito anteriormente. Como puede verse a partir de la Figura 10, no se observó ninguna lectura para las muestras de SD. Además, aquellas muestras con Enfermedad de Cuerpos de Lewy y Enfermedad de Parkinson sin perlas (Figura 11B, Figura 12B o Figura 13B) no mostraron lectura. Sin embargo, se ven claramente lecturas para aquellas muestras con Enfermedad de Cuerpos de Lewy o Enfermedad de Parkinson con las perlas. Por lo tanto, la presencia de las perlas es vital para la capacidad de detectar la presencia de agregados de a-syn usando RT-QuIC.

[0097] Con referencia a la Figura 14, se investigó el efecto de la concentración de perlas usando muestras de homogeneizado de cerebro de Demencia con Cuerpos de Lewy. Las muestras sin perlas presentes en la mezcla de reacción mostraron una señal fluorescente constante, indicando un resultado negativo en RT-QuIC. En contraste, las muestras con 18,7 mg de perlas por pozo y 37,5 mg de perlas por pozo dieron un aumento claro en la fluorescencia y la mayor concentración de perlas dio una señal más clara y más temprana.

[0098] Por lo tanto, es claro que la presencia de las perlas en la mezcla de reacción es crucial para que se obtenga una señal para la detección de agregados de alfa-sinucleína.

EJEMPLOS

1. Reacciones de a-syn RT-QuIC usando perlas de circonia/sílice de 0,1mm, 0,5mm y 2,3mm (aprox. 37 ± 3 mg) y sembradas con BHs

[0099] Reacciones de RT-QuIC con la adición de 37mg de perlas de 0,1mm, 0,5mm o 2,3mm fueron sembradas con 5µL de dilución a 1:200,000 de BH idénticos de sujetos de control (SDBH), pacientes con enfermedad de cuerpos de Lewy (LBDBH), Enfermedad de Alzheimer (ADBH) o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJDBH) o no sembradas. Las respuestas de a-syn RT-QuIC obtenidas con perlas de circonia/sílice de 0,1mm se muestran en la Fig. 15A, aquellas con perlas de circonia/sílice de 0,5mm se muestran en la Fig. 15B y aquellas con perlas de circonia/sílice de 2,3mm se muestran en la Fig. 15C.

[00100] Puede verse a partir de las Figs. 15A, B, C que el aumento del tamaño de las perlas de circonia/sílice da como resultado un aumento en el tiempo que se toma para provocar una respuesta positiva en a-syn RT-QuIC con reacciones sembradas con LBDBH. Sin embargo, a pesar de tener un tiempo de respuesta más rápido usando perlas de circonia/sílice de 0,1mm, el a-syn RT-QuIC dio reacciones positivas con reacciones sembradas con ADBH.

2. Reacciones de a-syn RT-QuIC usando perlas de circonia/sílice de 0,1mm, 0,5mm y 2,3mm (aprox. 37 ± 3 mg) y sembradas con muestras de CSF

[00101] Reacciones de RT-QuIC con la adición de 37mg de perlas de 0,1 mm, 0,5 mm o 2,3 mm fueron sembradas con 15µL de muestras de CSF de pacientes con enfermedad de Cuerpos de Lewy (LB) o de sujetos de control. Las respuestas de a-syn RT-QuIC obtenidas con perlas de circonia/sílice de 0,1 mm se muestran en la Fig. 16A, aquellas con perlas de circonia/sílice de 0,5 mm se muestran en la Fig. 16B y aquellas con perlas de circonia/sílice de 2,3 mm se muestran en la Fig. 16C.

[00102] El uso de perlas de circonia/sílice de 0,1 mm y 0,5 mm dio como resultado reacciones positivas en a-syn RT-QuIC sembradas con muestras de CSF de LB pero no con muestras de CSF de control. En contraste, el uso de perlas de circonia/sílice de 2,3 mm no respaldó las reacciones de a-syn RT-QuIC sembradas con muestras de CSF de pacientes con LB. Se utilizaron muestras de CSF idénticas en los experimentos ilustrados en la Fig. 16A, B y C.

[00103] Los resultados de los experimentos ilustrados en las Fig. 15 y 16 demuestran que el uso de circonia/sílice de 2,3 mm no acelera la reacción de a-syn RT-QuIC sembrada ya sea por BH o CSF de pacientes con LB. Los resultados de reacciones de a-syn RT-QuIC utilizando ya sea las perlas de circonia/sílice de 0,1 mm o de 0,5 mm fueron similares, aunque las reacciones de a-syn RT-QuIC utilizando las perlas de circonia/sílice de 0,1 mm resultaron en que ADBH indujo una reacción positiva. Manejar perlas de circonia/sílice de 0,1 mm fue difícil ya que el tamaño tan pequeño significaba que eran más propensas a la estática que las circonia/sílice más grandes de 0,5 mm.

3. Reacciones de a-syn RT-QuIC utilizando perlas de acero de 0,5 mm y perlas de vidrio de 0,5 mm sembradas con BHs

[00104] Reacciones de RT-QuIC con la adición de 37 mg de perlas de acero o vidrio de 0,5 mm fueron sembradas con 5µL de dilución a 1:200,000 de BH idénticos de sujetos de control (SDBH), pacientes con enfermedad de cuerpos de Lewy (LBDBH) y Enfermedad de Alzheimer (ADBH) y comparadas con aquellas reacciones que se dejaron sin sembrar. Las reacciones de a-syn RT-QuIC usando perlas de acero de 0,5 mm se muestran en la Fig. 17A y aquellas para perlas de vidrio se muestran en la Fig. 17B.

[00105] El uso de perlas de acero de 0.5mm no respalda las reacciones de a-syn RT-QuIC sembradas con LBDBH. En contraste, el uso de perlas de vidrio de 0,5 mm sí resulta en reacciones positivas de a-syn RT-QuIC sembradas con LBDBH, sin embargo, las reacciones no sembradas y las reacciones sembradas con ADBH muestran un aumento gradual en la fluorescencia que resulta en una falta de una línea base estable.

4. Reacciones de a-syn RT-QuIC utilizando perlas de acero de 0,5mm y perlas de vidrio de 0,5mm sembradas con muestras de CSF

[00106] Reacciones de RT-QuIC con la adición de 37mg de perlas de acero o vidrio de 0,5 mm fueron sembradas con 15µL de muestras de CSF de pacientes con enfermedad de Cuerpos de Lewy (LB) o de sujetos de control. Las reacciones de a-syn RT-QuIC sembradas con CSF utilizando perlas de acero de 0,5 m se muestran en la Fig. 18A y aquellas para perlas de vidrio se muestran en la Fig. 18B. El uso de perlas de acero inhibe la capacidad de las muestras de CSF de pacientes con LB para sembrar el a-syn RT-QuIC, mientras que, en este experimento, el uso de perlas de vidrio resultó en un aumento no específico de la fluorescencia y tampoco respaldó la reacción de a-syn RT-QuIC.

[00107] La conclusión general de los experimentos anteriores es que la adición de 37mg/pozo de perlas de circonia/sílice de 0,5 mm es el mejor promotor de reacciones de a-syn RT-QuIC sembradas ya sea con muestras de BH o CSF de pacientes con LBD.

5. Reacciones de a-syn RT-QuIC utilizando 18 o 37mg de perlas de óxido de circonio, circonia/sílice o vidrio de 1mm sembradas con muestras de CSF

[00108] Reacciones de RT-QuIC con la adición de ya sea 18 o 37mg de perlas de óxido de circonio, circonia sílice, o vidrio de 1 mm fueron sembradas respectivamente con 15µL de muestras de CSF de pacientes con Enfermedad de Parkinson (PD) o de sujetos de control negativos (NPH/Parkinsonismo Vascular, el cual es una no sinucleinopatía). Cada muestra fue corrida por triplicado. Las reacciones de a-syn RT-QuIC sembradas con CSF utilizando 18 o 37 mg de perlas de óxido de circonio de 1mm se muestran en la Fig. 20A o 20B, respectivamente. Las reacciones de a-syn RT-QuIC sembradas con CSF utilizando 18 o 37 mg de perlas de circonia sílice de 1mm se muestran en la Fig. 21A o 21B, respectivamente. Las reacciones de a-syn RT-QuIC sembradas con CSF usando 18 o 37 mg de perlas de vidrio de 1mm se muestran en la Fig. 22A o 22B, respectivamente. El uso de perlas de óxido de circonio, circonia sílice, y vidrio de 1mm resultó en cada caso en una reacción positiva de a-syn RT-QuIC sembrada con muestras de CSF de PD pero no con muestras de CSF de control negativo.

6. Investigación de la capacidad de componentes de sangre de pacientes con Enfermedad de Parkinson (PD) para sembrar la conversión inducida por agitación en tiempo real (RT-QUIC) de alfa-sinucleína (a-syn)

[00109] Se aislaron plaquetas de muestras de sangre anti-coagulada con EDTA de dos pacientes con PD y un sujeto de control. Aumentando la velocidad de agitación de 200rpm a 600rpm y la temperatura de la reacción a 42°C fue posible sembrar la reacción de a-syn RT-QuIC usando 15µL de plaquetas de estos 2 pacientes con PD (Fig. 19). En contraste, las plaquetas del sujeto de control fallaron en sembrar la reacción. Por lo tanto, esto demostró que el método de la invención es efectivo para determinar si una muestra de sangre comprende agregados de a-syn, y por lo tanto para potencialmente diagnosticar si el sujeto del cual se originó la muestra de sangre tiene una alfa-sinucleinopatía como Enfermedad de Parkinson o Demencia con Cuerpos de Lewy.

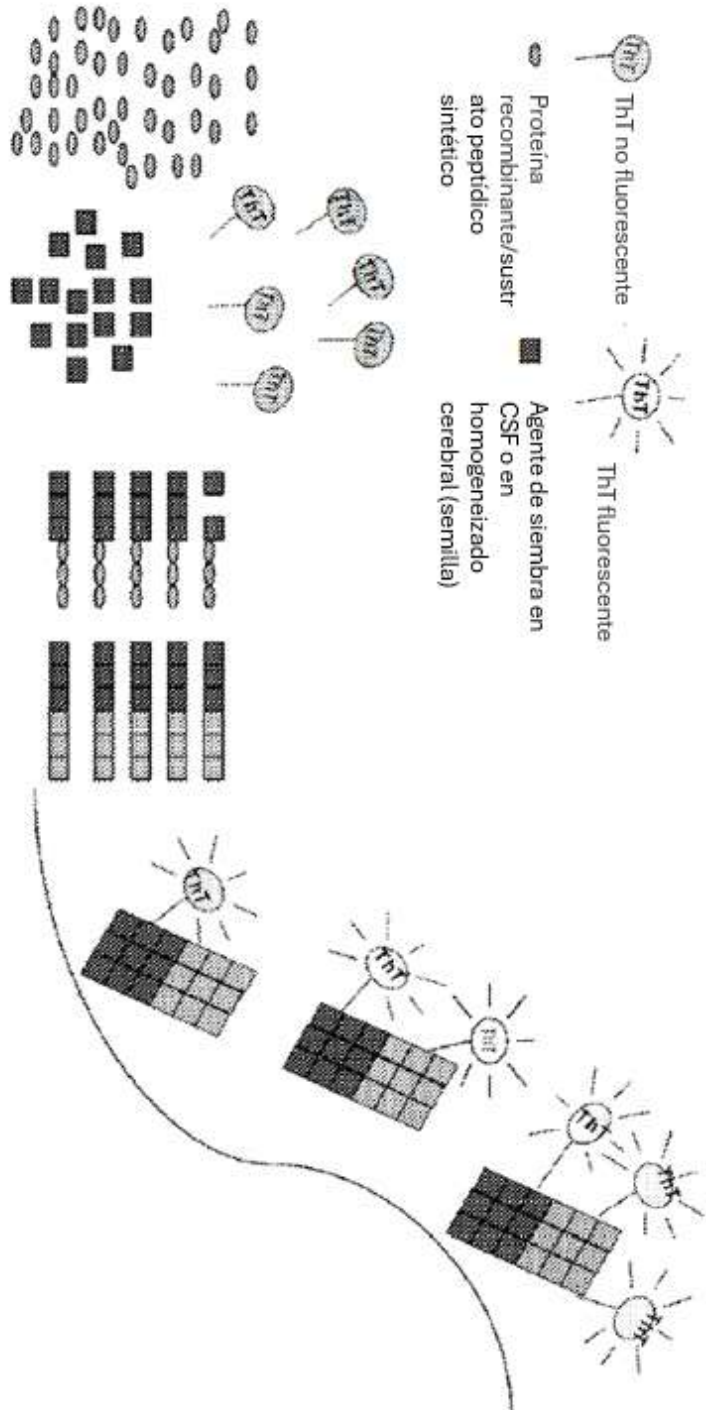


Fig. 1

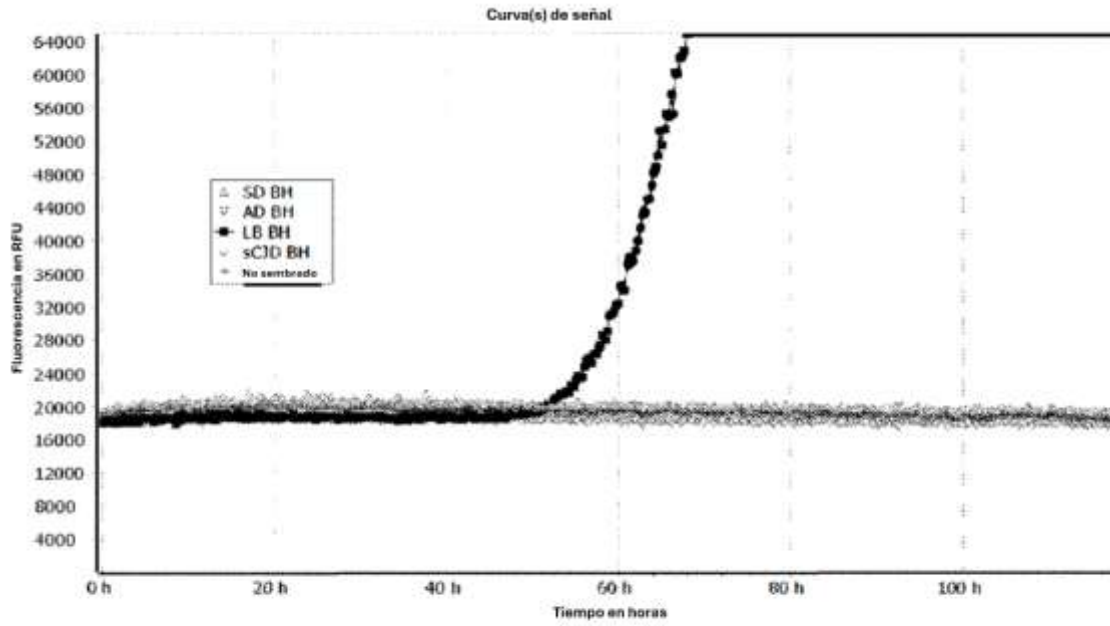


Fig. 2

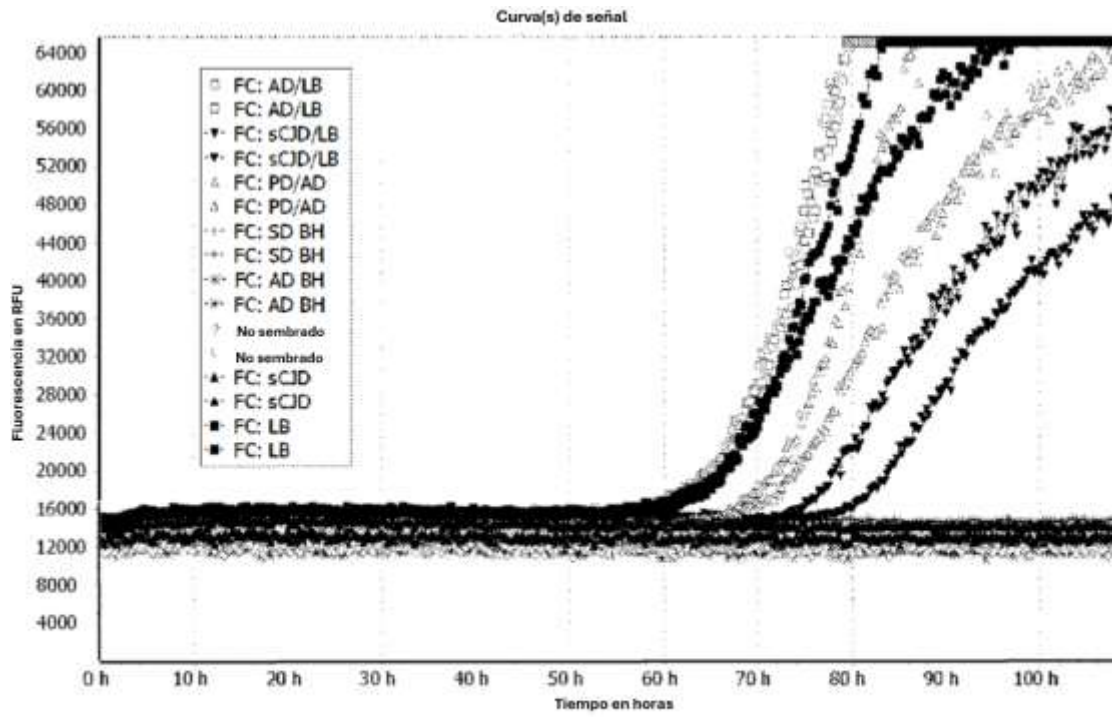


Fig. 3

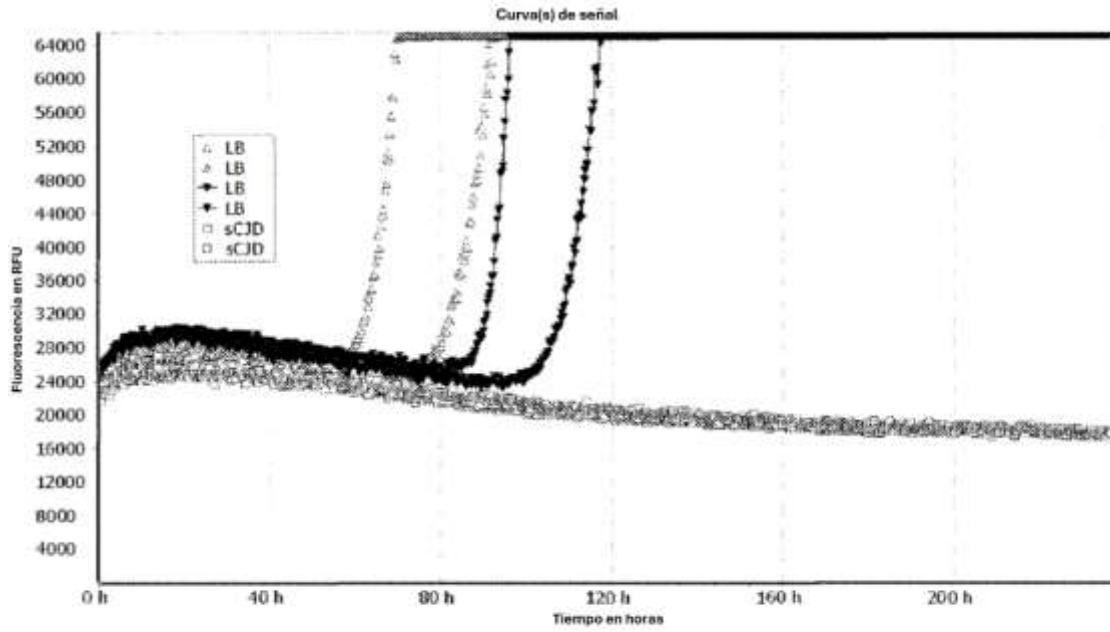


Fig. 4

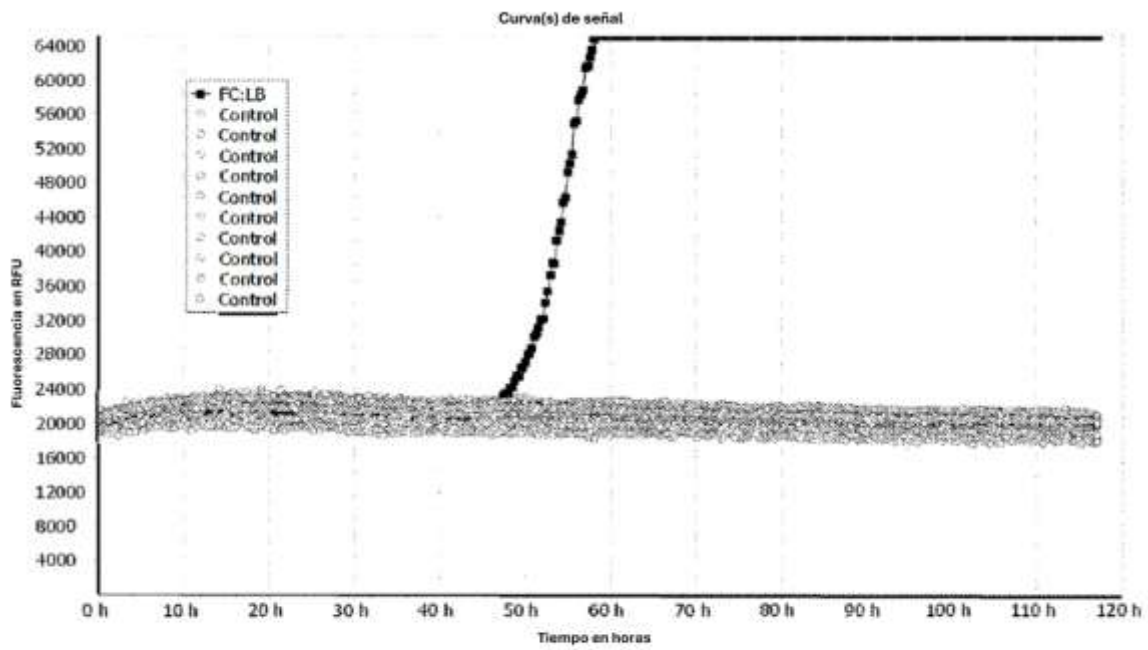


Fig. 5

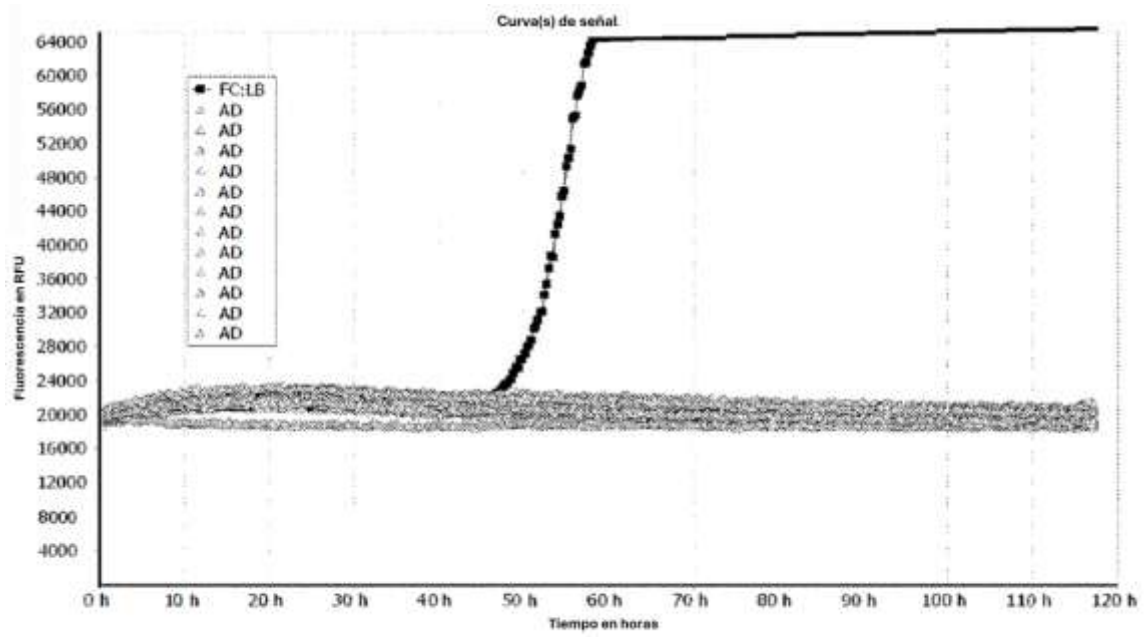


Fig. 6

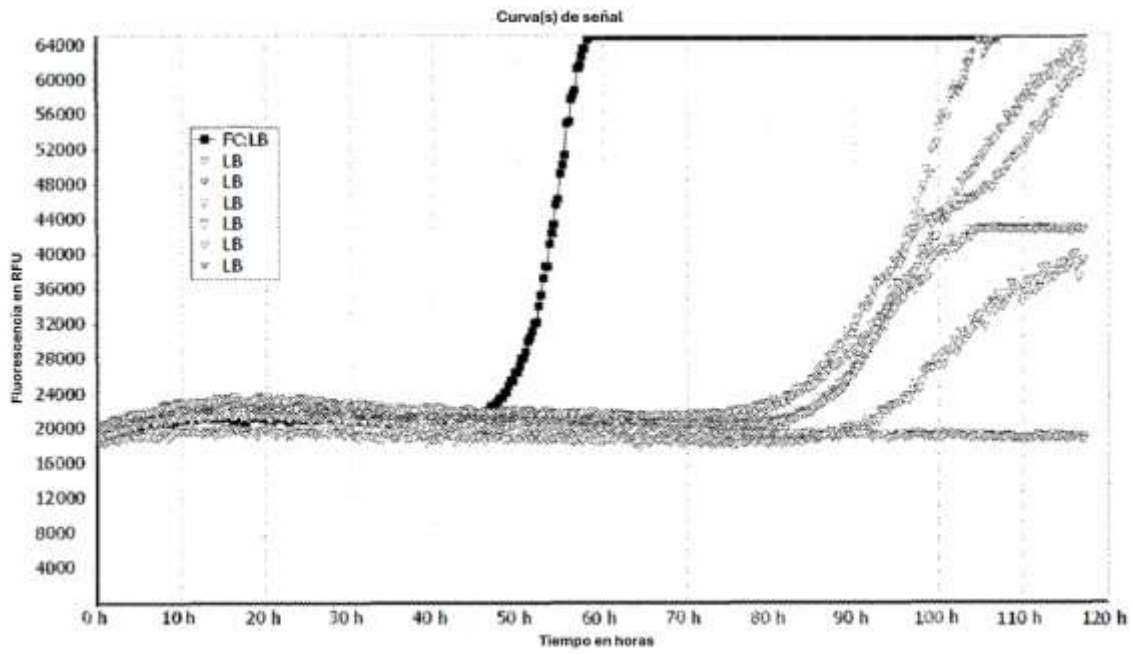


Fig. 7

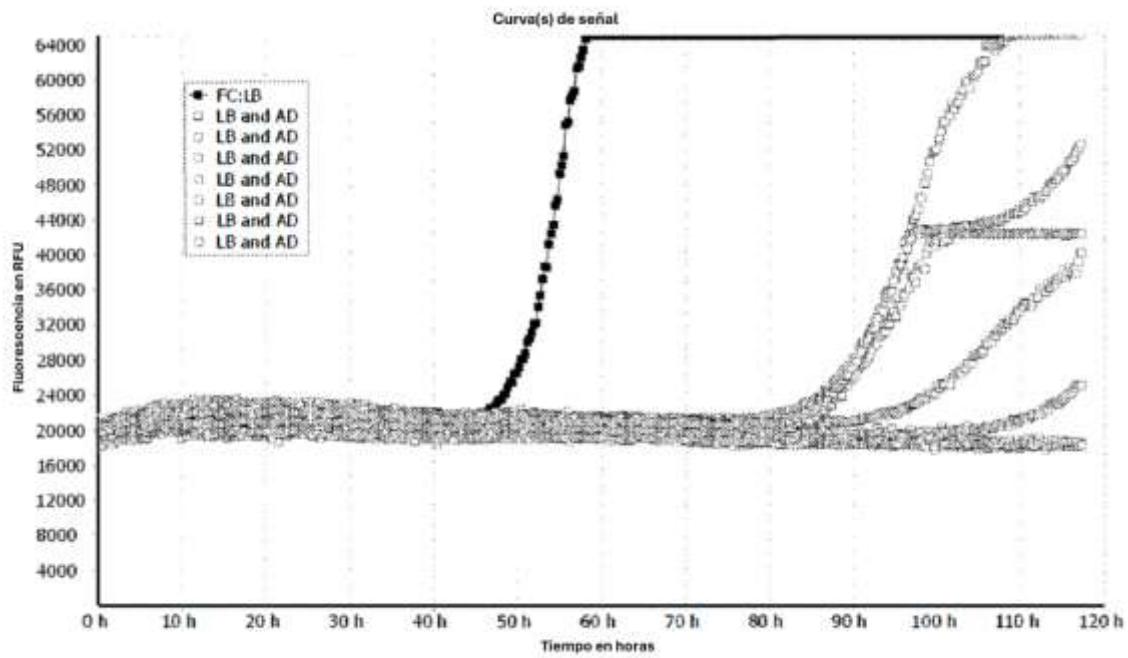


Fig. 8

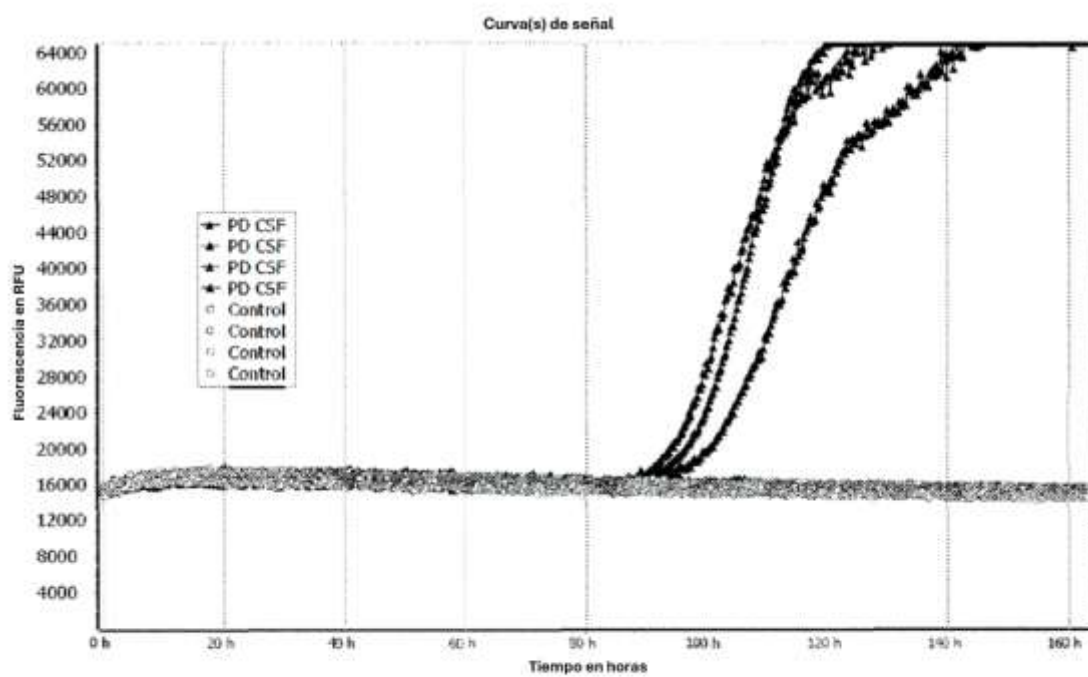


Fig. 9

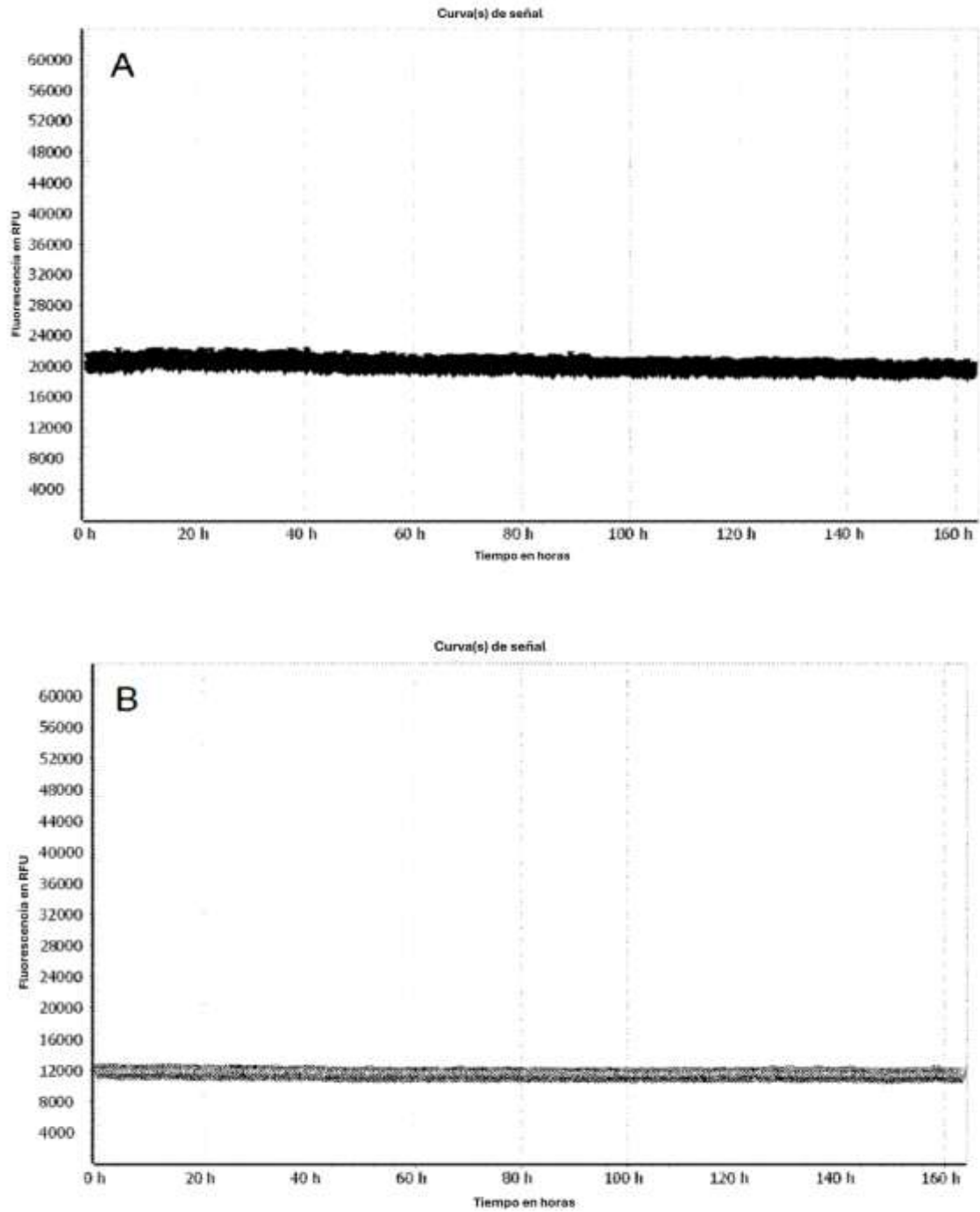


Fig. 10

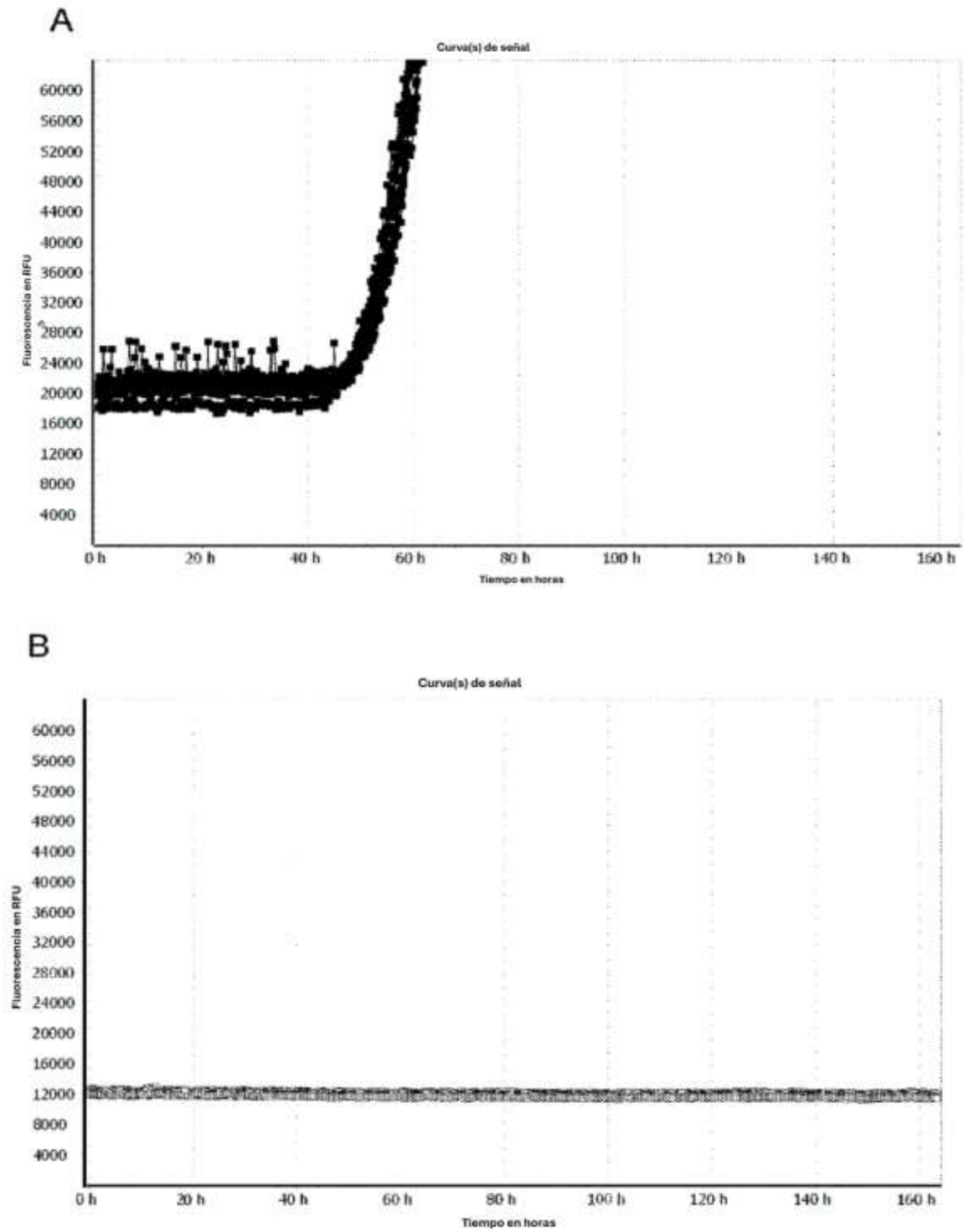


Fig. 11

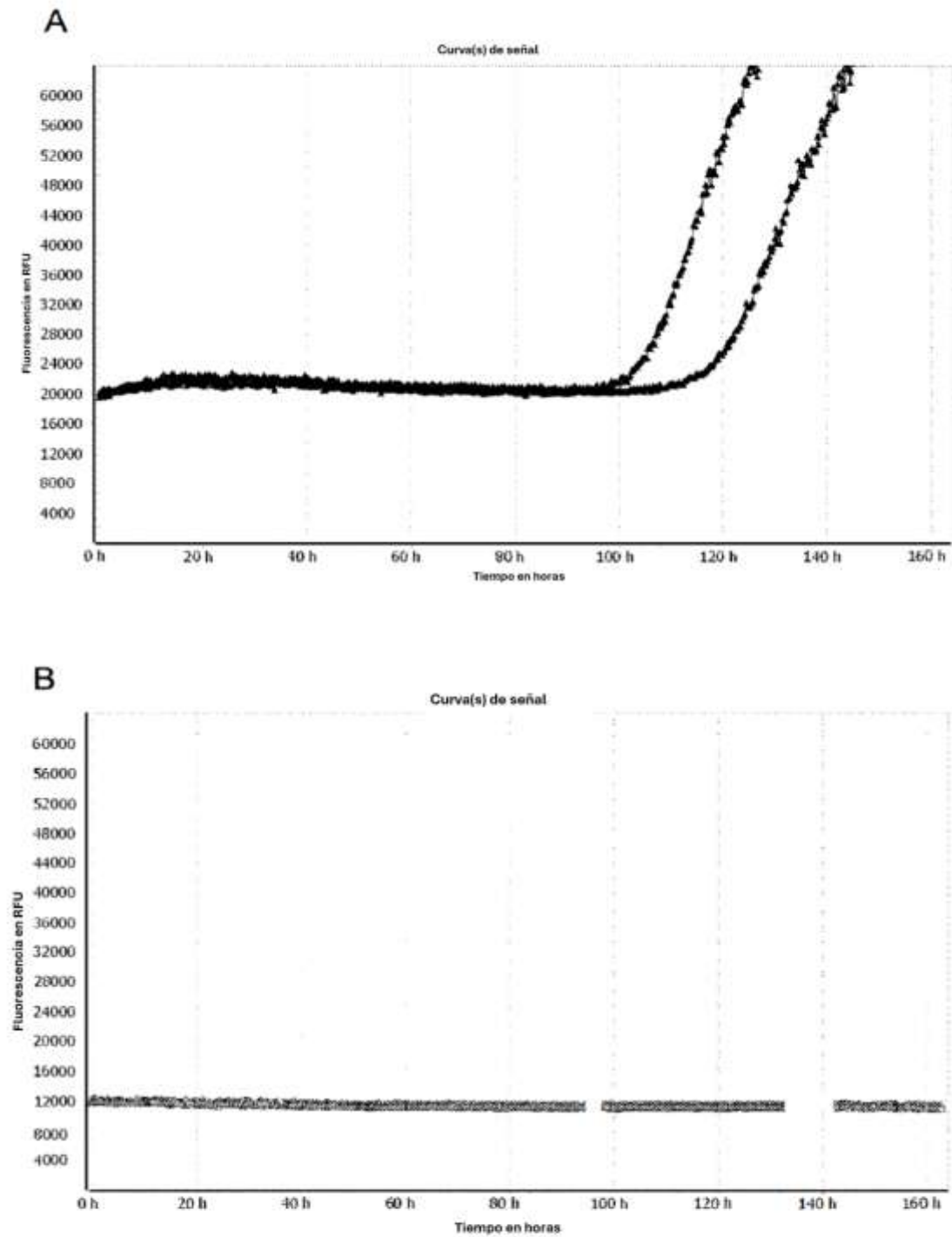


Fig. 12

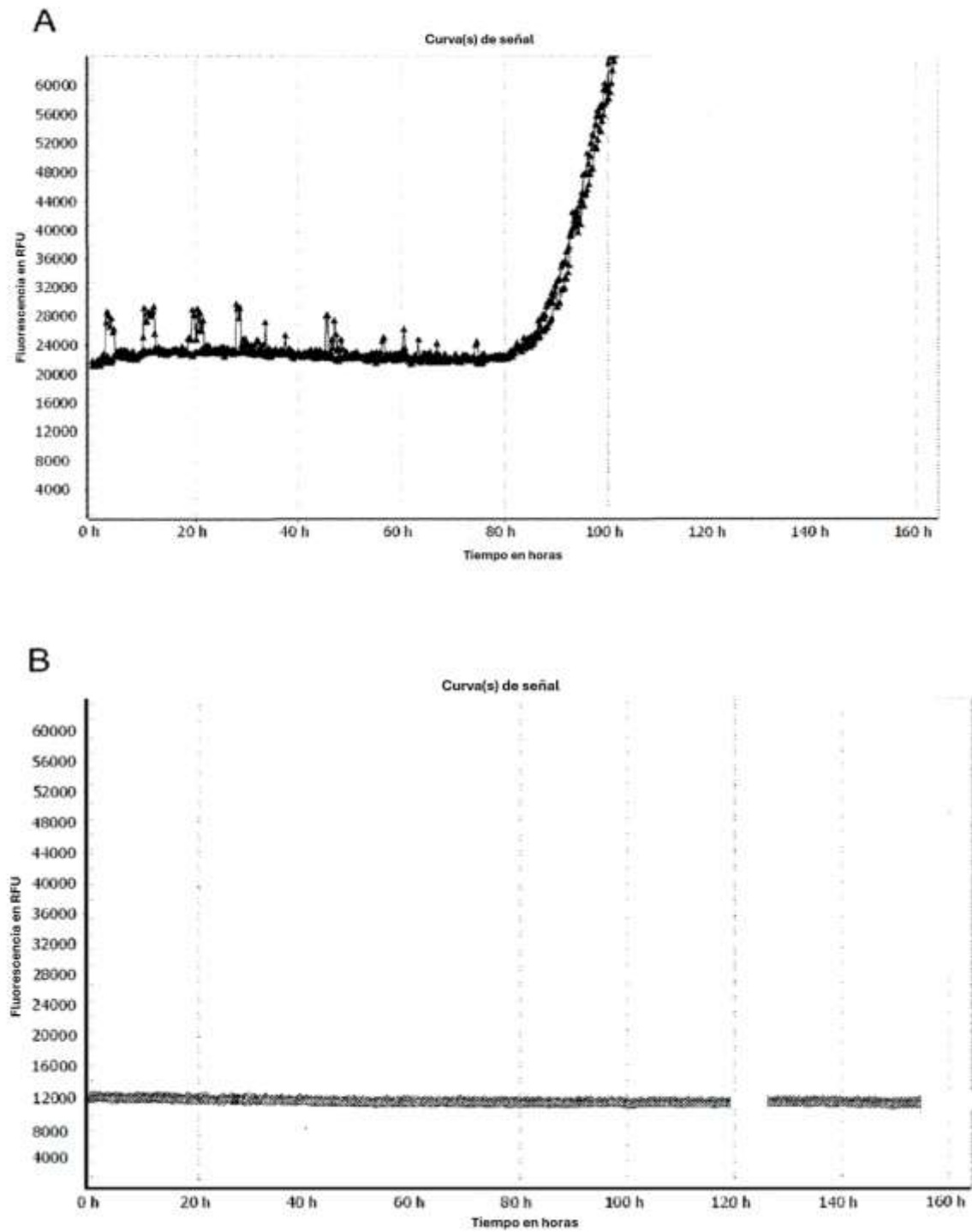


Fig. 13

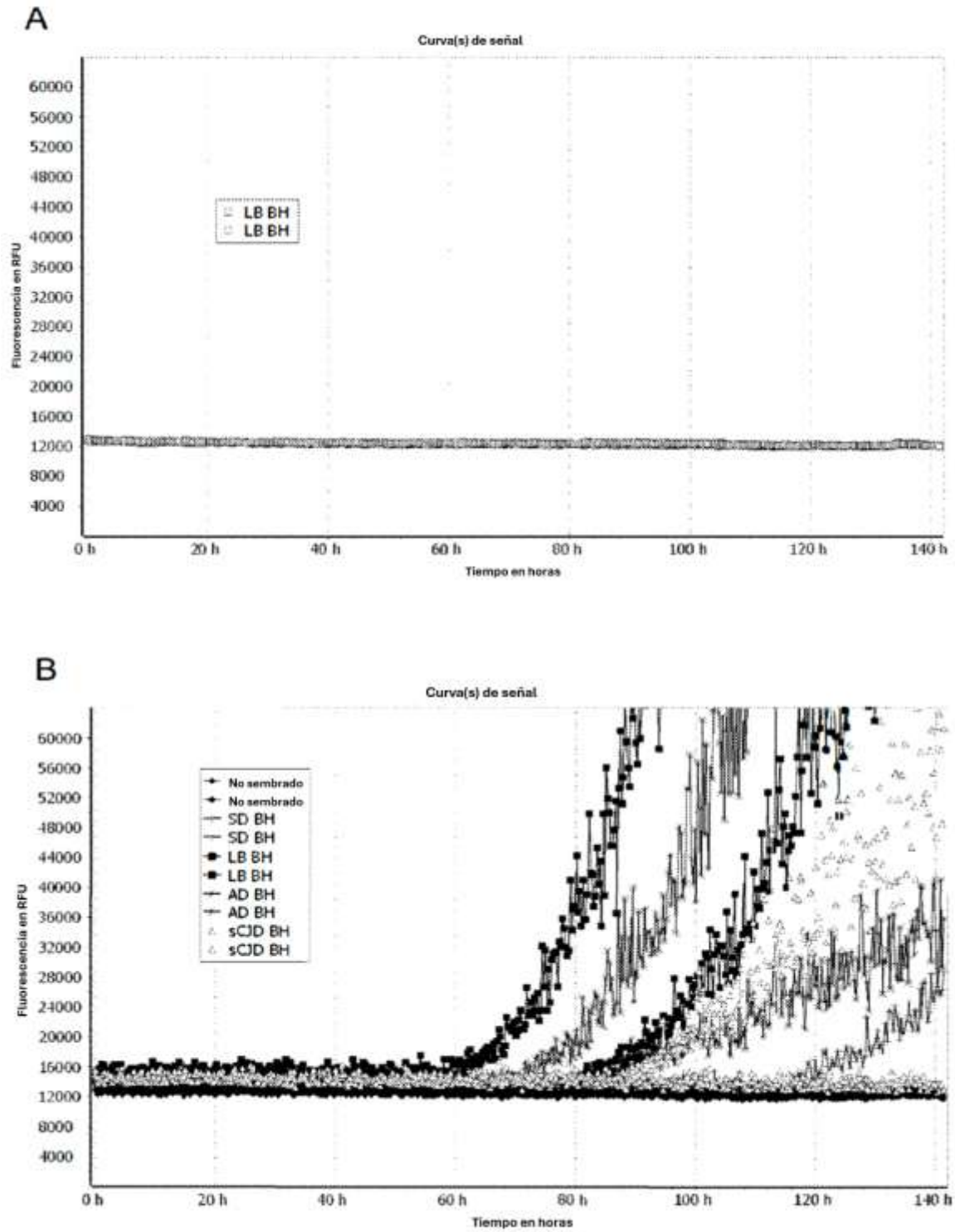


Fig. 14

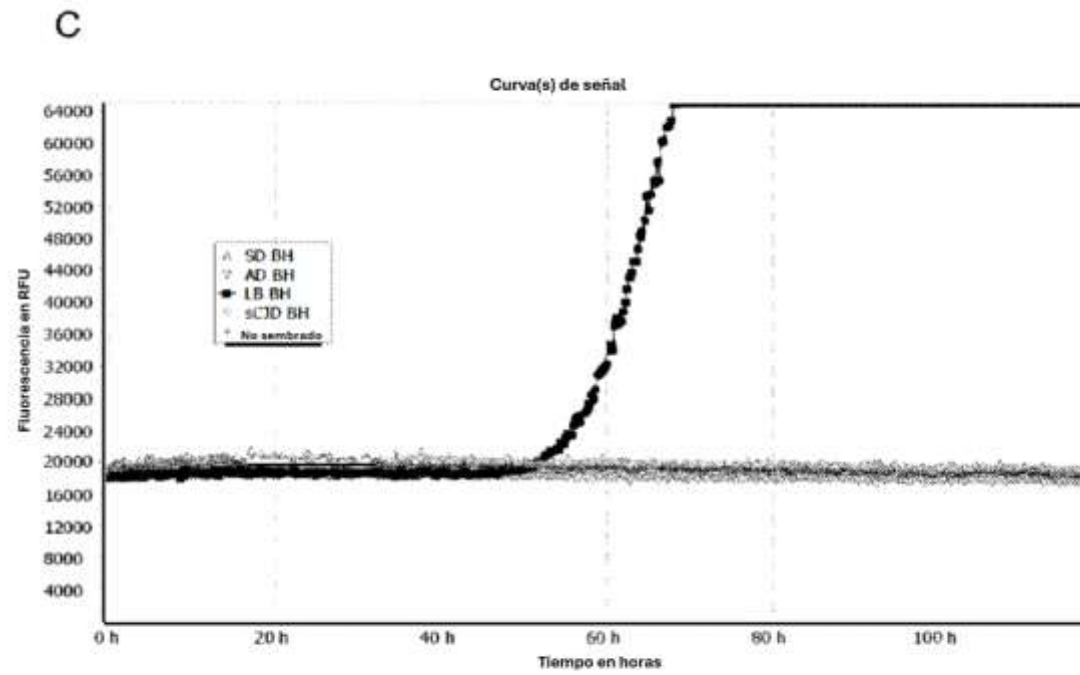


Fig. 14
cont.

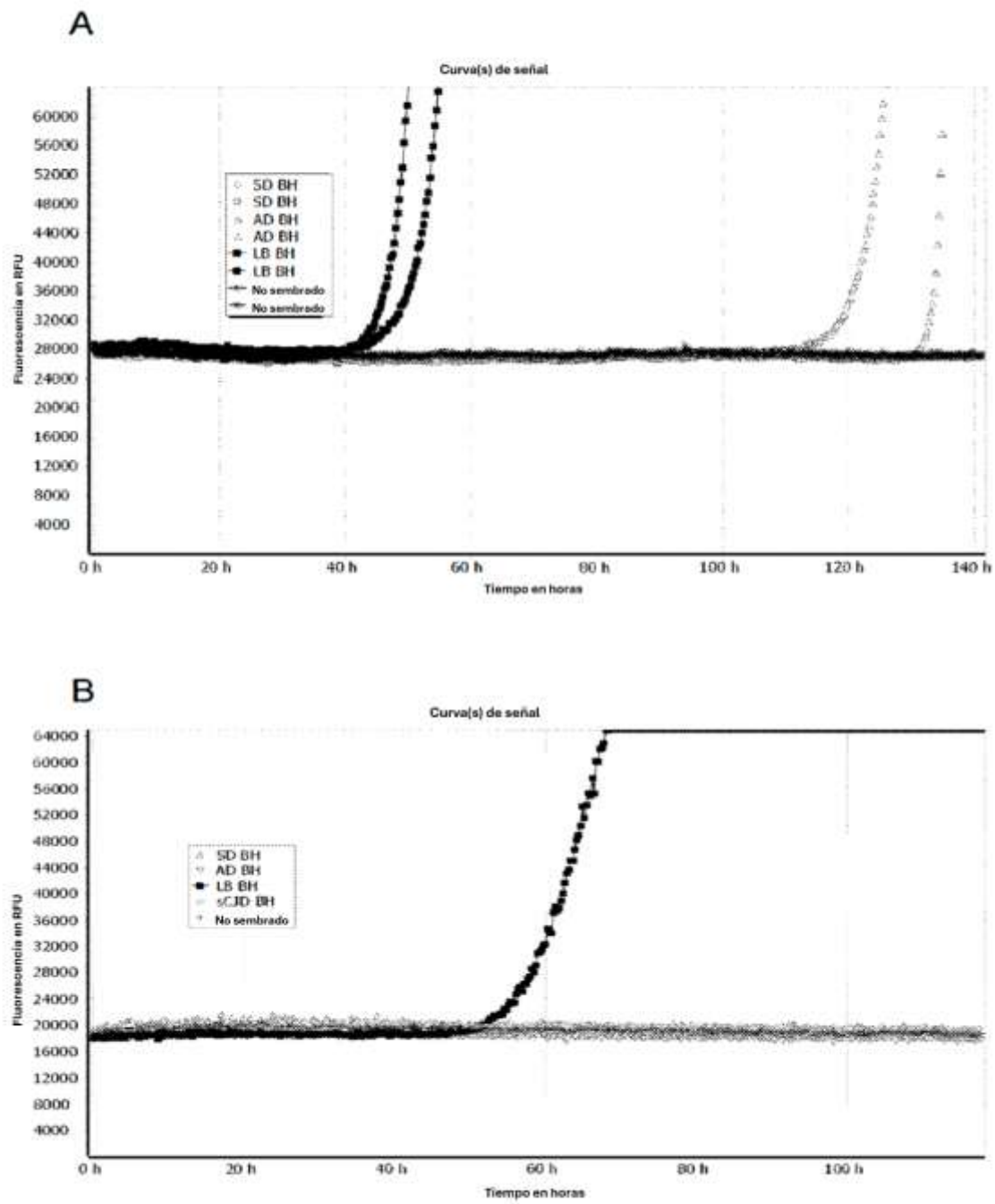


Fig. 15

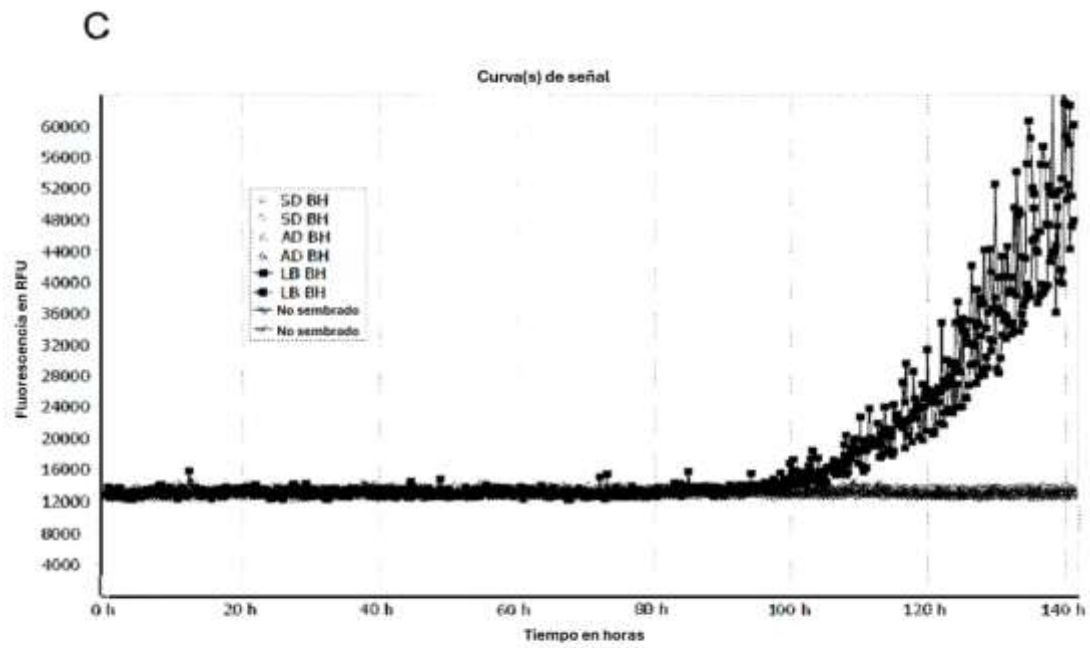


Fig. 15
cont.

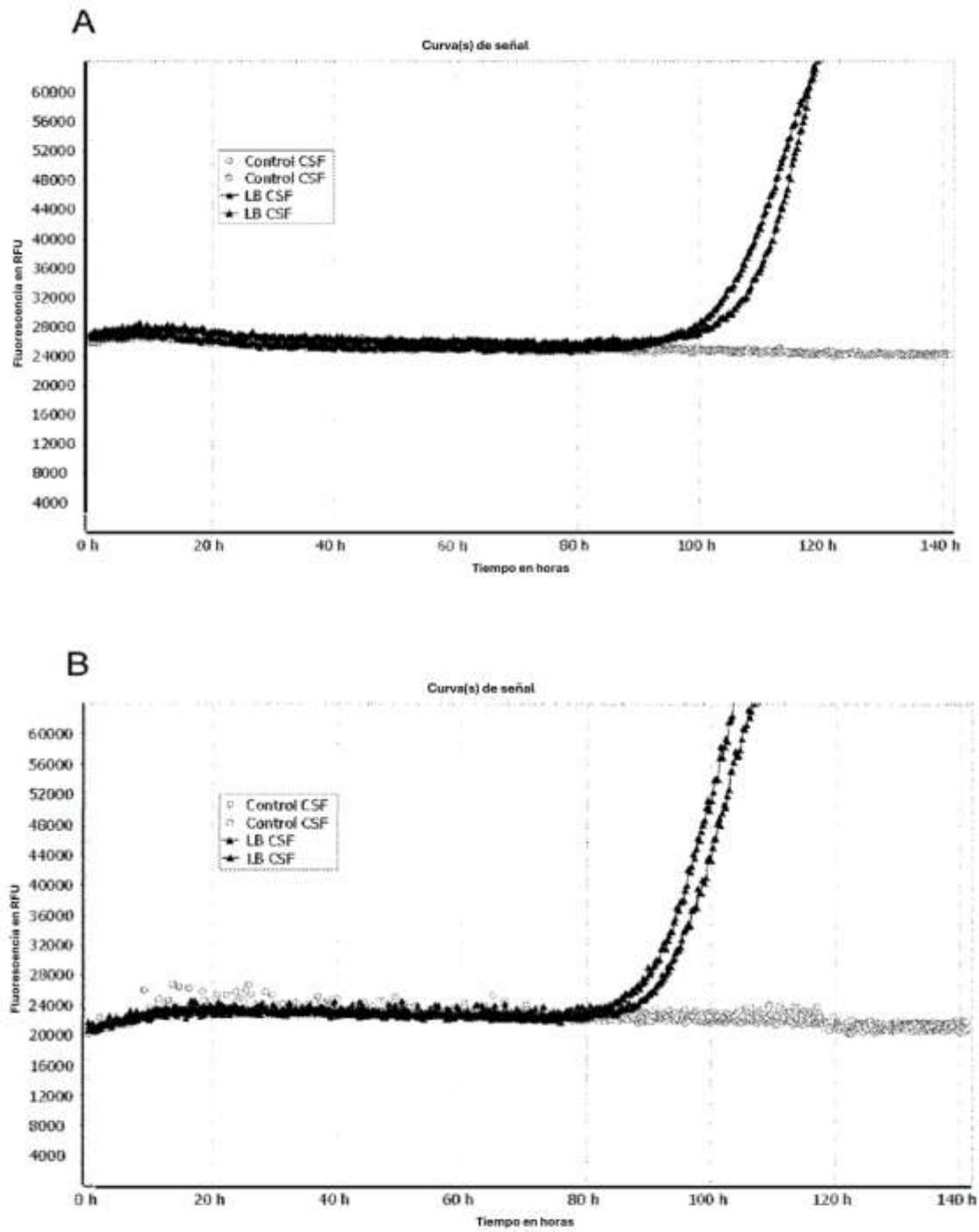


Fig. 16

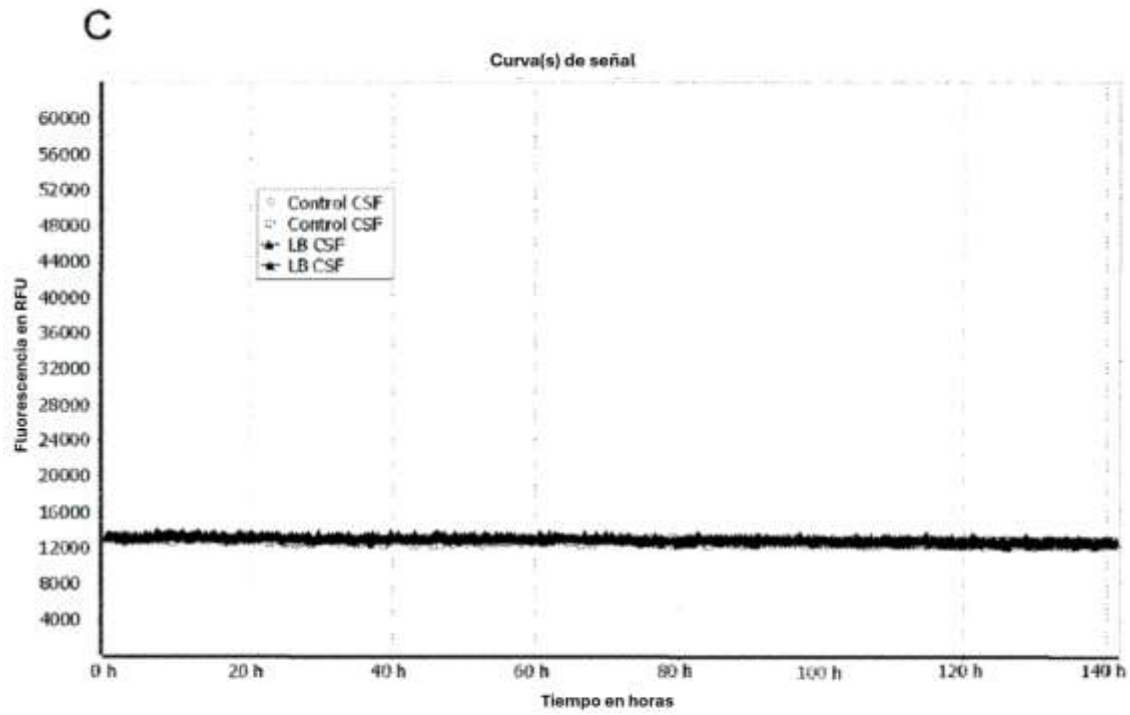


Fig. 16
cont.

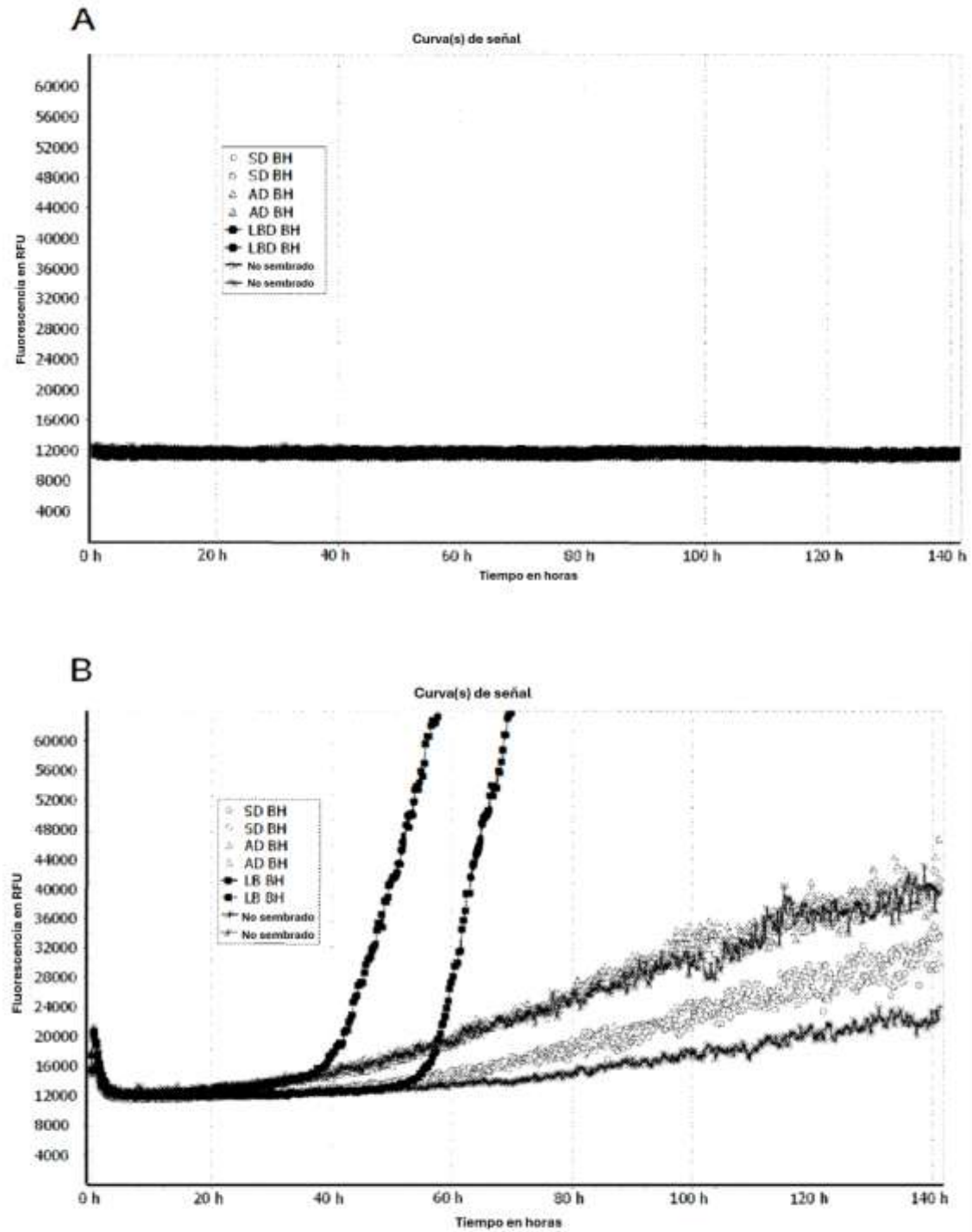


Fig. 17

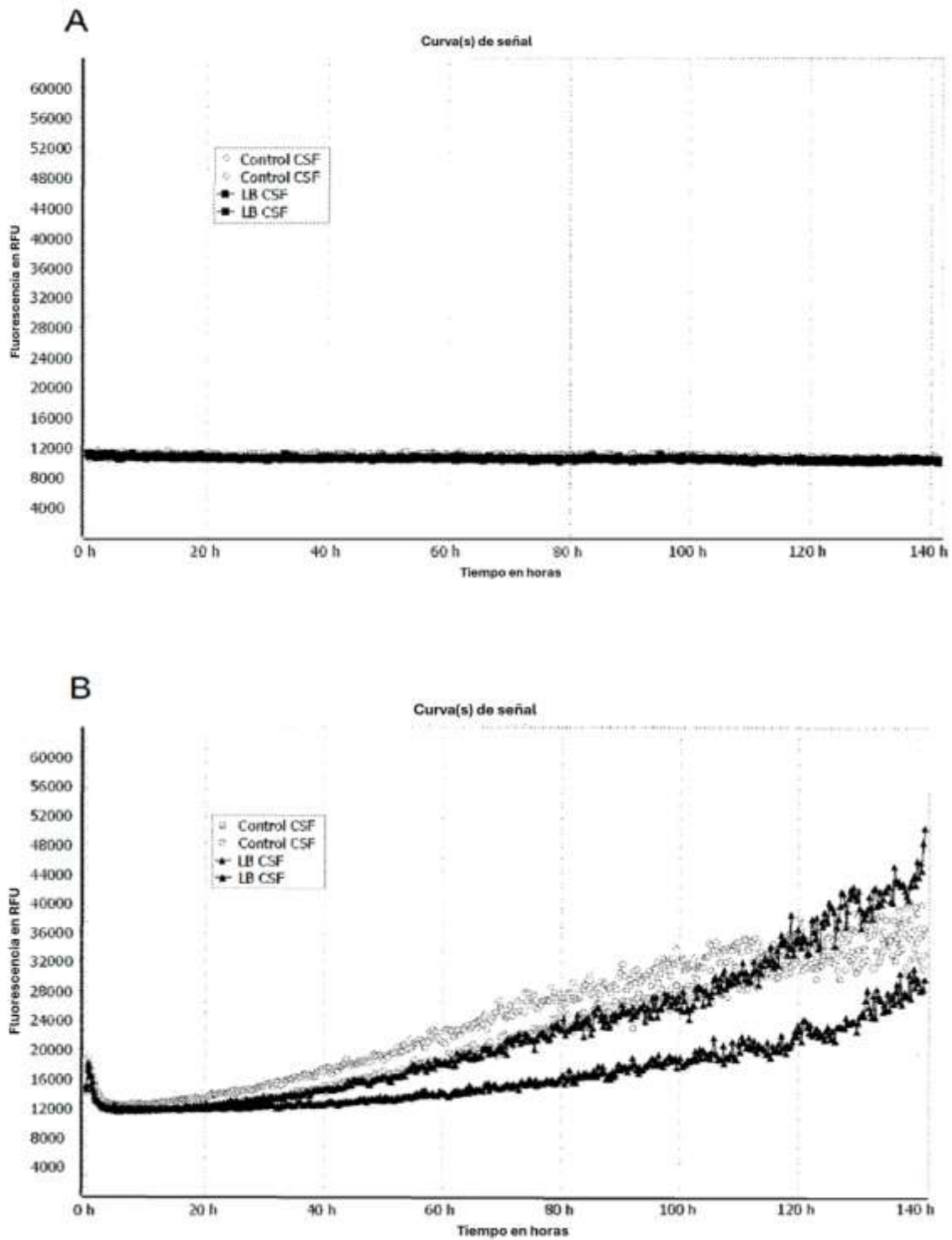


Fig. 18

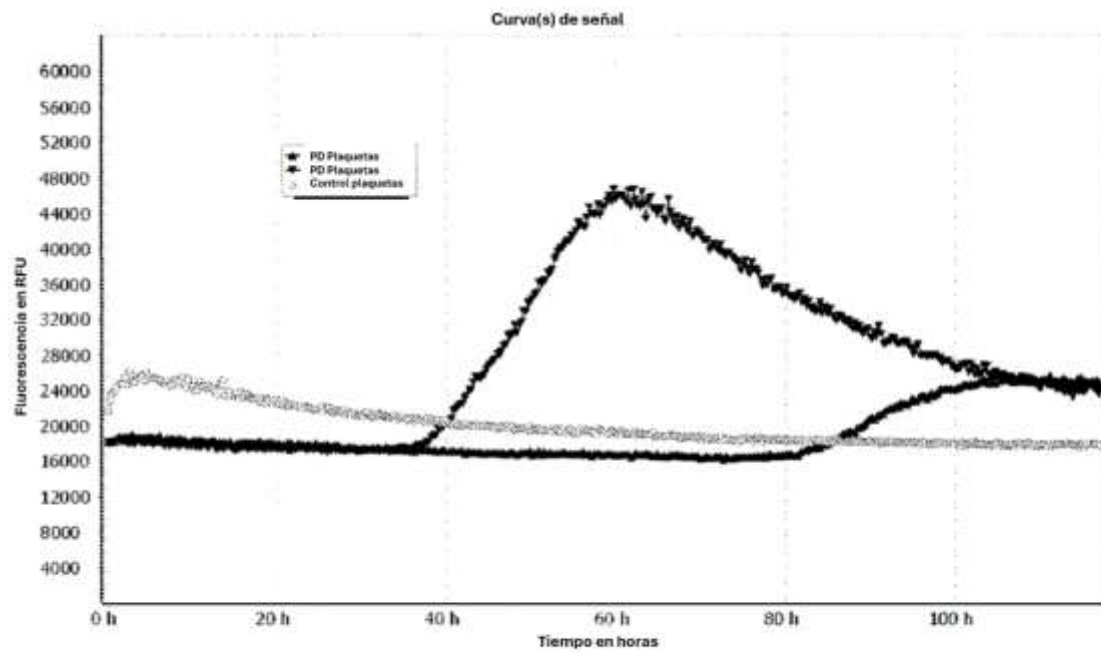


Fig. 19

18 mg 1mm Perlas de óxido de circonio

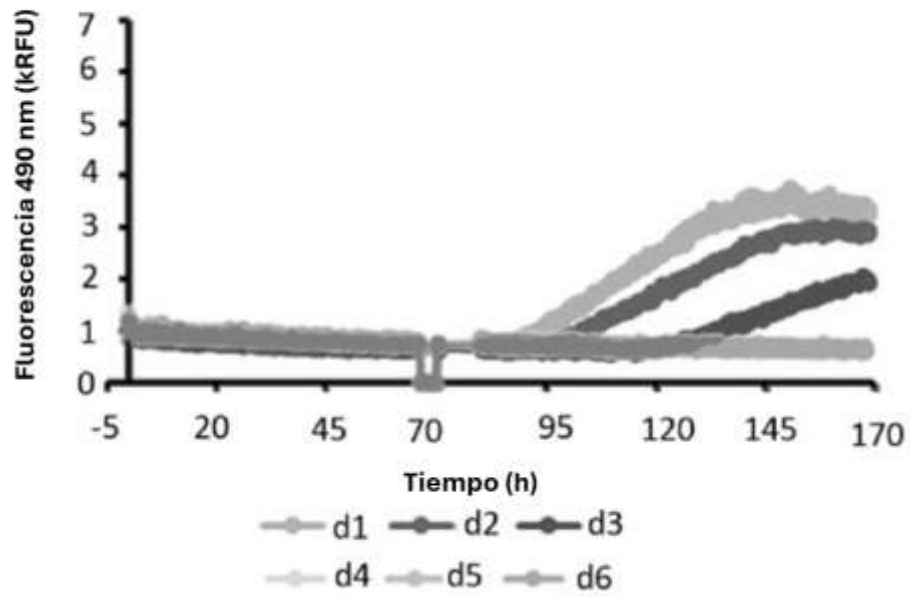


FIG. 20A

37 mg 1mm Perlas de óxido de circonio

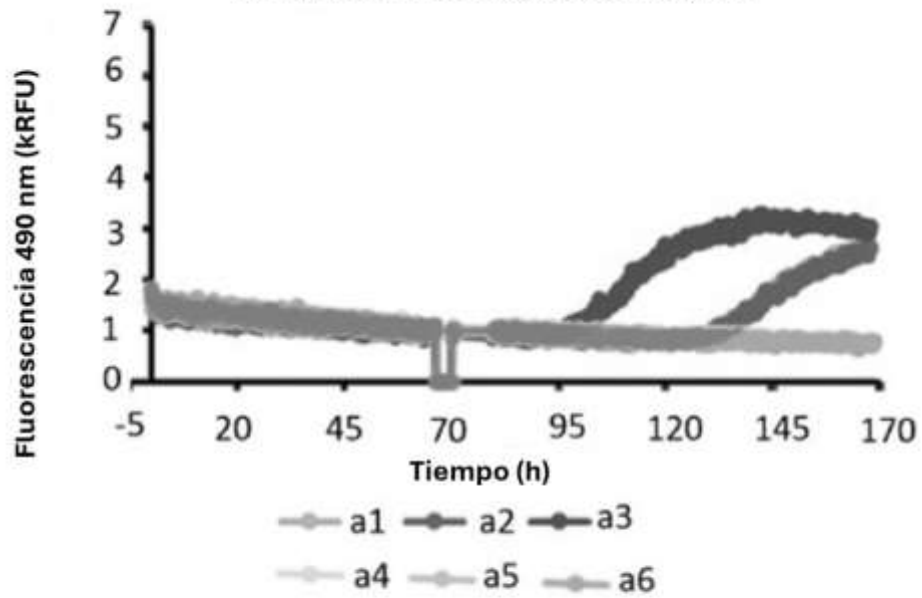


FIG. 20B

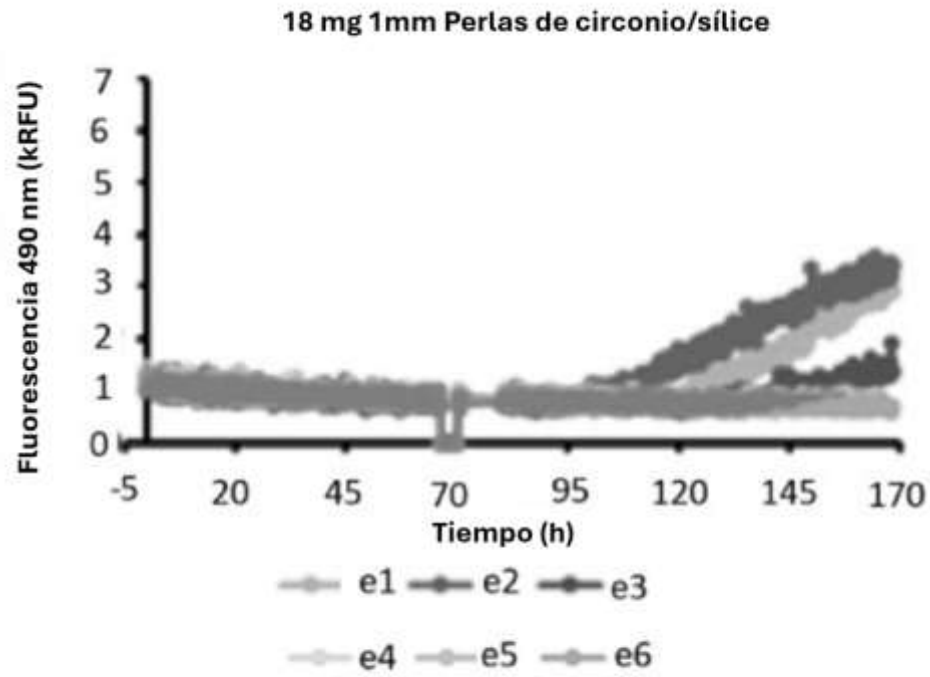


FIG. 21A

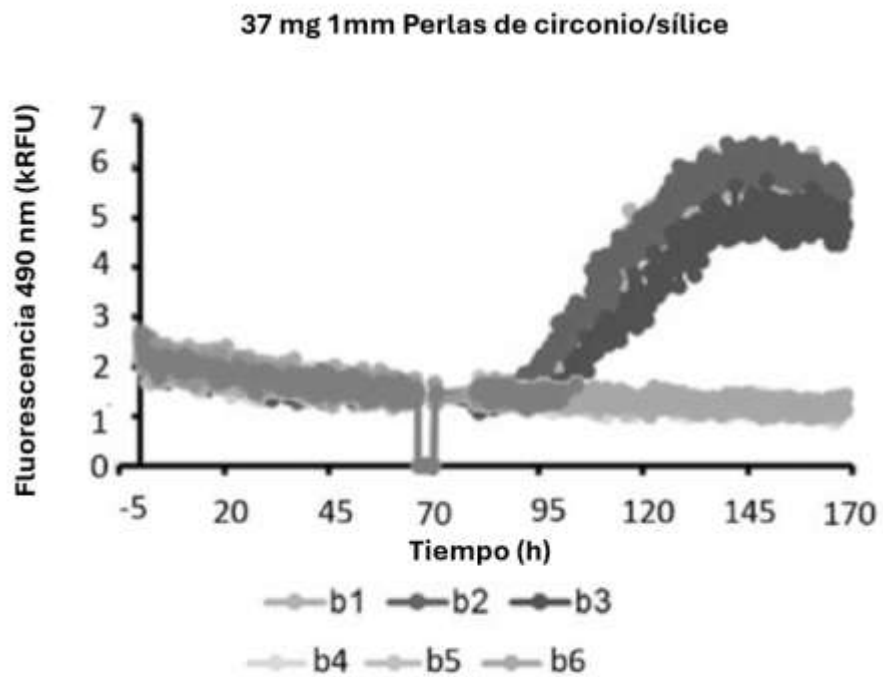


FIG. 21B

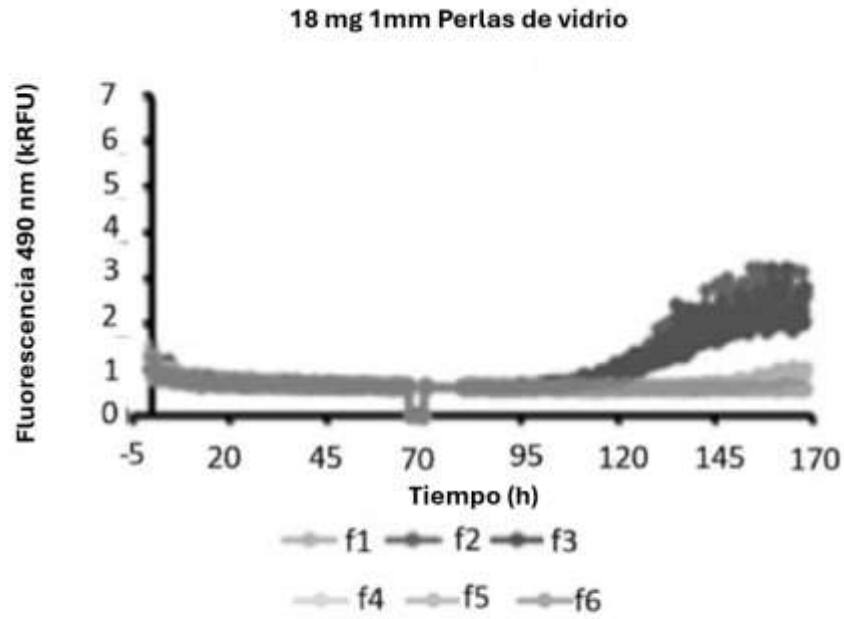


FIG. 22A

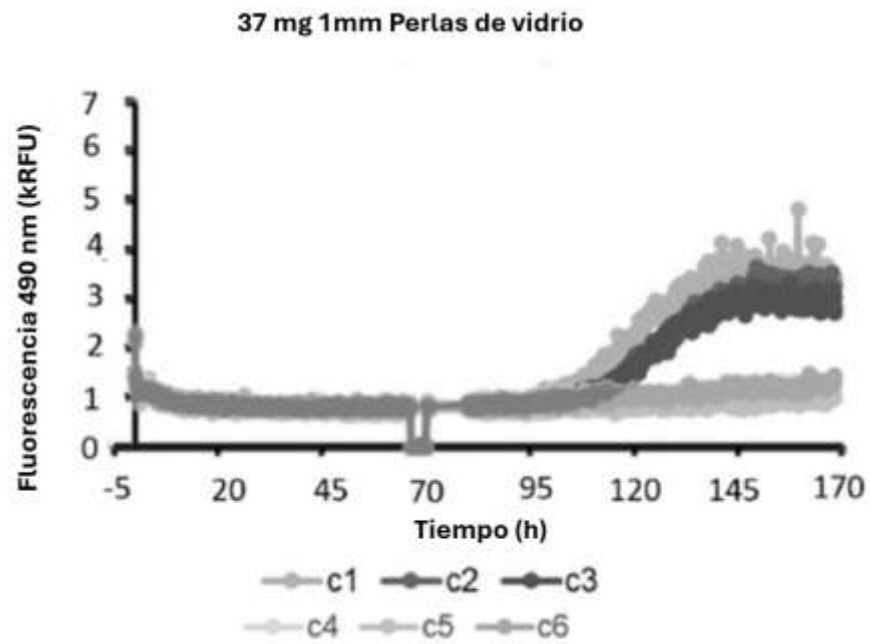


FIG. 22B