

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 390 990**

21 Número de solicitud: 201031403

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22

Fecha de presentación:

21.09.2010

43

Fecha de publicación de la solicitud:

20.11.2012

Fecha de la concesión:

05.04.2013

45

Fecha de publicación de la concesión:

17.04.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
PABELLÓN DE BRASIL, PASEO DE LAS
DELICIAS S/N
41012 SEVILLA (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

FERNANDEZ ESPEJO, Emilio

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54

Título: **PROTEINAS DE LA FAMILIA CRY COMO MARCADORES PARA DETERMINAR EL RIESGO A DESARROLLAR UNA α -SINUCLINOPATIA O DETERMINAR DICHA ENFERMEDAD**

57 Resumen:

Proteínas de la familia Cry como marcadores para determinar el riesgo a desarrollar una α -sinucleinopatía o determinar dicha enfermedad. La presente invención se refiere a un método para determinar el riesgo a desarrollar una α -sinucleinopatía o determinar dicha enfermedad neurodegenerativa, mediante la detección y/o cuantificación de proteínas Cry, agentes neurotóxicos que pueden dar lugar a dicha enfermedad. Preferentemente la α -sinucleinopatía es Parkinson.

ES 2 390 990 B2

DESCRIPCIÓN

Proteínas de la familia Cry como marcadores para determinar el riesgo a desarrollar una α -sinucleinopatía o determinar dicha enfermedad.

La presente invención se encuadra dentro del campo de las ciencias médicas y más concretamente se refiere a un método para determinar el riesgo a desarrollar una α -sinucleinopatía o determinar dicha enfermedad neurodegenerativa, preferentemente la enfermedad de Parkinson, mediante la detección y/o cuantificación de proteínas Cry, agentes neurotóxicos que pueden dar lugar a dicha enfermedad.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El conocimiento de las enfermedades neurodegenerativas ha estado circunscrito durante muchos años a sus aspectos clínicos. Hoy sabemos que las enfermedades neurodegenerativas son la consecuencia de anomalías en el proceso de ciertas proteínas (principalmente las proteínas amiloides sinucleína y Tau) que intervienen en el ciclo celular y que, al acumularse en el tejido nervioso, dentro y fuera de las neuronas, disminuyen o anulan sus funciones produciendo manifestaciones clínicas, principalmente demencia.

Así, una clasificación de las enfermedades neurodegenerativas se basa en la presencia de acúmulos anormales de las proteínas tau y de la proteína α -sinucleína dando lugar a las α -sinucleinopatías y a las taupatías.

El término α -sinucleinopatía se utiliza para referirse a aquellas enfermedades neurodegenerativas que tienen en común el depósito anormal de α -sinucleína en el citoplasma de neuronas o de células gliales, o en el neuropilo en forma de cuerpos de Lewy o similar. La α -sinucleína es una proteína presináptica que parece estar involucrada en procesos de plasticidad sináptica. Los cambios conformacionales y bioquímicos que sufre esta proteína determinan inclusiones citoplasmáticas que caracterizan a diversos trastornos neurodegenerativos entre los que se incluyen la enfermedad de Parkinson, la demencia por cuerpos de Lewy y la atrofia multisistémica.

La enfermedad de Parkinson (EP) es uno de los desórdenes neurodegenerativos más importantes, afectando a casi un 1% de la población mayor de 65 años que comienza de forma lenta y progresiva, a ritmo variable, durante 10-20 años o más antes de terminar en invalidez grave y muerte.

Originalmente descrita por James Parkinson en 1817, de un modo preciso: "*movimiento trémulo involuntario, con debilidad muscular, en parte sin estar en acción o incluso afectando el normal apoyo; con tendencia al encorvamiento hacia delante y a acelerar el paso sin motivo; estando los sentidos y el intelecto intactos*", la enfermedad de Parkinson se caracteriza por la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, lo que produce disminución de la concentración de dopamina estriatal, condicionando aparición de rigidez muscular, lentitud de movimientos y temblor.

La sintomatología de la EP se debe principalmente a la fuerte pérdida de neuronas de dopamina localizadas en la sustancia negra (mayor del 80%), un núcleo del mesencéfalo que recibe dicho nombre por su aspecto oscuro debido a la alta presencia del pigmento neuromelanina. La sustancia negra a través de la vía nigroestriada, participa en la normal modulación del movimiento. La disfunción de esta vía por falta de dopamina origina trastornos motores serios, como temblor en reposo, acinesia, dificultad para caminar, alteración del equilibrio normal, amimia (falta de expresión facial), etc. Las imágenes de tomografía de emisión de positrones (PET) de personas con EP utilizando marcadores dopaminérgicos radioactivos (¹⁵fluorodopa) que se emplean para el diagnóstico enfermedad, muestran claramente la hipoactividad dopaminérgica en los ganglios basales. A más o menos largo plazo la persona también sufre de trastornos de memoria, emocionales, e incluso demencia, pues se van afectando funciones superiores.

El rasgo neuropatológico más característico de la EP es la presencia de los llamados cuerpos de Lewy en la sustancia negra. Los cuerpos de Lewy, inclusiones de 5 a 25 micras de diámetro con un núcleo eosinofílico denso compuesto por depósitos de proteínas como ubiquitinas, α -sinucleína y restos de neurofilamentos y rodeado por un halo pálido (Lewy FH, Pathologische Anatomie, 1912, 920–933), no sólo se detectan en la sustancia negra sino que se han visto también en otros lugares del sistema nervioso, como los plexos intestinales, el bulbo olfatorio, centros mesencefálicos y hasta en la corteza cerebral, lo que sugiere la presencia de una enfermedad neurodegenerativa global.

La presencia de α -sinucleína en las inclusiones de cuerpos de Lewy hace por tanto que la EP se incluya dentro del grupo de las α -sinucleinopatías.

Aunque la causa de la EP es desconocida, se acepta que existe un factor genético importante cuando la enfermedad aparece a edades tempranas (anterior a los 50 años) y, en ausencia de una causa genética, las influencias ambientales parece que juegan un papel determinante en la patogénesis de la EP. En esta línea, se propone que la acción oxidativa de un patógeno desconocido (toxina ambiental) puede ser la causa de la formación de inclusiones de α -sinucleína en forma de cuerpos de Lewy.

La búsqueda de agentes patógenos que puedan estar relacionados con la aparición de la EP ha dado lugar a distintas teorías que apuntan que varios pesticidas como la rotenona, la dieldrina, los ditiocarbamatos y la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) un contaminante de la heroína, provocan cuadros parkinsonianos (Langston JW, Ballard PA Jr. N Engl J Med. 1983, 309(5), 310), sin embargo, su presencia ambiental en la génesis de la EP no ha sido demostrada.

Por otro lado, otras investigaciones dirigidas al estudio de patógenos ambientales relacionados con la EP, apoyan la teoría de patógenos de tipo bacteriano o vírico que dañarían el sistema nervioso poniendo en marcha procesos oxidativos.

La presencia de cuerpos de Lewy en determinados centros cerebrales ha sido estudiada por diversos grupos de investigación (Braak H, Del Tredici K. Exp Neurol. 2008, 212(1), 226-229) y en estos estudios se propone que en la EP estaría involucrado un patógeno desconocido que afecta centros nerviosos de un modo ordenado y predecible.

Así, se ha visto que el proceso patológico afecta a algunos tipos neuronales de los plexos nerviosos del intestino, sistema nervioso periférico y sistema nervioso central que se desarrolla durante años. El factor común es que se afectan centros conectados entre sí por fibras nerviosas no mielínicas. La formación de los cuerpos de Lewy sería debida, por tanto, a la acción de un patógeno desconocido capaz de provocar la alteración de la α -sinucleína que se depositaría formando el núcleo proteináceo del cuerpo de Lewy.

El patógeno podría ser una bacteria, un virus neurotrópico (con afinidad por el tejido nervioso) o un príon (proteínas anómalas patógenas quizás similares a la α -sinucleína), pero hasta el momento no se ha identificado ningún patógeno capaz de producir α -sinucleinopatías y, en concreto, EP.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para determinar el riesgo a desarrollar una α -sinucleinopatía (enfermedad neurodegenerativa que cursa con la formación de inclusiones de α -sinucleína) o determinar dicha enfermedad neurodegenerativa mediante la detección y/o cuantificación de proteínas Cry, agentes neurotóxicos que pueden dar lugar a dicha enfermedad. Preferentemente la α -sinucleinopatía es Parkinson. Asimismo, la presente invención se refiere a un anticuerpo específico de las proteínas Cry o un fragmento del mismo para su uso como biomarcador para determinar el riesgo a desarrollar la α -sinucleinopatía o para determinar dicha enfermedad neurodegenerativa.

La presente invención muestra cómo las proteínas Cry, delta-endotoxinas procedentes de *Bacillus thuringiensis* (Bt), son capaces de inducir una α -sinucleinopatía y más preferentemente la enfermedad de Parkinson, en un individuo sano.

Hasta ahora las proteínas Cry sólo eran conocidas por su potente actividad como insecticida. Una característica importante de las proteínas Cry producidas por Bt, además de ser una importante alternativa a los tradicionales insecticidas químicos que generaban problemas de contaminación ambiental, es que se consideraban altamente específicas e inocuas para vertebrados y otros insectos no diana. Por todo ello, Bt se ha convertido en el insecticida biológico más utilizado y se han desarrollado plantas transgénicas que producen toxinas Cry, y en particular la toxina Cry1A, que confieren resistencia a la planta frente al ataque de insectos plaga, convirtiéndose esta toxina en uno de los bioinsecticidas con mayor éxito a escala mundial.

Sin embargo, la presente invención revela los efectos tóxicos que producen estas neurotoxinas en animales y humanos y proporciona un método para el diagnóstico de α -sinucleinopatías y más preferentemente la EP, antes del desarrollo de la degeneración nerviosa y la aparición de los síntomas de la enfermedad basado en la identificación de proteínas oxidantes tipo Cry en un tejido o fluido biológico, donde el fluido biológico es, preferentemente, líquido cefalorraquídeo o plasma.

Es de destacar que en la presente invención se revela además el potencial que poseen los anticuerpos específicos de las proteínas Cry como marcadores para el diagnóstico de dichas enfermedades neurodegenerativas y, en particular, de la EP, de forma que la presente invención proporciona también un tratamiento capaz de prevenir o curar estas enfermedades a través de inmunoterapia pasiva basada en la vacunación con anticuerpos específicos para las proteínas Cry.

Por tanto, la presente invención resuelve el problema técnico que plantea la dificultad de encontrar un método de diagnóstico capaz de identificar la patología antes del desarrollo de la degeneración nerviosa y la aparición de la sintomatología característica asociada a las α -sinucleinopatías y más preferentemente a la enfermedad de Parkinson, permitiendo entre otras aplicaciones:

- Detectar proteínas oxidantes tipo Cry en un tejido o fluido biológico, donde el fluido biológico es, preferentemente, líquido cefalorraquídeo o plasma, mediante un anticuerpo específico para las proteínas Cry, proporcionando un método fiable para el diagnóstico de la EP y otras α -sinucleinopatías.

- Prevenir y/o tratar dichas enfermedades a través de inmunoterapia pasiva utilizando una dosis eficiente de anticuerpo que reaccione específicamente contra las proteínas Cry detectadas.

5 Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere al método, en adelante método de la invención, para determinar el riesgo a desarrollar una α -sinucleinopatía o determinar dicha enfermedad neurodegenerativa que comprende:

- 10 a. obtener una muestra biológica aislada de un individuo,
- b. detectar y/o cuantificar una proteína con al menos un 65% de identidad con SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o con al menos un 55% de identidad con SEQ ID NO:3 o un fragmento de las mismas, en la muestra obtenida en el paso (a).

15 Dicho método de la invención es un método de obtención de datos útiles para determinar el riesgo a desarrollar una α -sinucleinopatía o determinar dicha enfermedad neurodegenerativa en un individuo.

El término "riesgo a desarrollar una α -sinucleinopatía" tal y como se entiende en la presente invención se refiere a la predisposición de un individuo para sufrir o desarrollar dicha enfermedad neurodegenerativa. Así el método proporciona datos útiles para determinar si un individuo está desarrollando o puede desarrollar la α -sinucleinopatía.

20 El término " α -sinucleinopatía" tal y como se entiende en la presente invención se refiere a todas aquellas enfermedades neurodegenerativas relacionadas con desórdenes cognitivos debidos a un aumento en los procesos de muerte celular, reduciendo el número de neuronas y generando cambios en la conducta, que tienen en común el depósito anormal de α -sinucleína en el citoplasma de neuronas o de células gliales, o en el neurópilo, formando inclusiones de α -sinucleína que pueden estar en forma de cuerpos de Lewy.

25 Tales enfermedades son, pero sin limitarse, la enfermedad de Shy-Drager, la atrofia multisistémica, la enfermedad de Pick, el síndrome de cuerpos de Lewy, la demencia con cuerpos de Lewy y la enfermedad de Parkinson. Preferentemente la α -sinucleinopatía es la enfermedad de Parkinson.

30 A lo largo de la presente invención se demuestra que la exposición a proteínas Cry1A de *Bacillus thuringiensis* subespecie kurstaki a través de una composición bioinsecticida comercialmente conocida como *Dipel* (formulación de la cepa HD-1 de *Bacillus thuringiensis* subespecie kurstaki que contiene un 28% de Cry1Aa, un 53% de Cry1Ab y un 19% de Cry1Ac y esporas), provoca la oxidación de la sustancia negra de los animales expuestos, manifestado por una reducción de los niveles de sustancias anti-oxidantes como glutatión y superóxido dismutasa en dicha zona. Además, se revela degeneración en la sustancia negra con muerte neuronal de las neuronas de dopamina y otros centros catecolaminérgicos y la presencia de depósitos intraneuronales de α -sinucleína en el citoplasma de las neuronas de dopamina de la sustancia negra que se depositan con una disposición similar a la de los cuerpos de Lewy en humanos (ejemplo 1). Manifestaciones que concuerdan con las observadas en las α -sinucleinopatías y, en particular, en la enfermedad de Parkinson.

40 El término "muestra biológica aislada", tal y como se utiliza en la descripción se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo, preferentemente líquido cefalorraquídeo o plasma, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a mamíferos, preferiblemente humanos o animales.

45 El término "proteína" hace referencia a cualquier secuencia aminoacídica aislada o recombinante que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos.

50 El término "% de identidad" tal y como se entiende en la presente invención se refiere al % de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, es decir, al número de posiciones aminoacídicas sobre la longitud total de la secuencia que se compara, donde todos los aminoácidos en esa posición son idénticos.

55 La proteína detectada y/o cuantificada en el paso (b) de dicho método, descrito en párrafos anteriores, puede tener al menos un 65, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 79, 80, 83, 85, 87, 90, 93, 95, 97, 98, 99, 100% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 o a la secuencia SEQ ID NO: 2 y al menos un 55, 56, 58, 60, 63, 65, 67, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 79, 80, 83, 85, 87, 90, 93, 95, 97, 98, 99, 100% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3.

60 Preferiblemente la proteína detectada y/o cuantificada en el paso (b) posee al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 o a la secuencia SEQ ID NO: 2 o al menos un 70% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3. Más preferiblemente la proteína detectada y/o cuantificada en el paso (b) posee al menos un 90% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 o a la secuencia SEQ ID NO: 2 o al menos un 80% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3. Aún más preferiblemente dicha proteína es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Donde SEQ ID NO: 1 es la secuencia aminoacídica de la proteína Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* subespecie kurstaki cepa HD-1 con número de acceso AAA22561, proteína contenida en *Dipel* en mayor proporción, SEQ ID NO: 2 es la secuencia aminoacídica de la proteína Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis*

subespecie kurstaki cepa HD-1 con número de acceso AAA22353 y SEQ ID NO: 3 es la secuencia aminoacídica de la proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* subespecie kurstaki cepa HD-1 con número de acceso AAD38701.

5 En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de identidad de las tres proteínas entre sí. Datos obtenidos mediante el uso del programa ClustalW2.

10 Tabla 1. Porcentajes de identidad entre las distintas proteínas Cry1A que componen *Dipel*: Cry1Ab (de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 y número de acceso AAA22561), Cry1Aa (de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2 y número de acceso AAA22353) y Cry1Ac (de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 y número de acceso AAD38701).

Proteína 1	SEQ ID NO.	Nº Acceso	Proteína 2	SEQ ID NO.	Nº Acceso	% de Identidad
Cry1Ab	1	AAA22561	Cry1Aa	2	AAA22353	92
Cry1Ab	1	AAA22561	Cry1Ac	3	AAD38701	84
Cry1Aa	2	AAA22353	Cry1Ac	3	AAD38701	77

15 En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de identidad de proteínas pertenecientes al subtipo 1A con respecto a la proteína de secuencia SEQ ID NO: 1. Además, en las tablas 3 y 4 se muestran los porcentajes de identidad de proteínas pertenecientes al subtipo 1A con respecto a las proteínas de secuencia SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 respectivamente. Datos obtenidos de Blastp, NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

20 Tabla 2. Porcentajes de identidad de distintas proteínas Cry1A con la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 (número de acceso AAA22561).

Proteína	Nº Acceso	% de Identidad
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar berliner ATCC 10792]	ZP_04106093.1	100
Cry1Ab [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	ABS18384.1	99
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 200]	ZP_04075355.1	95
Cry1Af [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	AAB82749.1	93
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie sotto str. T04001]	ZP_04130277.1	91
Cry1Aa [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar aizawai]	BAA00257.1	90
Cry1Ac [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki]	CAA70856.1	90
Cry1Ad [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	AAA22340.1	86
Cry1Ag [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	Q9S515.1	86
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki str. T03a001]	ZP_04118188.1	86
Cry1Ac22 [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki]	ABZ01836.1	86
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 200]	ZP_04075345.1	66

Tabla 3. Porcentajes de identidad de distintas proteínas Cry1A con la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2 (número de acceso AAA22353).

Proteína	Nº Acceso	% de Identidad
Cry1Aa [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	P0A366.1	99
Cry1Ac [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki]	CAA70856.1	99
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar sotto str. T04001]	ZP_04130277.1	97
Cry1Ag [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	Q9S515.1	94
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 200]	ZP_04075355.1	93
Cry1Ad [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	Q03744.1	91
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar berliner ATCC 10792]	ZP_04106093.1	90
Cry1Ab [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	ABS18384.1	89
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki str. T03a001]	ZP_04118188.1	85
Cry1Ac [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kenyae]	AAX18704.2	85
Cry1A [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	AAQ14326.1	74
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 200]	ZP_04075345.1	66

5 Tabla 4. Porcentajes de identidad de distintas proteínas Cry1A con la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 (número de acceso AAD38701).

Proteína	Nº Acceso	% de Identidad
Cry1Ac [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	AAN07788.1	99
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki str. T03a001]	ZP_04118188.1	99
Cry1Ac22 [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki]	ABZ01836.1	99
Cry1Ac [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki]	CAQ30431.1	96
Cry1Ab [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	ABB72460.1	83
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar berliner ATCC 10792]	ZP_04106093.1	83
Cry1Ab [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar tolworthi]	AAZ06794.1	83

Cry1Af [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	P96315.1	79
Cry1Aa [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	AAP40639.1	76
CryIAd [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	Q03744.1	73
Cry1A32 [<i>Bacillus thuringiensis</i>]	AAX86871.1	65
Cry1Ae [<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 200]	ZP_04075374.1	56

Las proteínas con un porcentaje de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 de al menos un 65% son isoformas o secuencias aminoacídicas que son homólogas a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 respectivamente en la bacteria *Bacillus thuringiensis* y las proteínas con un porcentaje de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3 de al menos un 55% son isoformas o secuencias aminoacídicas que son homólogas a SEQ ID NO: 3 en la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

Por ello, de aquí en adelante, para hacer referencia a cualquiera de las proteínas descritas en párrafos anteriores que tienen al menos un 65% de identidad con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 o con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2 o cualquier fragmento de las mismas así como a cualquiera de las proteínas descritas en párrafos anteriores que tienen al menos un 55% de identidad con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 o cualquier fragmento de las mismas, se puede emplear el término "proteína/s de la invención".

La expresión "detectar y/o cuantificar" tal y como se emplea en la descripción del método de la invención, hace referencia a la detección de la presencia y/o a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semicuantitativa o cuantitativa.

De acuerdo con la presente invención, la detección y/o cuantificación de la proteína de la invención puede ser llevada a cabo por cualquier método conocido en el estado de la técnica. Preferentemente la detección y/o cuantificación se lleva a cabo mediante inmunoensayo.

El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier técnica analítica, basada en la reacción de conjugación de la secuencia aminoacídica de la proteína de la invención, de sus variantes o de un fragmento de las mismas con un anticuerpo que las reconoce.

Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o microarrays de proteínas.

El inmunoensayo puede ser un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno de la muestra biológica o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.

El ELISA puede ser un ELISA indirecto, que puede comprender los siguientes pasos: (a) recubrir un soporte sólido con un lisado de células con la proteína de la invención (b) incubar el soporte recubierto del paso (a) con una muestra biológica aislada obtenida del individuo en condiciones que permitan la formación de un inmunocomplejo del anticuerpo frente a la proteína de la invención presente en la muestra, con los antígenos que comprenden a la proteína de la invención; y (c) incubar con un anticuerpo secundario, que reconoce al anticuerpo frente a la secuencia aminoacídica de la proteína de la invención, conjugado o unido a un compuesto marcador.

El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y/o cuantificación de la cantidad del anticuerpo frente a la secuencia aminoacídica de la proteína de la invención. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ³³P o ³⁵S, fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa por colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía, respectivamente.

En una realización preferida, el método de la invención además comprende comparar los datos obtenidos en (b) con unos valores de referencia para encontrar una desviación significativa.

5 Y, en una realización más preferida, el método de la invención además comprende atribuir la desviación significativa al riesgo de desarrollar una α -sinucleinopatía o a la presencia de dicha enfermedad neurodegenerativa en el individuo. Preferentemente, la α -sinucleinopatía es Parkinson.

10 El término "desviación significativa" tal y como se emplea en la presente invención hace referencia a la presencia de la proteína de la invención o de una mayor concentración de la misma en la muestra biológica aislada con respecto a una muestra de un individuo sano, es decir, un individuo que no presente dicha proteína o la presente en una concentración a la cual la proteína no produce ningún efecto tóxico en el organismo. Así, para encontrar una desviación significativa, se compara la desviación de los resultados obtenidos en el apartado (b) con respecto a unos controles o valores de referencia. Los controles o valores de referencia son, pero sin limitarse, aquellas muestras que no presentan las proteínas de la invención o la presentan a una concentración en la cual la proteína es inocua. Considerando sus niveles neurotóxicos en ratones (ejemplo 1), la concentración de las mismas en el plasma de un individuo humano para que no ejerzan un efecto tóxico en éste, debería ser inferior a 10 mg/l de sangre. Dicha desviación es una desviación significativa de las normas estadísticas establecidas, como por ejemplo, pero sin limitarse, la desviación de la media o mediana con respecto al control. No obstante, la desviación estadísticamente significativa puede determinarse mediante cualquier técnica estadística conocida por el experto en la materia.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la proteína de la invención o de un anticuerpo específico de la proteína de la invención, o cualquier fragmento del mismo, como biomarcador para determinar el riesgo de desarrollar una α -sinucleinopatía o para determinar dicha enfermedad neurodegenerativa. En una realización preferida, la α -sinucleinopatía es Parkinson.

25 El término "biomarcador" o, de forma alternativa, "marcador molecular", tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula o al producto de expresión de un gen o fragmentos y variantes del mismo que muestran cambios sustanciales en una enfermedad determinada y que se pueden usar tanto para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad como para determinar dicha enfermedad detectando la aparición de dichos cambios en el biomarcador.

30 Adicionalmente, el biomarcador también puede ser usado para seguir la eficacia de un tratamiento para esa enfermedad detectando cambios en el biomarcador en oposición a aquellos que se dan en la enfermedad o situación clínica.

35 El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la proteína de la invención. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE).

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un agente inhibidor de la proteína de la invención para la fabricación de un medicamento, en adelante medicamento de la invención, donde dicho medicamento tiene una cantidad de agente inhibidor terapéuticamente efectiva. Preferentemente el agente inhibidor es capaz de generar una respuesta inmune en un individuo. Más preferentemente el agente inhibidor es un anticuerpo específico de la proteína de la invención.

45 Una realización preferida se refiere al medicamento de la invención, para el tratamiento y/o prevención de una α -sinucleinopatía, donde preferentemente la α -sinucleinopatía es Parkinson.

50 El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- 55
- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
 - (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica;
 - (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

60 El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

65 La expresión "cantidad efectiva" o "cantidad eficaz" tal y como se emplea en el presente documento se refiere a una cantidad de una sustancia suficiente para lograr el propósito pretendido. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un

5 agente inhibidor de la proteína de la invención es una cantidad suficiente para tratar y/o prevenir la enfermedad neurodegenerativa. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de agente inhibidor de la proteína de la invención para tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno es una cantidad de agente inhibidor suficiente para reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad o trastorno. La cantidad eficaz de una sustancia dada variará con factores tales como la naturaleza de la sustancia, la vía de administración, el tamaño y la especie del animal que va a recibir la sustancia y el propósito por el que se da la sustancia. La cantidad eficaz en cada caso individual la puede determinar empíricamente el experto en la materia de acuerdo con los procedimientos establecidos en la técnica.

10 El término "agente inhibidor" o, de forma alternativa "compuesto inhibidor" tal y como se emplea en el presente documento se refiere a una molécula que cuando se une o interactúa con la proteína de la invención, disminuye o elimina la intensidad o la duración de su actividad biológica. En esta definición se incluye además aquellos compuestos como RNA interferentes que impiden o disminuyen la expresión del gen codificante de la proteína de la invención, es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del RNAm, la traducción del RNAm y la modificación post-traducciona. Un agente inhibidor puede estar constituido por un péptido, una proteína, 15 un ácido nucleico o polinucleótido, un carbohidrato, un anticuerpo, un compuesto químico o cualquier otro tipo de molécula que disminuya o elimine el efecto y/o la función de la proteína de la invención.

20 El término "medicamento de la invención", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

25 Por tanto, el medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, 30 inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán "medicamentos veterinarios" las "premezclas para piensos medicamentosos" elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

35 En el contexto de la presente invención el término "medicamento de la invención" se refiere a un agente inhibidor de la proteína de la invención, que es capaz de generar una respuesta inmune frente a un organismo dado, que está causando dicha enfermedad en el hombre o los animales. Preferentemente el medicamento de la invención es una vacuna.

40 En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" se refiere a una preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad, preparados de antígenos que una vez dentro del organismo provocan la respuesta del sistema inmunitario, mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

La vacuna, puede comprender excipientes farmacológicamente aceptables como por ejemplo pero sin limitarse, un adyuvante. Además, la vacuna presenta un origen recombinante.

45 En esta memoria, el término "adyuvante" se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por sí mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Aunque sin limitarse, las sales de aluminio "fosfato de aluminio" e "hidróxido de aluminio" son los dos adyuvantes más comúnmente empleados en las vacunas. Otras sustancias, como por ejemplo el escualeno, también se pueden emplear como adyuvantes.

50 Preferentemente el medicamento de la invención se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral, cutánea, oral, epidural, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

55 La forma adaptada hace referencia al modo de adecuar el medicamento de la invención para que pueda ser administrado por ejemplo pero sin limitarse, por vía parenteral, oral, rectal o transdérmica. La administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero 60 sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado. La forma adaptada a la administración rectal se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, supositorio, cápsula rectal, dispersión rectal o pomada rectal. La forma adaptada a la administración transdérmica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, parche transdérmico o iontoforesis.

En otra realización preferida el medicamento de la invención comprende al menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacológicamente aceptable. En otra realización preferida el medicamento de la invención comprende al menos otro principio activo.

5 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del medicamento de la invención, lo estabiliza o ayuda a su preparación en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento de la invención como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

10 Un "vehículo farmacológicamente aceptable" se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación del medicamento de la invención así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El término "farmacológicamente aceptable" se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

15 El término "principio activo" es toda materia, cualquiera que sea su origen, humano, animal, vegetal, químico o de otro tipo, a la que se atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende, al menos, un agente inhibidor de la proteína de la invención, preferentemente el agente inhibidor es capaz de generar una respuesta inmune en un individuo.

25 La composición farmacéutica, es un conjunto de componentes que está formado al menos por un agente inhibidor de la proteína de la invención, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una mejora del estado general de su salud, por ejemplo una aplicación cosmética, aunque puede no implicar un efecto fisiológico en el organismo, implica una mejora en el bienestar del sujeto relacionada con su psicología. Por tanto, dicha composición farmacéutica puede ser un producto de higiene personal, un producto cosmético o un producto que puede constituir la base para la elaboración de los productos anteriores o la base para la elaboración de un medicamento. Preferiblemente la composición farmacéutica se usa para la elaboración de un medicamento.

30 El "producto de higiene personal" se define como las sustancias o preparados que, sin tener la consideración legal de medicamentos, productos sanitarios, cosméticos o biocidas, están destinados a ser aplicados sobre la piel, dientes o mucosas del cuerpo humano con finalidad de higiene o de estética, o para neutralizar o eliminar ectoparásitos.

35 El "producto cosmético" se define como toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, y/o corregir los olores corporales, y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado.

40 En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende al menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacológicamente aceptable. En otra realización preferida la composición farmacéutica de la invención comprende al menos otro principio activo.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a un kit, en adelante kit de la invención, que comprende al menos una molécula indicadora de la presencia de la proteína de la invención. En una realización preferida, la molécula es, al menos, un anticuerpo específico de la proteína de la invención.

50 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para determinar el riesgo de desarrollar una α -sinucleinopatía o para determinar dicha enfermedad neurodegenerativa, en una muestra biológica aislada de un individuo, donde la muestra biológica aislada puede ser, pero sin limitarse, un tejido o un fluido biológico de dicho individuo. El kit de la invención proporciona datos útiles para determinar el riesgo a desarrollar una α -sinucleinopatía o determinar dicha enfermedad neurodegenerativa en un individuo.

55 Preferentemente la muestra biológica es un fluido biológico y más preferentemente líquido cefalorraquídeo o plasma. El individuo es, pero sin limitarse, un mamífero, preferiblemente humano o animal.

60 En una realización preferida, la α -sinucleinopatía es Parkinson.

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 **Fig. 1. Muestra los niveles de las moléculas anti-oxidantes superóxido dismutasa, glutatión, glutatión reductasa y glutatión peroxidada.**

15 1A. Muestra los niveles medidos en la sustancia negra de ratas expuestas a proteínas Cry (*Dipef*) o vehículo (ratas control (no expuestas a proteínas Cry)) por vía intraperitoneal seis meses tras la exposición.

Las barras más oscuras representan los niveles medidos en la sustancia negra derecha y las barras más claras representan los niveles medidos en la sustancia negra izquierda.

20 1B. Muestra los niveles medidos en el estriado dorsal de ratas expuestas a proteínas Cry (*Dipef*) o vehículo (ratas control (no expuestas a proteínas Cry)) por vía intraperitoneal, seis meses tras la exposición.

Las barras más oscuras representan los niveles medidos en el estriado derecho y las barras más claras representan los niveles medidos en el estriado izquierdo.

25 Las mediciones se realizaron con la técnica ELISA. Media \pm EEM, ** $p < 0.01$ vs. grupo correspondiente de las ratas tratadas con vehículo (test de la t de *Student*).

30 Cry, expuestos a proteínas Cry.
C, U/mg.
D, μ M/mg.

Fig. 2. Muestra la expresión de tirosina-hidroxilasa (TH) y alteraciones neuropatológicas en secciones cerebrales de ratas de 22 meses de edad expuestas a proteínas Cry a los seis meses de edad.

35 2A. Muestra una imagen de una sección mesencefálica de rata expuesta a proteínas Cry. Se observa degeneración unilateral de la sustancia negra izquierda con pérdida neuronal TH intensa (asterisco) en comparación con la sustancia negra derecha no degenerada.
L, izquierda; R, derecha.

40 2B-2D. Muestra regiones degeneradas de la sustancia negra en 2A. Se muestra una intensa pérdida neuronal con neuritas distróficas y engrosadas (2B), neuronas TH+ con formas extrañas con neuritas distróficas (flechas blancas figura 2C) y el límite entre el área degenerada (derecha en la figura 2D) y no degenerada (izquierda en la figura 2D) de la sustancia negra.

45 2E. Muestra otra imagen mesencefálica de ratas expuestas a proteínas Cry. Se observa degeneración unilateral de la sustancia negra (asterisco).

50 2F. Muestra otra imagen mesencefálica de ratas expuestas a proteínas Cry. Se observa una pérdida casi completa de neuronas TH+ en la sustancia negra de la rata expuesta a proteínas Cry (asterisco).

Fig. 3. Muestra la expresión de la tirosina-hidroxilasa (TH) y alteraciones neuropatológicas en secciones de cerebro de rata de 22 meses de edad, expuestas a proteínas Cry a los seis meses de edad.

55 3A. Muestra la sección mesencefálica de una rata expuesta a proteínas Cry. Se observa degeneración intensa de la sustancia negra, en comparación con la sustancia negra contralateral.

3B. Muestra degeneración regional del extremo lateral de la sustancia negra (indicada con línea discontinua) en una rata expuesta a proteínas Cry.

60 3C. Imagen ampliada de 3B. Muestra intensa pérdida neuronal junto a neuritas distróficas y engrosadas (degeneradas).

3D. Muestra la sustancia negra muy degenerada de otra rata expuesta a proteínas Cry donde solo quedan algunas neuronas TH+ (flechas blancas) y se observan numerosas neuritas distróficas en la sustancia negra.

Fig. 4. Muestra la expresión de α -sinucleína o inclusiones eosinofílicas en las ratas expuestas a proteínas Cry a los seis meses de edad.

4A. Muestra la inmunorreactividad de α -sinucleína que se detecta en la sustancia negra (cuernos medial y lateral) o en el núcleo rojo parvicelular (RPC), otro núcleo mesencefálico.

5 SNc, sustancia negra pars compacta; SNr, sustancia negra pars reticulada.

4B. Muestra una microfotografía donde se observan numerosas neuronas positivas a α -sinucleína, con una distribución difusa en el citoplasma (flechas negras), inclusiones intensas (puntas de flecha negra) o inclusiones similares a cuerpos de Lewy inmunorreactivas a α -sinucleína.

10 4C-4D. Muestra microfotografías ampliadas de inclusiones tipo cuerpos de Lewy (flechas negras).

4E. Muestra como la α -sinucleína también se encuentra distribuida difusamente en el citoplasma (flecha negra) y algunas neuronas presentan neuritas tipo Lewy con morfología engrosada (puntas de flecha negra).

15 4F. Muestra como a nivel del cuerpo estriado, también se observan ocasionales neuritas tipo Lewy (puntas de flecha negra)

20 4G-4H. Muestra una tinción con hematoxilina-eosina donde se observa la presencia de neuronas con citoplasma denso eosinofílico (puntas de flecha negra) en la sustancia negra (en 4H, se muestra la imagen ampliada de una neurona eosinofílica).

Fig. 5. Muestra un análisis ELISA y colorimétrico de la presencia de proteínas Cry en tejido cerebral mesencefálico (segmento ventral y sustancia negra) de ratas expuestas a proteínas Cry a los seis meses de edad, y sacrificadas a los 22 meses de edad.

Se muestra en oscuro las soluciones que contenían tejido mesencefálico de ratas expuestas a proteínas Cry incluidas en el bioinsecticida *Dipel* (formulación de la cepa HD-1 de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*, que contiene 28% Cry1Aa, 53% Cry1Ab, 19% Cry1Ac y esporas).

30 **EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del método de la invención para determinar una α -sinucleinopatía, enfermedad neurodegenerativa que cursa con la formación de inclusiones de α -sinucleína, y, en concreto, la enfermedad de Parkinson (EP), mediante la detección y/o cuantificación de proteína Cry.

40 A lo largo de los distintos ejemplos se demuestra cómo la proteína Cry es capaz de inducir una α -sinucleinopatía, donde la α -sinucleinopatía es, preferentemente, EP. Así, se observa como la exposición de ratas de laboratorio (estirpe *Wistar*) a *Dipel*, una composición comercial insecticida que contiene la proteína Cry1A de *Bacillus thuringiensis* dio lugar a un proceso oxidativo en el sistema nervioso acompañado de, entre otras patologías, pérdida neuronal y aparición de depósitos intraneuronales de α -sinucleína similares a los cuerpos de Lewy que aparecen en las enfermedades neurodegenerativas tipo EP.

45 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones de la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma. Así, aunque en los ejemplos de la presente invención se ha usado la proteína Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*, estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones de la invención que aquí se reivindica, siendo los resultados extrapolables a cualquier proteína Cry1A de *Bacillus thuringiensis*.

EJEMPLO 1.

55 Se inyectó *Dipel* (formulación de la cepa HD-1 de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki*, que contiene 28% Cry1Aa, 53% Cry1Ab, 19% Cry1Ac y esporas) a ratas de laboratorio de la estirpe *Wistar* con seis meses de edad durante 20 días, mediante inyecciones intraperitoneales. *Dipel* se inyectó a una dosis diaria de 1 mg/100 g de peso.

60 La medida de la distancia recorrida por las ratas a las que se les había inyectado *Dipel* en cajas de actividad (45 x 45 cm) indicó que la exposición a proteínas Cry induce hiperkinesia espontánea en las ratas, desde el 10º mes de edad hasta el final. Algunas ratas mostraron rotaciones tras anfetamina, indicativa de degeneración unilateral del circuito nigroestriado motor.

1.1. Técnica ELISA.

5 Seis meses tras la exposición a proteínas Cry, las pruebas ELISA de moléculas antioxidantes del tejido diseccionado de la sustancia negra revelaron que había un proceso oxidativo en dicho núcleo, manifestado por una reducción en los niveles de glutatión y de superóxido dismutasa (Figura 1).

10 Para las pruebas ELISA, se diseccionó la sustancia negra bajo microscopio y se congeló inmediatamente. Luego, se descongeló el tejido, y se homogeneizó en un tampón (del inglés: *buffer*) de homogenado con 150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorado, 0.6 μ M leupeptina, y 1% Triton X-100, pH 7.4. Se cuantificaron los niveles de diversas proteínas y enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo como nitrotirosina, sintetasa de óxido nítrico, glutatión peroxidasa, y superóxido dismutasa con kits comerciales de *Bioxytech (Oxis Internacional Inc., Portland, OR, USA: Nitrotyrosine-EIA, NOS-22113, GR-340, cGPX-340, y SOD-525)*. Además se midieron los niveles de glutatión y glutatión-S-transferasa con kits de *BioVision incorporated (Mountain View, CA, USA: Glutathione Assay Kit (K264-100), y GST (K263-100))*. Los datos se compararon con ANOVA de una vía seguido de test de *Bonferroni*.

20 Por otro lado, se realizó una prueba ELISA de la presencia de proteínas Cry1Ab-1Ac en tejido mesencefálico fresco de las ratas expuestas a proteínas Cry a los 22 meses de edad.

25 Para esta prueba se obtuvo tejido mesencefálico que contenía la sustancia negra de ratas tratadas con pesticida *Dipel* y ratas control. Se empleó el kit según las sugerencias del fabricante (*Pathoscreen kit for Bt-Cry1Ab/1Ac protein, peroxidase label, Agdia Incorporated, Indiana, USA*). El test dio un resultado positivo (viraje a azul; en Figura 5 pocillos oscuros) indicando la presencia de las proteínas Cry1Ab-Ac.

1.2. Estudio neuropatológico.

30 Para el estudio neuropatológico se sacrificaron las ratas a los 22 meses de edad, se extirpó el cerebro y se almacenó en 4% paraformaldehído en tampón fosfato (PB) 0.1M (pH 7.2-7.4) a 4°C, y luego se sumergió toda la noche en 20% sacarosa en PBS (tampón fosfato salino). Se cortaron secciones cerebrales (30 μ m espesor) en un criostato (Microm, Italia) y se guardó en PBS. Luego se inactivó la peroxidasa endógena con 0.3% H₂O₂ en 0.05 Tris *buffer* (pH=7.6) por 2 horas y las secciones se incubaron en PBS/0.1% Triton X-100 (PBS-T) con 10% FCS (suero fetal bovino) (Vector, USA) y BSA (albúmina de suero bovino) (1 mg/ml, *Sigma-Aldrich, USA*) durante 4 horas para bloquear sitios inespecíficos. La secciones se incubaron toda la noche con anticuerpo monoclonal de ratón antitirosin-hidroxilasa (del inglés *mouse anti-tyrosine-hydroxylase monoclonal antibody*) (anti-TH, 1:1000, Sigma-Aldrich, USA), o anticuerpo de ratón anti-alfasinucleína (del inglés *mouse anti-alpha-synuclein antibody*) (1:1000, Sigma-Aldrich) en PBS-T, y seguidamente se incubaron durante 6 horas con anticuerpo de ratón conjugado con biotina (del inglés *anti-mouse biotin conjugated antibody*) (1:200, *Santa Cruz Technology, USA*). Luego se empleó el kit ABC (1:100, *Pierce, USA*), y se reveló el tejido con 3,3'- tetrahidrocloruro de diaminobencidina (*DAB, Sigma-Aldrich, USA*) como cromógeno, y agua oxigenada.

45 Respecto a los métodos estereológicos, se aplicó el principio de *Cavalieri* y el disector físico según la metodología habitual del laboratorio (Fernández Espejo E., et al., *J Neurosci* 2001, 21, 9888-9895; El Banoua F, et al., *Neurobiol. Disease* 2004, 16, 377-385; Galán-Rodríguez B, et al., *Neurobiol. Disease* 2008, 29, 529-542.

50 El estudio neuropatológico a los 22 meses de edad reveló la presencia de neurodegeneración en la sustancia negra como pérdida regional o unilateral de neuronas de dopamina, neuritas engrosadas y distróficas positivas a α -sinucleína (Figuras 2 y 3) y presencia intraneuronal de depósitos difusos de α -sinucleína o de inclusiones de α -sinucleína con una disposición similar a la de los cuerpos de Lewy en humanos (Figura 4).

55 Estas últimas manifestaciones acerca de la α -sinucleína son similares a las observadas en las α -sinucleinopatías y, en concreto, en la enfermedad de Parkinson. Otros centros nerviosos, como el estriado dorsal, el núcleo rojo, y el rafé dorsal estaban también afectados, indicando una degeneración extensa del tejido nervioso.

El estrés oxidativo en la sustancia negra se detectó bilateralmente, aunque la degeneración de la sustancia negra fue parcial o unilateral, indicando que otros fenómenos aparte de la oxidación han de estar involucrados en la neurodegeneración.

60 Todos estos datos demuestran que las proteínas Cry a concentraciones iguales o mayores de 10 mg/l en humanos (dosis en rata durante 20 días de 1 mg/100g de peso) pueden causar enfermedades neuronales que cursan con la formación de inclusiones de α -sinucleína y, principalmente, son responsables de la enfermedad de Parkinson.

65 Así, se ha visto que estas proteínas son las responsables de la aparición en los roedores de un cuadro neurodegenerativo caracterizado por la acción oxidante de las proteínas Cry sobre el circuito nigroestriado y otros centros catecolaminérgicos a corto plazo, y al resto de características anatomopatológicas de enfermedades neurodegenerativas que cursan con la formación de inclusiones de α -sinucleína (o α -sinucleinopatías) y, en

particular, con EP a largo plazo, entre las que se incluyen: la degeneración de la sustancia negra con muerte neuronal de las neuronas de dopamina así como de otros centros catecolaminérgicos como el raquí dorsal y la presencia de depósitos intraneuronales de α -sinucleína en el citoplasma de las neuronas de dopamina de la sustancia negra.

REIVINDICACIONES

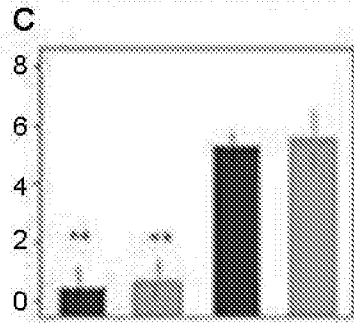
1. Método para determinar el riesgo de desarrollar una α -sinucleinopatía o para determinar dicha enfermedad neurodegenerativa, que comprende:
 - 5 a. obtener una muestra biológica aislada de un individuo,
 - b. detectar y/o cuantificar una proteína con al menos un 65% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o con al menos un 55% de identidad con SEQ ID NO: 3, en la muestra obtenida en el paso (a).
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde la proteína detectada y/o cuantificada en (b) tiene, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 3.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la proteína detectada y/o cuantificada en (b) tiene, al menos, un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 3.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proteína detectada y/o cuantificada en el paso (b) es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende comparar los datos obtenidos en el paso (b) con valores de referencia para encontrar una desviación significativa.
6. Método según la reivindicación 5, que además comprende atribuir la desviación significativa al riesgo de desarrollar una α -sinucleinopatía o a la presencia de dicha enfermedad neurodegenerativa en el individuo.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la muestra biológica del paso (a) es un tejido o un fluido biológico.
8. Método según la reivindicación 7, donde el fluido biológico es líquido cefalorraquídeo o plasma.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la proteína del paso (b) es detectada y/o cuantificada por inmunoensayo.
- 35 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la α -sinucleinopatía es Parkinson.
- 40 11. Uso de una proteína o de un anticuerpo específico de dicha proteína con al menos un 65% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o con al menos un 55% de identidad con SEQ ID NO: 3, como biomarcador para determinar el riesgo de desarrollar una α -sinucleinopatía o para determinar dicha enfermedad neurodegenerativa.
- 45 12. Uso de la proteína o del anticuerpo específico de dicha proteína según la reivindicación 11, donde la proteína tiene, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 3.
- 50 13. Uso de la proteína o del anticuerpo específico de dicha proteína según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, donde la proteína tiene, al menos, un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 3.
- 55 14. Uso de la proteína o del anticuerpo específico de dicha proteína según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde la proteína es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 60 15. Uso de la proteína o del anticuerpo específico de dicha proteína según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde la α -sinucleinopatía es Parkinson.
- 65 16. Uso de un anticuerpo específico de una proteína con, al menos, un 65% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o con al menos un 55% de identidad con SEQ ID NO: 3 para la fabricación de un medicamento.
17. Uso según la reivindicación 16, donde la proteína tiene, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 3.
18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, donde la proteína tiene, al menos, un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 3.
19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde la proteína es SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, para el tratamiento y/o prevención de una α -sinucleinopatía.
- 5 21. Uso según la reivindicación 20, donde la α -sinucleinopatía es Parkinson.
22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, donde el medicamento comprende al menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.
- 10 23. Composición farmacéutica que comprende, al menos, un anticuerpo específico de una proteína con al menos un 65% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o con al menos un 55% de identidad con SEQ ID NO: 3.
24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23 donde la proteína tiene, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2 o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO:3.
- 15 25. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 23 ó 24 donde la proteína tiene, al menos, un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 3.
- 20 26. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25 donde la proteína es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
27. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, que además comprende al menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.
- 25 28. Kit que comprende al menos una molécula indicadora de la presencia de una proteína con al menos un 65% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o con al menos un 55% de identidad con SEQ ID NO: 3.
29. Kit según la reivindicación 28, donde la proteína tiene, al menos, un 80% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 3.
- 30 30. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 28 ó 29, donde la proteína tiene, al menos, un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 3.
- 35 31. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30 donde la proteína es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
32. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31, donde la molécula indicadora es, al menos, un anticuerpo específico de dicha proteína.
- 40 33. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32 para determinar el riesgo de desarrollar una α -sinucleinopatía o para determinar dicha enfermedad neurodegenerativa, en una muestra biológica aislada de un individuo.
- 45 34. Uso según la reivindicación 33 donde la muestra biológica es un tejido o un fluido biológico.
35. Uso según la reivindicación 34, donde el fluido biológico es líquido cefalorraquídeo o plasma.
36. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, donde la α -sinucleinopatía es Parkinson.

FIG. 1

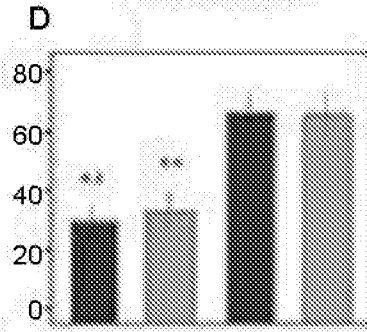
A.

Superóxido dismutasa



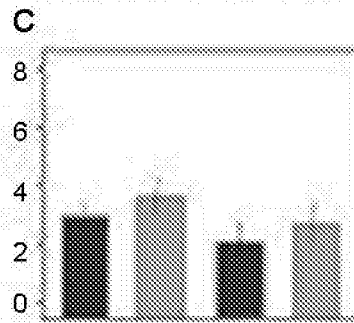
Cry Control

Glutación



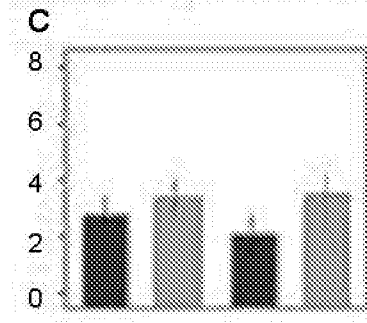
Cry Control

Glutación reductasa



Cry Control

Glutación peroxidasa



Cry Control

B.

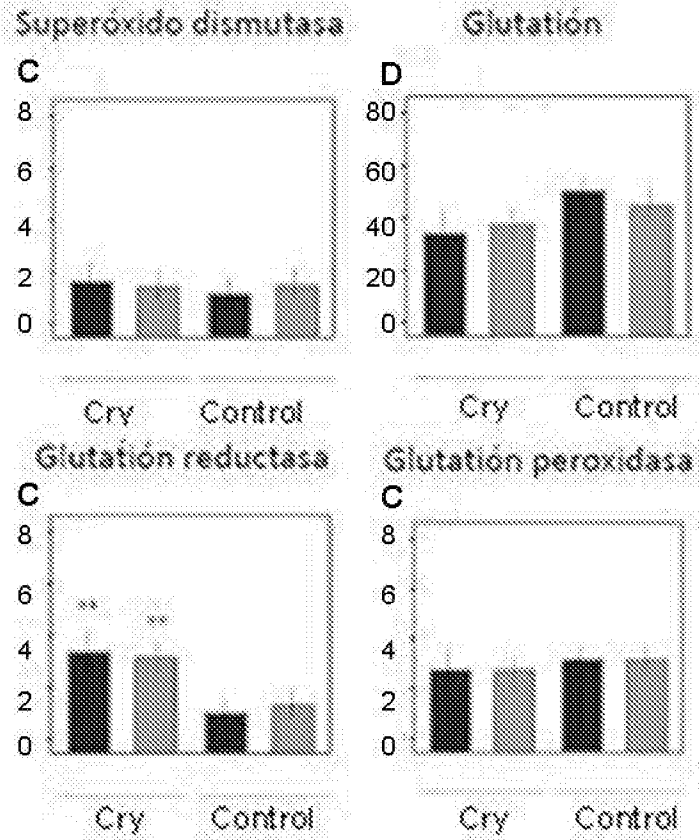


FIG. 2

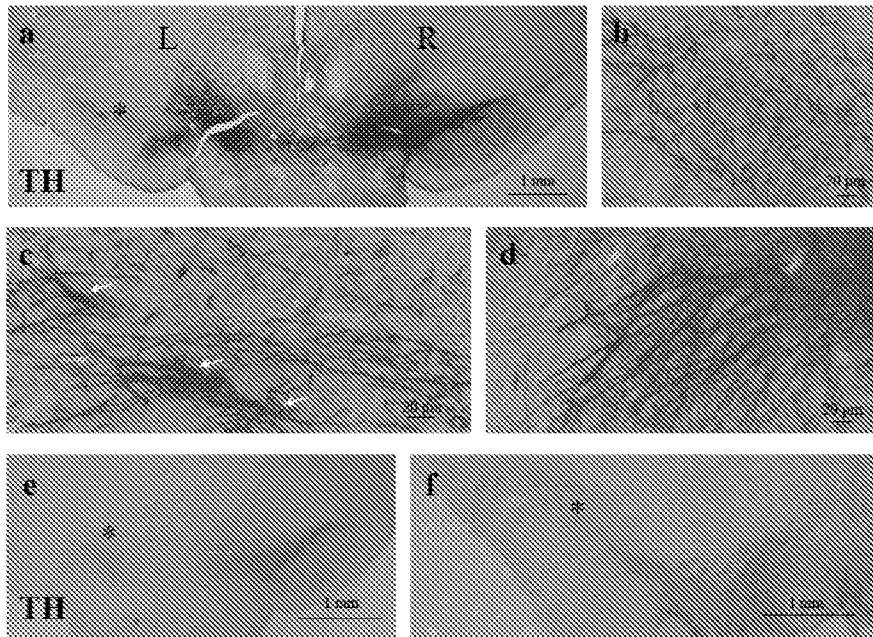


FIG. 3

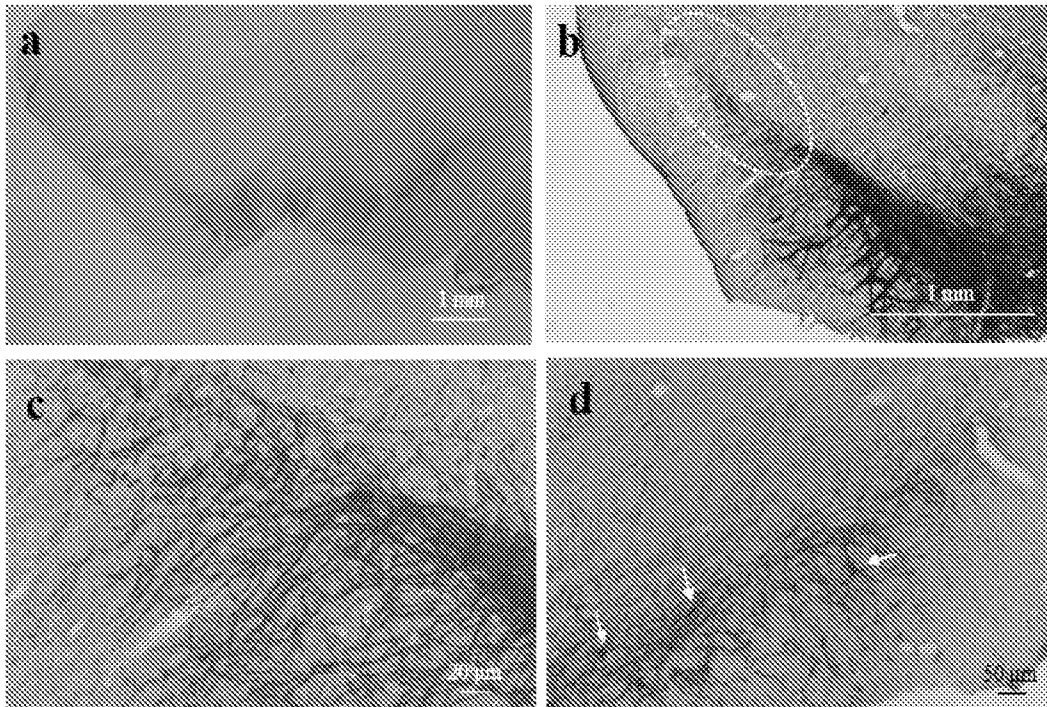


FIG. 4

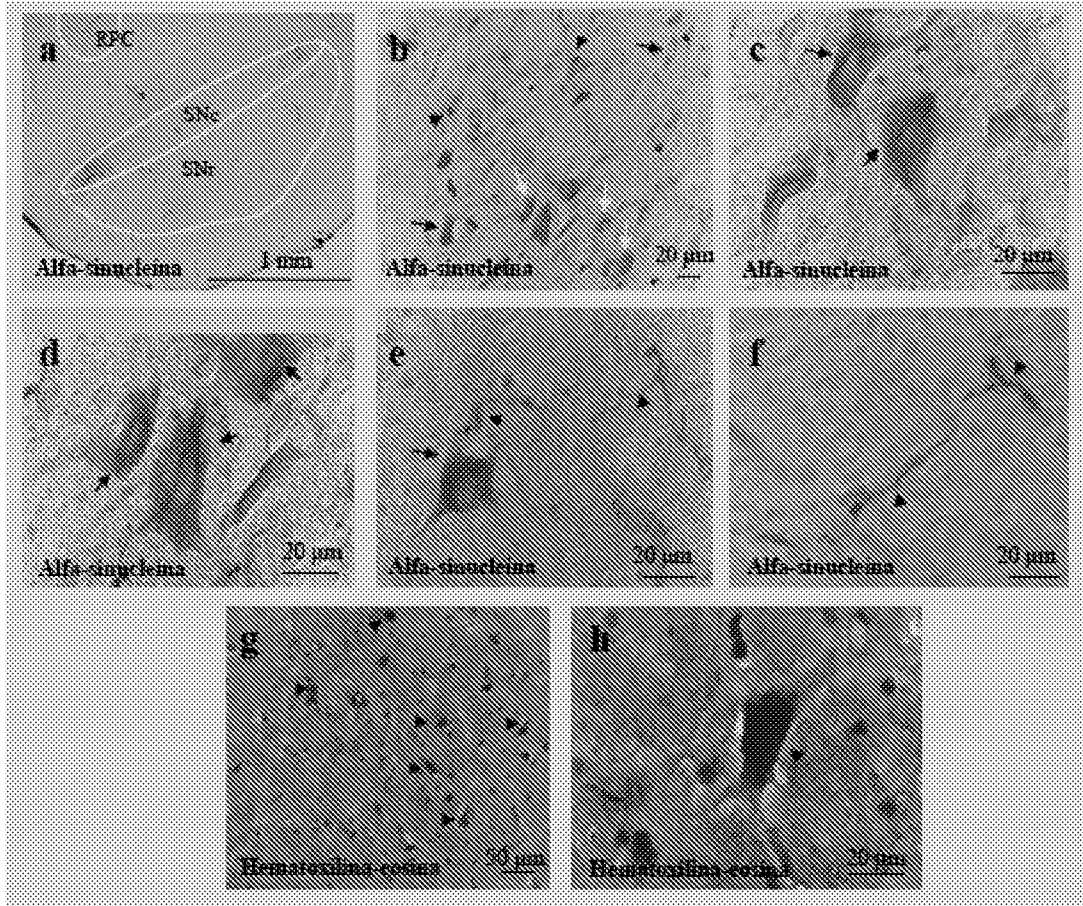
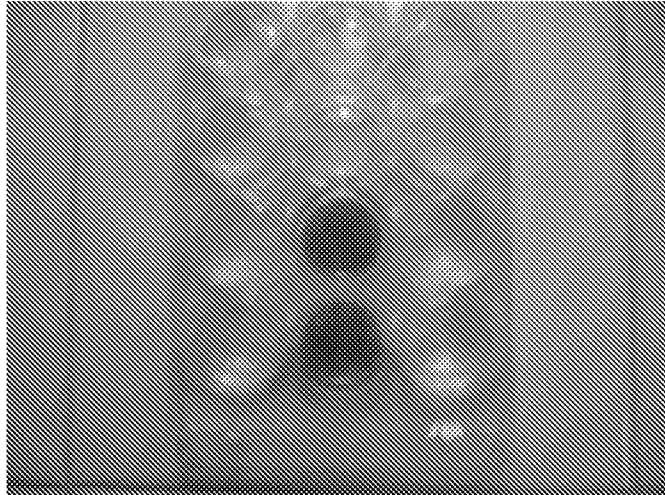


FIG. 5



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Sevilla

<120> Proteínas de la familia Cry como marcadores para determinar el riesgo a desarrollar una alfa-sinucleinopatía o determinar dicha enfermedad

<130> 1650.15

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1155

<212> PRT

<213> Bacillus thuringiensis

<400> 1

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly
 20 25 30

Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
 35 40 45

Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
 50 55 60

Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
 85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
 100 105 110

Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
 115 120 125

Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
 130 135 140

Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160

Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
 165 170 175

Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
 180 185 190

ES 2 390 990 B2

Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val
 195 200 205
 Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
 210 215 220
 Asp Trp Ile Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Thr Tyr Pro
 245 250 255
 Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
 275 280 285
 Gly Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
 290 295 300
 Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
 305 310 315 320
 Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
 325 330 335
 Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
 340 345 350
 Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
 355 360 365
 Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
 370 375 380
 Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
 385 390 395 400
 Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
 405 410 415
 Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
 420 425 430
 Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile
 435 440 445
 Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn
 450 455 460

ES 2 390 990 B2

Ile Ile Pro Ser Ser Gln Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr
465 470 475 480

Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly
485 490 495

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr Leu Arg
500 505 510

Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg
515 520 525

Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser Ile Asp Gly Arg
530 535 540

Pro Ile Asn Gln Gly Asn Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn
545 550 555 560

Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly Phe Thr Thr Pro Phe Asn
565 570 575

Phe Ser Asn Gly Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val Phe Asn
580 585 590

Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu
595 600 605

Val Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val
610 615 620

Asn Glu Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val
625 630 635 640

Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser
645 650 655

Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys
660 665 670

His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn
675 680 685

Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr
690 695 700

Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
705 710 715 720

Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
725 730 735

Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg

ES 2 390 990 B2

740 745 750
 Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
 755 760 765
 Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp
 770 775 780
 Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His
 785 790 795 800
 His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp
 805 810 815
 Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala
 820 825 830
 Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu
 835 840 845
 Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg
 850 855 860
 Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu
 865 870 875 880
 Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala
 885 890 895
 Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser
 900 905 910
 Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn
 915 920 925
 Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser
 930 935 940
 Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly
 945 950 955 960
 Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn
 965 970 975
 Asn His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser
 980 985 990
 Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr
 995 1000 1005
 Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu
 1010 1015 1020

ES 2 390 990 B2

Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu
 1025 1030 1035

Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr
 1040 1045 1050

Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg
 1055 1060 1065

Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp
 1070 1075 1080

Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg
 1085 1090 1095

Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro
 1100 1105 1110

Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu
 1115 1120 1125

Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe
 1130 1135 1140

Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1145 1150 1155

<210> 2
 <211> 1176
 <212> PRT
 <213> Bacillus thuringiensis
 <400> 2

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly
 20 25 30

Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
 35 40 45

Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
 50 55 60

Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Pro Val Gln Ile
 65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
 85 90 95

ES 2 390 990 B2

Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
100 105 110

Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
115 120 125

Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
130 135 140

Ile Pro Leu Leu Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
145 150 155 160

Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
165 170 175

Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
180 185 190

Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val
195 200 205

Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
210 215 220

Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Ser Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro
245 250 255

Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
260 265 270

Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Met Ala Gln Arg Ile Glu
275 280 285

Gln Asn Ile Arg Gln Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
290 295 300

Ile Tyr Thr Asp Val His Arg Gly Phe Asn Tyr Trp Ser Gly His Gln
305 310 315 320

Ile Thr Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Ala Phe Pro
325 330 335

Leu Phe Gly Asn Ala Gly Asn Ala Ala Pro Pro Val Leu Val Ser Leu
340 345 350

Thr Gly Leu Gly Ile Phe Arg Thr Leu Ser Ser Pro Leu Tyr Arg Arg
355 360 365

Ile Ile Leu Gly Ser Gly Pro Asn Asn Gln Glu Leu Phe Val Leu Asp

ES 2 390 990 B2

Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Gln Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His
 660 665 670
 Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe
 675 680 685
 Arg Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp
 690 695 700
 Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr
 705 710 715 720
 Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys
 725 730 735
 Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly
 740 745
 Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn
 755 760 765
 Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro
 770 775 780
 Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys
 785 790 795 800
 Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg Asp
 805 810 815
 Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp
 820 825 830
 Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe
 835 840 845
 Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe
 850 855 860
 Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg
 865 870 875 880
 Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr
 885 890 895
 Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val
 900 905 910
 Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile
 915 920 925

ES 2 390 990 B2

His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro
 930 935 940

Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu
 945 950 955 960

Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val
 965 970 975

Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys
 980 985 990

Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn Gln Arg Ser Val Leu Val
 995 1000 1005

Leu Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys
 1010 1015 1020

Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly
 1025 1030 1035

Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr
 1040 1045 1050

Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro
 1055 1060 1065

Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu
 1070 1075 1080

Tyr Gly Gly Ala Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala
 1085 1090 1095

Pro Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser
 1100 1105 1110

Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly
 1115 1120 1125

Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu
 1130 1135 1140

Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly
 1145 1150 1155

Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu
 1160 1165 1170

Met Glu Glu
 1175

ES 2 390 990 B2

<210> 3
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 3

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
 1 5 10 15
 Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly
 20 25 30
 Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
 35 40 45
 Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
 50 55 60
 Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
 65 70 75 80
 Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
 85 90 95
 Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
 100 105 110
 Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
 115 120 125
 Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
 130 135 140
 Ile Pro Leu Leu Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160
 Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
 165 170 175
 Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
 180 185 190
 Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val
 195 200 205
 Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
 210 215 220
 Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255

ES 2 390 990 B2

Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
260 265 270

Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
275 280 285

Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
290 295 300

Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
305 310 315 320

Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
325 330 335

Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
340 345 350

Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Phe Tyr Arg
355 360 365

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
385 390 395 400

Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
405 410 415

Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
420 425 430

Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Ser Ser Ser Val Ser Ile Ile Arg
435 440 445

Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn Ile
450 455 460

Ile Ala Ser Asp Ser Ile Thr Gln Ile Pro Ala Val Lys Gly Asn Phe
465 470 475 480

Leu Phe Asn Gly Ser Val Ile Ser Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp
485 490 495

Leu Val Arg Leu Asn Ser Ser Gly Asn Asn Ile Gln Asn Arg Gly Tyr
500 505 510

Ile Glu Val Pro Ile His Phe Pro Ser Thr Ser Thr Arg Tyr Arg Val
515 520 525

ES 2 390 990 B2

Arg Val Arg Tyr Ala Ser Val Thr Pro Ile His Leu Asn Val Asn Trp
 530 535 540

Gly Asn Ser Ser Ile Phe Ser Asn Thr Val Pro Ala Thr Ala Thr Ser
 545 550 555 560

Leu Asp Asn Leu Gln Ser Ser Asp Phe Gly Tyr Phe Glu Ser Ala Asn
 565 570 575

Ala Phe Thr Ser Ser Leu Gly Asn Ile Val Gly Val Arg Asn Phe Ser
 580 585 590

Gly Thr Ala Gly Val Ile Ile Asp Arg Phe Glu Phe Ile Pro Val Thr
 595 600 605

Ala Thr Leu Glu Ala Glu Tyr Asn Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val
 610 615 620

Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn Gln Leu Gly Leu Lys Thr Asn Val
 625 630 635 640

Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Thr Tyr Leu Ser
 645 650 655

Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys
 660 665 670

His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Ser Asn
 675 680 685

Phe Lys Asp Ile Asn Arg Gln Pro Glu Arg Gly Trp Gly Gly Ser Thr
 690 695 700

Gly Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
 705 710 715 720

Thr Leu Ser



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201031403

22 Fecha de presentación de la solicitud: 21.09.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2009/152607 A1 (OTAWA HOSPITAL RESEARCH INSTITUTE) 23.12.2009, todo el documento.	1-36
A	WO 2008/137692 A1 (LINK MEDICINE CORPORATION) 13.11.2008, todo el documento.	1-36
A	CHADE A.R. et al. "Nongenetic causes of Parkinson's disease" Journal of Neural Transmission [Supplement] (2006) Vol. 70, N.º. 3, páginas 147 - 151; DOI: 10.1007/978-3-211-45295-0_23; todo el documento.	1-36
A	THIRUCHELVAM M. et al. "Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype" Neuro Toxicology (octubre 2002) Vol. 23, N.º. 4-5, páginas 621 - 633; DOI: 10.1016/S0161/S0161-813x(02)00092-x; todo el documento.	1-36

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.11.2012

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/68 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NCBI, bases de datos STN, EMBL-EBI, XPESP/ELSEVIER, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER, NPL/EPO, XPESP2/ELSEVIER

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.11.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-36	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-36	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2009/152607 A1 (OTAWA HOSPITAL RESEARCH INSTITUTE)	23.12.2009
D02	WO 2008/137692 A1 (LINK MEDICINE CORPORATION)	13.11.2008
D03	CHADE A.R. et al. "Nongenetic causes of Parkinson's disease" Journal of Neural Transmission [Supplement] (2006) Vol. 70, N°. 3, páginas 147 - 151; DOI: 10.1007/978-3-211-45295-0_23.	2006
D04	THIRUCHELVAM M. et al. "Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype" Neuro Toxicology (octubre 2002) Vol. 23, N°. 4-5, páginas 621 - 633; DOI: 10.1016/S0161/S0161-813x(02)00092-x.	Octubre 2002

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-36, es un método para determinar el riesgo de desarrollar una α -sinucleinopatía o para determinar dicha enfermedad neurodegenerativa (Parkinson) basado en la detección y/o cuantificación mediante inmunoensayo de una proteína de la familia cry (SEQ ID NO 1; SEQ ID NO 2 o SEQ ID NO 3) (reiv. 1-10). También es objeto de la invención el uso de dicha proteína o de un anticuerpo específico de dicha proteína como biomarcador para determinar el riesgo de desarrollar una α -sinucleinopatía o para determinar dicha enfermedad neurodegenerativa (Parkinson) (reiv. 11-15). Otro objeto de la invención es el uso de un anticuerpo específico de dicha proteína para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una α -sinucleinopatía (Parkinson) (reiv. 16-22); una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo específico (reiv. 23-27) y un kit con los componentes necesarios para la realización del método de la invención (reiv. 28-35).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga métodos y kits para el diagnóstico o para determinar el riesgo de un sujeto de padecer una enfermedad neurodegenerativa. Los métodos divulgados se basan en la cuantificación de la proteína α -sinucleína y comparar los datos obtenidos con los obtenidos de sujetos sanos.

El documento D02 divulga métodos y composiciones para el tratamiento o prevención de sinucleinopatías, tales como el Parkinson. El tratamiento incluye la administración de un inhibidor de la farnesil transferasa y un agente que inhiba la agregación de la α -sinucleína.

El documento D03 divulga causas no genéticas de la enfermedad de Parkinson. Entre las causas divulgadas que incrementan el riesgo de padecer Parkinson se encuentran los pesticidas rotenona, el paraquat, la dieldrina y la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

El documento D04 divulga la relación entre la exposición continuada a pesticidas como el paraquat y el maneb durante una edad temprana del individuo con un aumento del riesgo a padecer Parkinson. Mientras que la exposición a pesticidas neurotóxicos como el DDT, bifenilos policlorados (policlorobifenilos (PCB)) o los piretroides, producen cambios neuroquímicos en el sistema colinérgico en el sistema nervioso central de individuos adultos, el paraquat puede producir entre otros, un incremento en la expresión de la α -sinucleína, y el maneb inhibe el transporte de glutamato y afecta a captación y liberación de la dopamina.

Aunque en las secuencias reivindicadas ya son conocidas en el estado de la técnica, no se ha encontrado divulgada la relación entre dichas secuencias y las α -sinucleinopatías.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-36. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-36. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-36 es con referencia a los documentos D01-D04 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).