

REIVINDICACIONES

1. 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:
 - (a) una población de perlas que comprende vidrio u óxido de circonio y que tiene un diámetro medio de las perlas de $1\text{mm} \pm 10\%$;
 - (b) un fluoróforo que se une a agregados de proteínas y aumenta la fluorescencia cuando se une a agregados de proteínas; y
 - (c) 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.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra biológica es una muestra de fluido corporal.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en líquido cefalorraquídeo, sangre, fracciones de sangre, fluido nasal, tejido nasal, orina, heces y linfa.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra de reacción es una muestra de reacción tamponada.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la muestra de reacción está tamponada para mantener el pH de la muestra de reacción desde pH 6 hasta pH 8,5.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los agregados de proteínas comprenden contenido de lámina beta.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fluoróforo es tioflavina T.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra de reacción comprende desde 0,01 mg/mL de alfa-sinucleína hasta 10 mg/mL de alfa-sinucleína para actuar como un sustrato de agregación.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra de reacción comprende desde 1 mg hasta 150 mg de perlas por 100 μ L de mezcla de reacción.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la presencia de agregados de alfa-sinucleína en la muestra biológica es indicativa de una enfermedad asociada con la agregación anormal de alfa-sinucleína.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción es incubada por más de 40 horas, más de 60 horas, más de 80 horas, o más de 120 horas.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método se lleva a cabo a una temperatura de 25°C a 45°C.
13. 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:
 - (a) una población de perlas, en donde la población de perlas comprende vidrio u óxido de circonio y tienen un diámetro medio de las perlas de $1\text{mm} \pm 10\%$;
 - (b) un fluoróforo que se une a agregados de proteínas y aumenta la fluorescencia cuando se une a agregados de proteínas; y
 - (c) 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.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la alfa-sinucleinopatía es Parkinson o Demencia con Cuerpos de Lewy.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la muestra biológica es una muestra de fluido biológico.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la muestra biológica es un fluido biológico seleccionado del grupo que consiste en líquido cefalorraquídeo, sangre, fracciones de sangre, fluido nasal, tejido nasal, orina, heces y linfa.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la muestra de reacción es una muestra de reacción tamponada, en donde la muestra de reacción está tamponada para mantener el pH de la muestra de reacción desde pH 6 hasta pH 8,5.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la muestra de reacción comprende desde 0.01 mg/mL de alfa-sinucleína hasta 10 mg/mL de alfa-sinucleína para actuar como un sustrato de agregación.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la muestra de reacción comprende desde 1 mg hasta 150 mg de perlas por 100 μ L de mezcla de reacción.

20. Un kit, comprendiendo una solución acuosa tamponada, la solución acuosa tamponada comprendiendo:

(i) una población de perlas que comprende vidrio u óxido de circonio y que tiene un diámetro medio de las perlas de $1\text{mm} \pm 10\%$;

(ii) Tioflavina T; y

(ii) alfa-sinucleína o un fragmento o variante de la misma.

21. Un método para detectar la presencia de agregación de alfa-sinucleína en una muestra biológica que comprende líquido cefalorraquídeo para un propósito no diagnóstico, el método comprendiendo los pasos:

(i) proporcionar la muestra biológica;

(ii) proporcionar una muestra de reacción que comprende:

(a) una población de perlas que comprende circonia/sílice, óxido de circonio, o vidrio, en donde la población de perlas tiene un diámetro medio de las perlas de 1 mm, y en donde la población de perlas tiene una desviación estándar de diámetros de más o menos 10% del diámetro medio,

(b) tioflavina T; y

(c) alfa-sinucleína,

(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 la tioflavina T; 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.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la muestra de reacción es una muestra de reacción tamponada, y en donde la muestra de reacción está tamponada para mantener el pH de la muestra de reacción desde pH 6 hasta pH 8,5.
23. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la muestra de reacción comprende desde 0,01mg/mL de alfa-sinucleína hasta 10mg/mL de alfa-sinucleína para actuar como un sustrato de agregación.
24. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la alfa-sinucleína de la muestra de reacción es alfa-sinucleína de longitud completa.
25. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la muestra de reacción es una muestra de reacción tamponada, y en donde la muestra de reacción está tamponada para mantener el pH de la muestra de reacción en pH 8,2.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la muestra de reacción comprende adicionalmente un tampón fosfato.
27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en donde el tampón fosfato está presente en una concentración de 100 mM.
28. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la tioflavina T está presente en una concentración de 10 μ M.
29. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la muestra de reacción comprende 0.1 mg/mL de la alfa-sinucleína humana recombinante de longitud completa para actuar como un sustrato de agregación.
30. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la población de perlas comprende circonia/sílice.
31. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la población de perlas comprende óxido de circonio.
32. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la población de perlas comprende vidrio.