

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 130**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2020** **PCT/EP2020/072559**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2021** **WO21028452**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2020** **E 20751577 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025** **EP 4014048**

54 Título: **Novedoso marcador de diagnóstico para enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

12.08.2019 EP 19191213

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2025

73 Titular/es:

OTTO, MARKUS (33.33%)
Hasslerstrasse 52
89077 Ulm, DE;
ÖCKL, PATRICK CHRISTIAN (33.33%) y
HALBGEBAUER, STEFFEN (33.33%)

72 Inventor/es:

OTTO, MARKUS;
ÖCKL, PATRICK CHRISTIAN y
HALBGEBAUER, STEFFEN

74 Agente/Representante:

ABRIL ABOGADOS, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 012 130 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Novedoso marcador de diagnóstico para enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y enfermedad de Alzheimer.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico o evaluación del estado de una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, como se define adicionalmente en las reivindicaciones, en particular de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o enfermedad de Alzheimer, y al uso de β -sinucleína como un biomarcador para el diagnóstico o evaluación del estado de dichas enfermedades asociadas a la degeneración sináptica como se define adicionalmente en las reivindicaciones, en particular de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o enfermedad de Alzheimer.

15 **Antecedentes de la invención**

Las sinapsis, las conexiones funcionales entre neuronas y otras neuronas o células, son sitios esenciales para la formación de memoria. Su disfunción o degeneración está asociada con el deterioro de la memoria, una característica clínica esencial de la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es un ejemplo de una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una pérdida progresiva de la función cognitiva debido a la degeneración de regiones cerebrales relacionadas, tales como el hipocampo, con etiología aún desconocida. La pérdida sináptica es un evento temprano en la patogénesis de la EA y ya empieza en la fase prodrómica de la enfermedad. La degeneración sináptica es un distintivo importante de la enfermedad de Alzheimer (EA) y el mejor indicador patológico de la disfunción cognitiva. Muestra una correlación más fuerte con la disfunción cognitiva que otras características neuropatológicas clave de la EA que incluyen placas, ovillos y pérdida neuronal.

Los biomarcadores en líquido son una herramienta deseada para evaluar y monitorizar la degeneración sináptica para el diagnóstico, en ensayos clínicos y seguimiento de pacientes y son más rentables que la obtención de imágenes por TEP.

Se han descrito previamente varias proteínas marcadoras sinápticas en líquido cefalorraquídeo (LCR), tales como neurogranina, SNAP-25 y GAP-43, y sus niveles de LCR están alterados en EA, sin embargo, los estudios de dichos biomarcadores en sangre no fueron satisfactorios hasta la fecha. La neurogranina, como el biomarcador sináptico mejor caracterizado, es elevada en LCR de pacientes con EA, pero no se podría observar diferencia en muestras de sangre que se atribuyen a la síntesis extracerebral adicional de neurogranina.

Los biomarcadores fiables combinados con exámenes clínicos no solo mejoran la exactitud del diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, sino que también son la clave más prometedora en ayudar a los profesionales clínicos en hacer un diagnóstico predictivo preciso. Por lo tanto, es más favorable el análisis de biomarcadores sustitutos en sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR), que refleja alteraciones bioquímicas o estructurales específicas en el sistema nervioso central (SNC). Para la enfermedad de Alzheimer (EA), la medición de proteína tau y el péptido amiloide- β 1-42 (A β 42) en el LCR, ya sea ha implementado satisfactoriamente en la clínica.

Sin embargo, ni tau como marcador de neurodegeneración general ni A β 42 como marcador para la deposición de amiloide reflejan la degeneración de sinapsis que ocurren en la EA u otras enfermedades neurodegenerativas. La evaluación de la disfunción sináptica, que desempeña una función importante en la patogénesis de la EA, podría ser de gran beneficio no solo para el diagnóstico, sino también en la monitorización de las características sinápticas de fármacos candidatos novedosos en ensayos clínicos. Además, la pérdida sináptica precede frecuentemente a la degeneración neuronal, por lo que ya ocurre en la EA temprana e incluso en pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL).

Además, la pérdida de sinapsis se asocia más estrechamente a deterioro cognitivo que la patología de ovillos y placas en la EA. La monitorización de esta pérdida por el análisis de una proteína sináptica sería de gran interés en la lucha por un diagnóstico precoz y/o afirmación pronóstica.

Los elevados niveles de la β -sinucleína (β Syn) presináptica en LCR se han descrito previamente en una pequeña cohorte de pacientes con EA (véase Oeckl, P. et al. (2016) Mol. Cell. Proteomics. 15, 3126-3138). Además, el documento de patente WO 2018/005791 desvela, por ejemplo, un método para proporcionar información clínica sobre TBI y el documento de patente US 2005/176078 desvela, por ejemplo, un método de diagnóstico de una sinucleinopatía, implicando ambos métodos, por ejemplo, la medición de la beta-sinucleína. Además, se ha descrito que la disminución de beta-sinucleína en áreas corticales del cerebro define un subgrupo molecular de demencia con cuerpos de Lewy (véase Beyer et al. (2010) Brain, 133(12), 3724-33).

Se mostró que la β Syn se expresaba en el sistema nervioso central (SNC) y estaba altamente enriquecida en el hipocampo, pero su función no es bien entendida. Existe evidencia de una participación en procesos asociados con la membrana en la sinapsis y se ha descrito un potencial antiagregación y función neuroprotectora. La β Syn está presente en la patología hipocámpica en la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y la enfermedad de Parkinson.

Dos mutaciones en el gen β Syn (V70M, P123H) están asociadas con DCL, lo que indica una conexión con la disfunción cognitiva.

La identificación de un biomarcador sináptico adecuado que refleje específicamente la degeneración sináptica junto con métodos fiables para la detección en líquidos corporales, tales como la sangre, que están más fácilmente accesibles que el LCR, tendría varias ventajas con respecto a la detección de biomarcadores en LCR, incluidos menores costes, menos riesgos y mayor conveniencia para pacientes y profesionales clínicos.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar métodos útiles y ventajosos para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas que proporcionen una determinación más exacta del estado de una enfermedad en un paciente individual y al mismo tiempo permitan que dichos métodos se lleven a cabo con mayor conveniencia, menores precios y riesgos reducidos al hacer posible la recogida de muestras del paciente en consultorios habituales.

Sumario de la invención

Estos objetos se han resuelto por los aspectos de la presente invención como se especifican en lo sucesivo.

Según el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método como se define en las reivindicaciones para el diagnóstico de una enfermedad o enfermedades asociados a la degeneración sináptica, comprendiendo el método determinar la concentración de β -sinucleína en una muestra de un paciente. Asimismo, se proporcionan métodos correspondientes para evaluar el estado de una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica como se define en las reivindicaciones.

Según el primer aspecto de la presente invención, la muestra del paciente es sangre, suero o plasma, preferentemente sangre, más preferentemente suero sanguíneo, incluso más preferentemente la muestra del paciente es una muestra de sangre, incluso más preferentemente una muestra de suero sanguíneo.

Según el primer aspecto de la presente invención, el método se lleva a cabo *ex vivo*.

Según una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica son una o más de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular o glioma, preferentemente la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica son enfermedad de Alzheimer y/o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, más preferentemente la enfermedad asociada a la degeneración sináptica es enfermedad de Alzheimer.

Según una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el método es para evaluar el estado de la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, o alternativamente un método de clasificación de un estadio, preferentemente un estadio pronóstico, de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, o alternativamente un método de monitorización de la progresión de la enfermedad en pacientes diagnosticados con o que se sospecha que tienen la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica.

Según una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la determinación de la concentración de β -sinucleína implica espectrometría de masas cuantitativa, preferentemente monitorización de reacciones múltiples/seleccionadas (MRM/SRM) o monitorización de reacciones paralelas (PRM), más preferentemente la determinación de la concentración de β -sinucleína se lleva a cabo por medio de monitorización de reacciones múltiples/seleccionadas o monitorización de reacciones paralelas, incluso más preferentemente midiendo los péptidos de aa 46 a 58 (EGVVQGVASVAEK) y/o 61 a 85 (EQASHLGAVFSGAGNIAAATGLVK) de β -sinucleína.

Según una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el valor de corte para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer es 10 pg/ml de β -sinucleína en suero, preferentemente 10,6 pg/ml.

Según otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el valor de corte para el diagnóstico de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es 39,8 pg/ml, preferentemente como se ha determinado por MRM en suero (índice de Youden).

Según una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la determinación de la concentración de β -sinucleína implica a matrices de moléculas individuales (Simoa), preferentemente la determinación de la concentración de β -sinucleína se lleva a cabo por medio de matrices de moléculas individuales, más preferentemente una etapa de inmunoprecipitación de β -sinucleína se lleva a cabo antes de la determinación de la concentración de β -sinucleína a través de matrices de moléculas individuales (Simoa).

Según una realización más preferida de la realización preferida precedente del primer aspecto de la presente invención, la configuración de las matrices de moléculas individuales emplea un anticuerpo monoclonal anti- β -sinucleína acoplado a perlas paramagnéticas carboxiladas y/o un anticuerpo monoclonal anti- α - y β -sinucleína

biotinilado como anticuerpo de detección y/o estreptavidina- β -galactosidasa (SBG) como reactivo enzimático y/o resorufina β -D-galactopiranosido como sustrato enzimático.

Según una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el método se usa para discriminar entre sí enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal de variante conductual y esclerosis lateral amiotrófica, en donde el método combina la determinación de niveles de neurofilamentos (NfL) y β -sinucleína en sangre, preferentemente en donde los niveles de neurofilamentos (NfL) en sangre son elevados con respecto a un valor de referencia para sujetos sanos.

Según el segundo aspecto de la presente invención, el uso de β -sinucleína como biomarcador se proporciona para el diagnóstico o la evaluación del estado de una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, preferentemente para evaluar la respuesta a terapia de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, y/o para clasificar un estadio de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, y/o para monitorizar el control de enfermedades de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, y/o para monitorizar la progresión de la enfermedad de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

Según una realización preferida del segundo aspecto de la presente invención, la β -sinucleína se usa como biomarcador en suero de un paciente.

Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra (A) la secuencia de aminoácidos de β Syn (UniProt Q16143) y los péptidos tripticos prototípicos de β Syn medidos por MRM (β Syn46-58 y β Syn61-85) subrayados en verde, (B) cromatogramas representativos de péptidos β Syn en LCR y suero medidos por MRM (péptido ligero (endógeno) (arriba), péptido pesado (abajo)), en donde los colores son las diferentes transiciones de MRM medidas, y (C) diagrama de dispersión de la concentración (pg/ml) de los dos péptidos β Syn medidos en LCR y suero (Suero).

La Figura 2 muestra la medición de β Syn en (A) LCR y (B) suero por MRM en una cohorte de descubrimiento de pacientes (Ulm). Los pacientes son controles (Con), pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), demencia frontotemporal de variante conductual (DFTvc), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ). Las cajas son medianas e intervalos intercuartílicos, los bigotes son mín. y máx. **p<0,01 frente a Con, ***p<0,001 frente a Con, ###p<0,001 frente a todos los otros grupos.

La Figura 3 muestra las concentraciones β Syn en LCR y suero medidas por MRM en la cohorte de descubrimiento (Ulm). Los pacientes con enfermedad de Alzheimer se dividieron en pacientes con deterioro cognitivo leve (EA-DCL, CDR<2,5), que representan la fase de enfermedad temprana, y los pacientes con demencia manifiesta (EA, CDR $\geq$ 2,5). Con: pacientes de control no neurodegenerativos. Las cajas son medianas e intervalos intercuartílicos, los bigotes son mín. y máx. **p<0,01 frente a Con, ***p<0,001 frente a Con.

La Figura 4 muestra (A) diagrama de dispersión y análisis de correlación (Spearman) de la concentración de β Syn en LCR con concentración de β Syn en suero (n=140) y tau en LCR (n=147) en la cohorte de descubrimiento (Ulm), y (B) análisis de la curva de eficacia diagnóstica (ROC) de β Syn en LCR (n=255, línea negra) y en suero (n=221, línea gris) para la discriminación de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles que incluyen pacientes de las tres cohortes. El ABC (área bajo la curva ROC) se da con el IC 95 % entre paréntesis. Los cortes se calcularon usando el índice de Youden.

La Figura 5 muestra la asociación entre beta-sinucleína Simoa en suero y espectrometría de masas (r = 0,76 (IC: 0,65- 0,84), p<0,0001).

La Figura 6 muestra (A) el análisis de los niveles de beta-sinucleína en suero de 112 muestras en total. Los resultados se muestran como diagramas de cajas con mediana de la concentración, percentiles del 25 % y 75 %, y bigotes del 5 % y 95 % en una escala logarítmica, y (B) la comparación de niveles de beta-sinucleína en suero entre sujetos CND y con EA. Los hallazgos se muestran como diagramas de puntos dispersos con media $\pm$ EEM. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos (*p<0,05, ***p<0,0001). EA, enfermedad de Alzheimer; DFTvc, demencia frontotemporal de variante conductual; ECJ, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; CND, control no demente; LCR, líquido cefalorraquídeo; EEM, error estándar de la media.

La Figura 7 muestra (A) la medición de los niveles de beta-sinucleína Simoa en suero con IP previa, y (B) niveles de NfL en suero correspondientes, en donde los resultados se muestran como diagramas de cajas con la mediana de concentración, percentiles del 25 % y 75 %, y bigotes del 5 % y 95 % en una escala logarítmica. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos (*p<0,05, ***p<0,0001). (C) Los análisis de ROC para la discriminación de ECJ y ELA (izquierda)/CND (centro)/EA (derecha). EA, enfermedad de Alzheimer; DFTvc, demencia frontotemporal de variante conductual; ECJ, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; LCR, líquido cefalorraquídeo; IP,

inmunoprecipitación; CND, control no demente; NfL, cadena ligera del neurofilamento.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores se han dedicado a resolver el problema de la presente invención y fue satisfactorio descubrir novedosos métodos para un diagnóstico fiable de enfermedades neurodegenerativas que proporcionan una determinación ventajosa del estado de una enfermedad con elevada conveniencia, menores precios y riesgos reducidos y que hacen posible la recogida de muestras del paciente en consultorios habituales.

Usando espectrometría de masas cuantitativa (MRM), los inventores demuestran que las elevadas concentraciones de la proteína presináptica β -sinucleína se pueden detectar en muestras de sangre de pacientes con EA y ECJ. Estos hallazgos sugieren la β -sinucleína como marcador en sangre para la degeneración sináptica que se puede usar en el diagnóstico diferencial de pacientes que padecen o se sospecha que padecen una enfermedad neurodegenerativa, ensayos clínicos que implican a dichos pacientes, seguimiento de pacientes y otras indicaciones.

En el presente documento, se proporciona un método para la cuantificación de la proteína presináptica β Syn en suero humano en un intervalo muy bajo de pg/ml por espectrometría de masas y se correlaciona satisfactoriamente con indicaciones y síntomas de enfermedades neurodegenerativas, tales como EA y ECJ. Esto es de gran relevancia clínica, puesto que hasta la fecha no está disponible ningún marcador sináptico en sangre.

La proteína postsináptica neurogranina se puede medir en sangre también, pero no varía en pacientes con EA y por lo tanto no es un marcador sináptico adecuado para enfermedades neurodegenerativas en sangre. Esto se atribuye a la síntesis extracerebral de alteraciones que enmascaran a la neurogranina de neurogranina derivada de cerebro en sangre. Hasta la fecha no se han medido otras proteínas sinápticas en sangre.

Además, la disfunción sináptica parece ser una valiosa lectura de ensayos clínicos de fármacos debido a su importancia en la patogénesis de la EA y la correlación con síntomas clínicos. La extracción de sangre es más rápida, más rentable y más conveniente para pacientes que la recogida de LCR, que es por lo que la medición de β Syn en suero es ventajoso con respecto a la β Syn en LCR u otros marcadores sinápticos en LCR. Permite una monitorización más detallada de la degeneración sináptica en estudios longitudinales y el cribado de mayores poblaciones para la selección de pacientes en ensayos clínicos.

También en pacientes que padecen ECJ, se podría observar un enorme aumento de β Syn en LCR y suero y se puede usar para discriminar ECJ de EA y otras enfermedades con casi 100 % de sensibilidad y especificidad. Esta observación está de acuerdo con la degeneración sináptica como característica neuropatológica primaria de ECJ y la ubicación sináptica de la proteína priónica cuyo plegamiento erróneo conduce al proceso degenerativo en ECJ. Por lo tanto, la β Syn es un biomarcador diagnóstico ideal para ECJ en sangre.

Otro candidato sería la cadena ligera de neurofilamentos (NfL) que también es elevada en ELA. La β Syn no cambia en ELA y, por lo tanto, es un marcador en sangre más adecuado para el diagnóstico de ECJ que NfL. Los niveles invariables de β Syn en LCR y suero en ELA también indican que la β Syn no es solo un marcador de neurodegeneración general. La combinación de mediciones de NfL y β Syn en sangre podría conducir a un potencial incluso mayor para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas. Puesto que la disfunción sináptica y la degeneración están asociadas a muchas otras enfermedades neurológicas o lesiones del SNC, tales como lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular o alcoholismo, un marcador sináptico en sangre será útil para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento personalizado o desarrollo de fármacos en enfermedades más neurodegenerativas.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico de una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, comprendiendo el método determinar la concentración de β -sinucleína en una muestra de un paciente como se define en las reivindicaciones. En una realización preferible de la presente invención, el método para el diagnóstico es para el diagnóstico en un mamífero, más preferentemente en un paciente humano.

La secuencia de aminoácidos de longitud completa de β -sinucleína en seres humanos se puede obtener con el número de acceso de UniProt Q16143. En el presente documento, la secuencia de aminoácidos de β -sinucleína se puede denominar SEQ ID No. 1.

La muestra de paciente que se van a usar en la presente invención preferentemente no se ha obtenido por punción lumbar. Más preferentemente, la muestra del paciente no contiene marcadores moleculares que se encuentran exclusivamente en LCR, pero no en otros líquidos corporales.

Basándose en la ventaja específica del método de la presente invención, la muestra del paciente comprende uno o más de sangre, suero o plasma. En realidad, cualquier líquido corporal en el que se pueda detectar β -sinucleína se podría usar en principio como muestra del paciente. Es más preferido que en la muestra del paciente esté contenida sangre e incluso es más preferido suero sanguíneo de un paciente. En una realización incluso más preferida, la

muestra de un paciente a analizar dentro del método de la presente invención es una muestra de sangre, particularmente preferentemente una muestra de suero sanguíneo.

El método de la presente invención se lleva a cabo *ex vivo*. En el contexto de la presente invención, el método se usa en casos de enfermedades asociadas a la degeneración sináptica que son una o más de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular o glioma. Sin embargo, se indica que, debido a la propiedad específica del método para reflejar directamente la degeneración sináptica, el método puede ser útil para cualquier tipo de enfermedad o afección que implique degeneración sináptica.

Todavía, más preferentemente en el contexto de la presente invención, la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica son enfermedad de Alzheimer y/o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Particularmente preferentemente, la enfermedad asociada a la degeneración sináptica es enfermedad de Alzheimer.

El método de la presente invención es útil para todos los tipos y etapas de determinación de los parámetros de enfermedad e indicaciones que pueden contribuir a o se consideran como un "diagnóstico". Preferentemente, el método sirve para evaluar el estado de la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica.

También preferentemente, el método sirve para determinar la respuesta a terapia de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica. También preferentemente, el método es para clasificar un estadio, preferentemente un estadio pronóstico, de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica. Alternativamente preferentemente, el método es para monitorizar la progresión de la enfermedad en pacientes diagnosticados con o que se sospecha que tienen la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica.

Preferentemente en el presente documento, la determinación de la concentración de β -sinucleína implica la espectrometría de masas cuantitativa, más preferentemente monitorización de reacciones múltiples/seleccionadas (MRM/SRM) y/o monitorización de reacciones paralelas (PRM). Incluso más preferentemente, la determinación de la concentración de β -sinucleína se lleva a cabo por medio de monitorización de reacciones múltiples/seleccionadas o monitorización de reacciones paralelas, particularmente preferentemente midiendo los péptidos de aa 46 a 58 (SEQ ID No. 2; EGVVQGVASVAEK) y/o 61 a 85 (SEQ ID No. 3; EQASHLGGAVFSGAGNIAAATGLVK) de β -sinucleína por medio de monitorización de reacciones múltiples.

Los valores de corte diagnóstico se calcularon a partir de valores de MRM en suero usando el índice de Youden, en donde un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. Se determinó que un valor de corte preferible para el diagnóstico de EA era 10,6 pg/ml. Se determinó que un valor de corte preferible para el diagnóstico de ECJ era 39,8 pg/ml.

Según una realización preferida de la presente invención, los valores de corte se van a usar para una determinación por el método de MRM usando como patrón de calibración una cuantificación de una concentración exacta de proteína de una disolución madre de β Syn por análisis de aminoácidos, más preferentemente los valores de corte se van a usar para una determinación por el método de MRM como se describe en el presente documento.

Según una realización de la presente invención, la determinación de la concentración de β -sinucleína implica matrices de moléculas individuales (Simoa), preferentemente la determinación de la concentración de β -sinucleína se lleva a cabo por medio de matrices de moléculas individuales, más preferentemente se lleva a cabo una etapa de inmunoprecipitación de β -sinucleína antes de la determinación de la concentración de β -sinucleína a través de matrices de moléculas individuales (Simoa).

La plataforma de la tecnología de matrices de moléculas individuales descrita anteriormente está disponible en el comercio y se comercializa con el nombre comercial de *SiMoA*[™] por Quanterix Corporation, Lexington, Masa., EE. UU., en el momento de la presentación. Sin embargo, alternativamente, se pueden usar en consecuencia otras versiones o modificaciones de dichas matrices de moléculas individuales o plataformas de tecnología. En esta realización específica preferida, se prefiere más que en la configuración de la matriz de moléculas individuales se emplee un anticuerpo monoclonal anti- β -sinucleína acoplado a perlas paramagnéticas carboxiladas y/o un anticuerpo monoclonal anti- α - y β -sinucleína biotinilado como anticuerpo de detección y/o estreptavidina- β -galactosidasa (SBG) como reactivo enzimático y/o resorufina β -D-galactopiranosido como sustrato enzimático.

Según una realización de la presente invención, se prefiere llevar a cabo una etapa de inmunoprecipitación de β -sinucleína antes de determinar la concentración de β -sinucleína en una muestra de un paciente.

Según el segundo aspecto de la presente invención, el uso de β -sinucleína como biomarcador se proporciona para el diagnóstico o la evaluación del estado de una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica como se define en las reivindicaciones. El uso de β -sinucleína no se debe entender limitado, en tanto que sea adecuado para el diagnóstico o la evaluación del estado de una enfermedad o enfermedades asociadas a la

degeneración sináptica.

Dentro de este contexto, el uso de β -sinucleína como biomarcador es aplicable en todos los tipos y etapas de determinación de los parámetros de enfermedad e indicaciones que pueden contribuir a o considerarse como un "diagnóstico" o "evaluación del estado de una enfermedad o enfermedades". Por tanto, se debe entender que las realizaciones preferidas del método de la presente invención como se describen anteriormente en este documento también se refieren al uso de la invención, si se considera técnicamente sensible por un experto

En particular, el uso de la presente invención es preferentemente para predecir y/o evaluar la respuesta a terapia de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica. También preferentemente, es para clasificar un estadio de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica. Más preferentemente, es para seleccionar el modo de tratamiento de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica. También es preferible monitorizar el control de enfermedad de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica. Preferentemente, es para monitorizar la progresión de la enfermedad de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica.

Según una realización preferida del segundo aspecto de la presente invención, la β -sinucleína se usa como biomarcador en suero de un paciente.

En la presente invención, los inventores establecieron satisfactoriamente un método de MRM para la cuantificación del marcador sináptico la proteína β Syn en suero humano en el intervalo muy bajo de pg/ml. Los elevados niveles de β Syn se mostraron en LCR y suero de pacientes con EA. La β Syn ya es elevada en la fase temprana de la enfermedad de EA (EA-DCL) y también aumentó en ECJ, pero no en DFTvc y ELA.

Los resultados presentados en el presente documento están de acuerdo con estudios de otras proteínas sinápticas en LCR, tales como neurogranina, SNAP-25 o GAP-43, que muestran niveles elevados en EA debido a la liberación de sinapsis de degeneración. La concentración de β Syn en LCR ya alcanzó un máximo en pacientes con EA-DCL (similar a neurogranina), lo que representa la fase prodrómica de EA que está en línea con una participación temprana de degeneración sináptica en la patogénesis de EA.

Lo que es más importante, las elevadas concentraciones de β Syn también se observaron en suero de pacientes con EA y mostraron una potencia de diagnóstico similar en comparación con β Syn en LCR. Esto es de gran relevancia clínica, puesto que ningún marcador sináptico en sangre está disponible hasta la fecha. Aquí, la ventaja de β Syn podría ser su expresión más específica en el SNC. Además, los marcadores presinápticos están más afectados que los marcadores postsinápticos en cerebros de EA, que es por lo que las diferencias de concentración de la β Syn presináptica podría ser más pronunciada en sangre. Hasta la fecha no se han medido otras proteínas sinápticas en sangre.

La disfunción sináptica podría ser una valiosa lectura para ensayos clínicos de fármacos debido a su importancia en la patogénesis de la EA y la correlación con síntomas clínicos. La extracción de sangre es más rápida, más rentable y más conveniente para pacientes que la recogida de LCR, que es por lo que la medición de β Syn en suero es ventajosa con respecto a la β Syn en LCR u otros marcadores sinápticos de LCR. Podría permitir una monitorización más detallada de la degeneración sináptica en estudios longitudinales y el cribado de mayores poblaciones para la selección de pacientes en ensayos clínicos.

Debido a que la EA se asocia frecuentemente a comorbilidades en la clínica, la estrategia en el campo de los biomarcadores cambió en los últimos años de buscar un único biomarcador de diagnóstico para un síndrome clínico al descubrimiento de biomarcadores que reflejan las patologías subyacentes. Esto es importante para permitir la medicina personalizada y también define dianas más claras para el desarrollo de fármacos. En este contexto, la clasificación ATN (patología "A"miloide, patología "T"au, "N"eurodegeneración) de biomarcadores se estableció en EA, que incluye los marcadores en LCR A β 42 (grupo "A"), tau fosforilada (grupo "T") y tau total (grupo "N").

Los marcadores de degeneración sináptica se asignan al grupo "N" y la presente invención proporciona evidencia de que β Syn es un marcador sináptico fiable que se puede añadir a este panel. Hasta la fecha, solo los marcadores en LCR están incluidos en el panel de ATN de biomarcadores en líquidos, pero los avances recientes en la sensibilidad de los ensayos para proteínas derivadas del SNC permitirán la adición de marcadores en sangre en el futuro. Ensayos para la determinación de A β y tau en sangre ya están disponibles y la β Syn es el primer marcador sináptico en sangre que se puede añadir, que permite la clasificación ATN también en sangre.

También se analizaron niveles de β Syn en pacientes con DFTvc y ECJ, puesto que son relevantes en el diagnóstico diferencial de EA. Los pacientes con DFTvc no mostraron una alteración significativa de β Syn en LCR y suero, que está de acuerdo con estudios en otros marcadores sinápticos de LCR. A diferencia, los pacientes con ECJ mostraron un aumento masivo de β Syn en LCR y suero y podrían discriminar ECJ de EA y otras enfermedades con

casi 100 % de sensibilidad y especificidad.

Esta observación está de acuerdo con la degeneración sináptica como característica neuropatológica primaria de ECJ y la ubicación sináptica de la proteína priónica cuyo plegamiento erróneo conduce al proceso degenerativo en ECJ. La participación sináptica en ECJ también se podría reflejar en el aumento más fuerte de la concentración de β Syn (30x) en comparación con la concentración de tau (8x) en la presente invención, puesto que se cree que tau es un marcador de neurodegeneración más general.

Por lo tanto, la β Syn es un biomarcador diagnóstico ideal para ECJ en sangre. Otro candidato es la cadena ligera de neurofilamentos (NfL), pero también es elevada en ELA. La β Syn no cambia en ELA y, por lo tanto, es un marcador en sangre más adecuado para el diagnóstico de ECJ que NfL. Los niveles de β Syn en suero invariables en ELA también indican que β Syn no es solo un marcador de neurodegeneración general.

Además de EA y ECJ, puede estar presente una gran posibilidad de la medición de β Syn en suero en otras indicaciones. La disfunción y degeneración sinápticas están asociadas con muchas otras enfermedades neurológicas o lesiones del SNC, tales como lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular o alcoholismo, donde un marcador sináptico en sangre podría ser útil para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento personalizado o desarrollo de fármacos.

En conclusión, los presentes datos proporcionan β Syn como marcador en sangre para degeneración sináptica en EA que se podría usar en ensayos clínicos, seguimiento de pacientes y tratamiento personalizado. La β Syn en suero es idealmente apta como un marcador de diagnóstico para ECJ con casi 100 % de sensibilidad y especificidad y podría ser un biomarcador útil en varias otras indicaciones neurológicas, tales como accidente cerebrovascular y lesión cerebral traumática.

Todas las realizaciones de la presente invención como se describen en el presente documento se consideran combinables en cualquier combinación, a menos que el experto considere que dicha combinación no tiene ningún sentido técnico.

Ejemplos

1. Análisis de MRM

Pacientes

Se reclutaron pacientes de la cohorte de descubrimiento en el Departamento de Neurología, Hospital Universitario de Ulm, con pacientes con ECJ adicionales de la unidad de supervisión para encefalopatías espongiformes transmisibles en el Departamento de Neurología en Göttingen. Las cohortes de validación se reclutaron independientemente en diferentes centros clínicos en Alemania. El técnico/científico que realizaba los análisis de β Syn se cegó a los diagnósticos de los pacientes en las cohortes de validación. Los datos demográficos de los pacientes se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos demográficos de pacientes

Pacientes	N (m/h) ¹	Edad (a) ¹	β Syn en LCR (pg/ml) ¹	β Syn en suero (pg/ml) ¹	Tau en LCR (pg/ml) ¹	A β 42 en LCR (pg/ml) ¹	MMSE ¹	CDR- SB/CDR ¹
<i>Cohorte de descubrimiento (Ulm)</i>								CDR-SB
Con	45 (24/21)	66 (60-77)	659 (521-860) ²	8,9 (7,1-10,4) ²	303 (254-381) ²	1486 (1137-1679) ²	n.a.	n.a.
EA	56 (38/18)	73 (68-78)	979 (738-1223)	12,9 (9,8-16,4) ²	749 (576-977)	470,5 (415-565)	23 (18-26) ²	3,5 (2,0-5,0)
DFTvc	16 (7/9)	66 (60-69)	770 (635-975) ²	8,0 (6,1-11,7) ²	361 (303-497)	883 (733-1192)	n.a.	n.a.
ELA	30 (13/17)	65 (57-70)	674 (531-968)	8,8 (7,1-10,3) ²	365 (285-472)	1295 (890-1490)	n.a.	n.a.
ECJ	25 (16/9)	64 (59-69)	19324 (10560-42570)	479 (259-843)	2294 (2283-3259) ²	n.a.	n.a.	n.a.
Valor de p ³	-	<0,001 ⁴	<0,001 ⁵	<0,001 ⁶	<0,001 ⁷	<0,001 ⁸	-	-

Pacientes	N (m/h) ¹	Edad (a) ¹	β Syn en LCR (pg/ml) ¹	β Syn en suero (pg/ml) ¹	Tau en LCR (pg/ml) ¹	A β 42 en LCR (pg/ml) ¹	MMSE ¹	CDR- SB/CDR ¹
<i>Cohorte de descubrimiento (Ulm)</i>								CDR-SB
EA, enfermedad de Alzheimer; ELA, esclerosis lateral amiotrófica; DFTvc, demencia frontotemporal de variante conductual; CDR, clasificación clínica de la demencia; CDR-SB, suma de cajas de CDR; ECJ, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; Con, pacientes de control no neurodegenerativo o de enfermedad; LCR, líquido cefalorraquídeo; f, mujer; m, hombre; MMSE, Miniexamen del estado mental; n.a., no disponible; Suero, suero; a, años ¹Los datos son mediana e intervalo intercuartílico ²no disponible para todos los pacientes ³Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn a posteriori ⁴p<0,05: DFTvc frente a EA; p<0,001: ELA frente a EA, ECJ frente a EA ⁵p<0,001: Con frente a EA, Con frente a ECJ, ECJ frente a ELA, ECJ frente a EA ⁶p<0,01: Con frente a EA; p<0,001: Con frente a ECJ, ECJ frente a ELA, ECJ frente a EA ⁷p<0,001: EA frente a Con, ELA y DFTvc, ECJ frente a Con, ELA y DFTvc ⁸p<0,001: EA frente a Con, ELA y DFTvc								

La EA se diagnosticó según los criterios de NIA-AA (McKhann, GM et al. (2011) *Alzheimer's Dement.* 7, 263-269), la demencia frontotemporal de variante conductual (DFTvc) según Rascovsky *et al.* (Rascovsky, K. et al. (2011) *Brain* 134, 2456-77), la esclerosis lateral amiotrófica según Ludolph *et al.* (Ludolph, A. et al. (2015) *Amiotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 16, 291-2) y los pacientes con enfermedad de Creutzfeldt-Jakob se verificaron neuropatológicamente (Organización Mundial de la Salud. Consensus on criteria for sporadic CJD, 1998). Los pacientes en los grupos de control no tuvieron enfermedad neurodegenerativa (Ulm).

Los diagnósticos de los pacientes de control incluyeron: cohorte de Ulm: los pacientes de control de Ulm fueron pacientes que recibieron una punción lumbar para excluir una inflamación del sistema nervioso central (parálisis facial (n=19), cefalea tensional (n=9), arteritis de la arteria temporal (n=3), migraña (n=2), neuropatía vestibular (n=2) y uno de cada uno de los diagnósticos: trastorno maníaco inducido por cortisona, neuralgia del nervio pudendo, polimialgia reumática, intoxicación, hemiespasmo del nervio facial, vértigo, síndrome de Meige, síndrome de L5, neuropatía del nervio óptico, trastorno de angustia.

Todos los pacientes o sus representantes legales dieron el consentimiento informado por escrito para ser incluidos en el estudio y los comités éticos de los centros clínicos participantes autorizaron el estudio.

Se recopilaron puntuaciones de LCR, suero y clínicas durante el proceso diagnóstico de pacientes. El LCR se recogió por punción lumbar según SOP locales, se centrifugó y se almacenó en 2 h a -80 °C. El suero se trató del mismo modo. Los inventores usaron el Miniexamen del estado mental (MMSE) y la clasificación clínica de demencia (CDR) para estimar la intensidad de la demencia y el deterioro cognitivo. La CDR se da como la suma de cajas (CDR-SB) en la cohorte de Ulm. Los inventores usaron cortes de CDR-SB establecidos para la subagrupación de pacientes con EA en pacientes con deterioro cognitivo leve debido a EA (EA-DCL, CDR-SB<2,5) y pacientes dementes con EA (CDR-SB≥2,5) (O'Bryant, SE et al. (2010) *Arch. Neurol.* 67, 746-9).

Reactivos

Se compraron β Syn recombinante de longitud completa (n.º S-1003) y β Syn de longitud completa marcada con ¹⁵N (síntesis personalizada) de rPeptide (Bogart, GA, EE. UU.). Las proteínas se disolvieron en agua y se cuantificó la concentración exacta de proteína de la disolución madre de β Syn usando análisis de aminoácidos (Alfalyse A/S, Odense, Dinamarca). El anticuerpo monoclonal anti- β Syn EP1537Y se compró de Abcam (Cambridge, GB).

Patrones de calibración

Se prepararon patrones de calibración para mediciones de LCR en LCR artificial (aCSF, EcoCyt Bioscience, Austin, TX, EE. UU.) que contenían 200 µg/ml de albúmina de suero humano con las siguientes concentraciones de β Syn: 21,8, 43,6, 87,1, 218, 305, 436, 871, 2178, 3485 y 4356 pg/ml. Para las mediciones de suero, se prepararon patrones de calibración en PBS que contenían 1 % de suero con las siguientes concentraciones de β Syn: 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 15,0, 20,0 y 40,0 pg/ml.

Preparación de muestras para LCR-MRM de β Syn

Se prepararon muestras de LCR y patrones de calibración (200 µl cada uno) para análisis de MRM de β Syn como se describió previamente (Oeckl, P. et al. (2016) *Mol. Cell. Proteomics.* 15, 3126-3138), pero usando β Syn de longitud completa marcado con ¹⁵N como patrón interno (IS). En resumen, las muestras se enriquecieron con tampón

TEAB, ^{15}N - βSyn y tripsina/LysC y se digirieron durante 16 h a 27 °C. La digestión se detuvo con TFA (1 % final) y se fraccionó por centrifugación a través de STAGE-Tips de intercambio catiónico fuerte en 3 fracciones. Las fracciones se almacenaron en un inyector automático refrigerado hasta el análisis.

5 Preparación de muestras para IP-MRM en suero de βSyn

El anticuerpo anti- βSyn EP1537Y se acopló covalentemente a perlas magnéticas recubiertas de epoxi (kit de acoplamiento de anticuerpos Dynabeads, n.º 14311D, Thermo, Waltham, MA, EE. UU.) durante 20-24 h a 37 °C según las instrucciones del fabricante usando 2 μg de anticuerpo por mg de perla. Las perlas recubiertas de EP1537Y se lavaron con glicina-HCl 100 mM (pH 2,5)/0,05 % de Tween y finalmente se resuspendieron en PBS/0,05 % de Tween hasta su uso.

Se mezclaron muestras de suero y patrones de calibración (950 μl cada uno) con 135 μl de disolución de patrón interno (TEAB 815 mM, 0,37 % de Tween, 1,78 ng/ml de ^{15}N - βSyn , concentración final: TEAB 100 mM, 0,05 % de Tween, 22,2 pg/ml de ^{15}N - βSyn) en tubos de baja unión a proteínas (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), que se recubrieron con NaCl. Las muestras se purificaron previamente usando 0,5 mg de perlas no acopladas durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de inmunoprecipitación de βSyn con 0,5 mg de perlas recubiertas con EP1537Y según se muestra durante 20-24 h a 4 °C en un rotador.

Las perlas se lavaron tres veces con 500 μl de TEAB 100 mM y se eluyeron con 25 μl de glicina-HCl 50 mM (pH 2,5). La digestión de proteína se realizó durante 2,5 h a 37 °C añadiendo 10 μl de 50 ng/ml de tripsina/LysC (Promega, Madison, WI, EE. UU.) (disuelto en TEAB 500 mM) y se detuvo usando 5 μl de 2 % de TFA/72 % de acetonitrilo. Las muestras se almacenaron en un inyector automático refrigerado hasta el análisis.

25 Análisis de CL-EM/EM y ajustes de MRM

El análisis por MRM de βSyn se realizó con un espectrómetro de masas QTRAP6500 acoplado a un Eksigent MicroLC200 (ambos de AB Sciex, Darmstadt, Alemania), bomba 1260 HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) e inyector automático refrigerado HTC PAL-xt (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza). Para cromatografía de líquidos se usaron una columna trampa C18 PepMap100, 5 μm , 0,3 $\times$ 5,0 mm (Thermo, Waltham, MA, EE. UU.) y la columna analítica Eksigent HALO Fused-core C18, 2,7 μm , 0,5 $\times$ 100 mm. Se cuantificaron dos péptidos prototípicos de βSyn por MRM (βSyn 46-58 y βSyn 61-85, véase la Fig. 1A y Tabla 2). Las condiciones cromatográficas y los ajustes de MRM se describen por Oeckl *et al.*, 2016 (en el lugar citado).

Tabla 2. Péptidos trípticos de βSyn usados para el análisis de MRM

Péptido tríptico de βSyn	Masa del precursor (m/z)	Estado de carga (z)	Masa del fragmento (m/z)	CE (V)
βSyn46-58 (EGVVQGVASVAEK)	636,8 (ligero)	2	760,4 (y8+)	31,0
			888,5 (y9+)	30,2
			987,6 (y10+)	31,5
	644,3 (pesado)	2	769,4 (y8+)	31,0
			899,5 (y9+)	30,2
			999,5 (y10+)	31,5
βSyn61-85 (EQASHLGGAVFSGAGNIAAATGLVK)	776,1 (ligero)	3	730,5 (y8+)	33,5
			798,9 (b17++)	27,5
			659,4 (y7+)	35,0
	786,1 (pesado)	3	739,4 (y8+)	33,5
			809,4 (b17++)	27,5
			667,4 (y7+)	35,0
CE, energía de colisión				

Se usó una curva de calibración externa para la cuantificación usando la relación del área de los picos (ligeros/pesado) y una ponderación de $1/x^2$. Se usó la regresión lineal para las mediciones de LCR y una curva cuadrática para IP-MRM de suero. Los datos se analizaron usando Analyst Software 1.6.2 (AB Sciex, Darmstadt, Alemania) y Skiline 4.1 (MacLean, B. *et al.* (2010) *Bioinformatics* **26**, 966-8). Para calcular la concentración de βSyn en LCR, los inventores usaron la concentración media de ambos péptidos medidos.

En suero, los inventores usaron el péptido β Syn46-58 como cuantificador y β Syn61-85 como cualificador, puesto que β Syn61-85 estuvo frecuentemente cerca del límite de detección y mostró mayor variabilidad. Se incluyeron muestras de control de calidad de LCR y suero (QC) en todas las series para monitorizar la precisión y exactitud intranalíticas e interanalíticas.

Determinación de tau y A β 42

Los biomarcadores principales de EA tau y A β 42 se determinaron en LCR por ELISA de Fujirebio (Gante, Bélgica) según las instrucciones del fabricante.

Estadística

Se realizó el análisis estadístico por GraphPad Prism 5.00. Las comparaciones por grupo se hicieron usando la prueba de Mann-Whitney bilateral (dos grupos) o la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn a posteriori (>2 grupos). El análisis de correlación se realizó usando el coeficiente de correlación ordinal de Spearman.

Se usó un modelo de regresión lineal para el ajuste de edad de los valores de β Syn en LCR y suero para comparaciones por grupos. El potencial de diagnóstico de β Syn se calculó usando el análisis de la curva de eficacia diagnóstica (ROC) y los cortes diagnósticos se seleccionaron usando el índice de Youden. Un valor de la $p < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

Los inventores establecieron satisfactoriamente un método para la cuantificación absoluta de la proteína presináptica β Syn en suero por espectrometría de masas. En la Fig. 1B se muestran cromatogramas representativos de los dos péptidos medidos y los valores medidos de ambos péptidos se correlacionaron fuertemente ($r=0,73$, Fig. 1C) soportando la especificidad del MRM. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue 2,0 pg/ml y los CV intranalíticos e interanalíticos fueron 3,3-8,6 % y 11,7 %.

Las desviaciones de muestras diluidas (hasta cuatro veces) y muestras con adiciones (+10 pg/ml de β Syn) estuvieron en el intervalo deseado de ≤ 15 % y β Syn en suero fue estable durante al menos cinco ciclos de congelación/descongelación y 2 h a temperatura ambiente. La adición de 0,5 % de sangre completa en el suero y la congelación por choque (imitando la hemólisis) no afectaron a las mediciones. Esto indica que β Syn en suero es un biomarcador robusto.

Además, el método de MRM de β Syn descrito previamente para LCR (Oeckl *et al.*, 2016; en el lugar citado) mejoró al incluir la β Syn de longitud completa marcada con ^{15}N como IS, el método de referencia para la cuantificación absoluta por MRM (Fig. 1B,C). Los CV intranalíticos e interanalíticos fueron 0,6-9,3 % y 5,1 %, la estabilidad de la dilución se probó y confirmó hasta cuatro veces, las muestras de LCR con adición mostraron una desviación en el intervalo deseado (≤ 15 %) y la β Syn fue estable en LCR durante al menos cinco ciclos de congelación/descongelación.

Usando métodos de MRM establecidos y validados, los inventores investigaron β Syn en LCR y suero en una cohorte de descubrimiento bien conocida de EA ($n=56$) y pacientes de control no neurodegenerativos (Con, $n=45$) con un diagnóstico clínico claro (cohorte de Ulm). La cohorte también incluyó otras enfermedades neurodegenerativas, es decir, DFTvc ($n=16$), ECJ ($n=25$) y ELA ($n=30$). ECJ y DFTvc se incluyeron puesto que son relevantes en el diagnóstico diferencial de EA, y ELA sirvió de enfermedad caracterizada por la neurodegeneración rápida e intensa para comparación con ECJ.

La concentración de β Syn en suero en controles fue aproximadamente 75x inferior a en LCR (mediana de 8,9 pg/ml frente a 659 pg/ml). Esta diferencia está en el intervalo esperado conocido de otras proteínas derivadas del SNC. Los inventores observaron una correlación muy débil (LCR, $r=0,23$) y débil (suero, $r=0,32$), pero significativa, de la concentración de β Syn con la edad en pacientes de control ($p < 0,05$ para LCR, $p < 0,01$ para suero). Por lo tanto, la edad se incluyó como factor de confusión en pruebas estadísticas, pero no para el cálculo de curvas ROC y valores de corte.

No hubo efecto del sexo sobre la concentración de β Syn en LCR ($p \geq 0,43$) al comparar pacientes femeninos y masculinos en todos los grupos. La β Syn en suero tampoco fue diferente en pacientes femeninos y masculinos en la cohorte de Ulm ($p=0,64$ en Con y $p=0,39$ en EA).

Se observaron concentraciones de β Syn en LCR significativamente elevadas en pacientes con EA ($p < 0,001$), pero no en pacientes con DFTvc y ELA en comparación con controles en la cohorte de descubrimiento (Fig. 2A y Tabla 1). Además, se observó un gran aumento (30 veces) de β Syn en LCR en ECJ en comparación con todos los otros grupos ($p < 0,001$).

Hubo un patrón similar de concentración de β Syn en suero en comparación con LCR. Los inventores observaron

β Syn en suero significativamente elevada en EA ($p<0,01$) y más pronunciada en pacientes con ECJ ($p<0,001$) en comparación con controles en la cohorte de descubrimiento (Fig. 2B y Tabla 1).

El grupo de EA de la cohorte de Ulm se dividió en EA-DCL (CDR-SB $<2,5$) y pacientes dementes con EA (CDR-SB $\geq 2,5$). La β Syn en LCR ya era significativamente elevada en pacientes con EA-DCL ($p<0,01$) y también en pacientes dementes con EA ($p<0,001$) en comparación con controles (Fig. 3). La β Syn en suero aumentó en pacientes dementes con EA ($p<0,001$) y no alcanzó el nivel de significancia en pacientes con DCL (Fig. 3).

La β Syn en LCR mostró una correlación moderada con β Syn en suero ($r=0,55$, $p<0,001$, Fig. 4A) y una fuerte correlación con tau en LCR ($r=0,81$, $p<0,001$, Fig. 4A) en la cohorte de Ulm. La correlación de β Syn en LCR con A β 42 en LCR fue débil ($r=-0,34$, $p<0,001$). La β Syn en suero también mostró una correlación moderada con tau en LCR ($r=0,53$, $p<0,001$). No hubo correlación de β Syn en LCR y suero con CDR-SB en pacientes con EA como una medida de intensidad de la demencia ($r=-0,16$, $p=0,24$ y $r=0,26$, $p=0,09$).

La correlación de β Syn en LCR con MMSE fue ligeramente significativa en pacientes con EA de la cohorte de Ulm ($r=0,31$, $p=0,03$). Se usó el análisis de curvas ROC para probar el potencial diagnóstico de β Syn. β Syn en LCR mostró una sensibilidad y especificidad del 91 % y 54 % para EA frente a controles en un corte de 685 pg/ml en la cohorte de Ulm ($n=99$) y 77 % y 66 % en un corte de 686 pg/ml en la cohorte acumulada que incluye datos de centros adicionales (datos de centros adicionales no mostrados individualmente; $n=255$, Fig. 4B, Tabla 3).

La potencia diagnóstica de β Syn en suero fue similar a LCR con una sensibilidad y especificidad del 75 % y 78 % en la cohorte de Ulm (corte 10,6 pg/ml, $n=76$) y 74 % y 69 % en la cohorte acumulada (corte 10,2 pg/ml, $n=221$, Fig. 4B, Tabla 3). En particular, tanto β Syn en LCR como en suero discriminaron ECJ de controles, EA y ELA con casi 100 % de sensibilidad y especificidad (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de curvas ROC de la concentración de β Syn en LCR y suero

Comparación	Biomarcador	% de sensibilidad (IC 95 %)	% de especificidad (IC 95 %)	ABC (IC 95 %)	Corte (pg/ml)
<i>Cohorte de Ulm</i>					
EA frente a Con ($n=99$)	β Syn en LCR	91 (80-97)	54 (38-69)	0,76 (0,66-0,86)	685
EA frente a DFTvc ($n=71$)	β Syn en LCR	61 (47-74)	73 (45-92)	0,69 (0,53-0,84)	891
EA frente a ECJ ($n=81$)	β Syn en LCR	100 (86-100)	98 (91-100)	1,00 (1,00-1,00)	2153
ECJ frente a Con ($n=68$)	β Syn en LCR	100 (86-100)	98 (88-100)	1,00 (1,00-1,00)	1836
ECJ frente a ELA ($n=55$)	β Syn en LCR	100 (86-100)	100 (88-100)	1,00 (1,00-1,00)	1881
EA frente a Con ($n=76$)	β Syn en suero	75 (60-87)	78 (60-91)	0,75 (0,64-0,86)	10,6
EA frente a DFTvc ($n=54$)	β Syn en suero	90 (56-100)	57 (41-72)	0,76 (0,61-0,92)	12,0
EA frente a ECJ ($n=69$)	β Syn en suero	96 (80-100)	100 (92-100)	0,98 (0,94-1,02)	46,0
ECJ frente a Con ($n=57$)	β Syn en suero	96 (80-100)	100 (89-100)	0,99 (0,98-1,01)	39,8
ECJ frente a ELA ($n=54$)	β Syn en suero	96 (80-100)	100 (88-100)	1,00 (0,99-1,01)	37,8
<i>Cohorte acumulada</i>					
EA frente a Con ($n=255$)	β Syn en LCR	77 (70-84)	66 (56-74)	0,76 (0,71-0,82)	686
EA frente a Con ($n=221$)	β Syn en suero	74 (66-82)	69 (58-78)	0,73 (0,67-0,80)	10,2
EA, enfermedad de Alzheimer; ELA, esclerosis lateral amiotrófica; ABC, área bajo la curva ROC; DFTvc, demencia frontotemporal de variante conductual; ECJ, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; Con, pacientes de control no neurodegenerativo o de enfermedad; LCR, líquido cefalorraquídeo; Suero, suero					

2. Análisis SiMoA

Pacientes

Todas las muestras (LCR y suero) examinadas en este estudio se obtuvieron de pacientes vistos en los Departamentos de Neurología de Ulm y Göttingen. La recogida y el análisis de especímenes de suero fue autorizada por el Comité ético en Ulm (número de autorización 20/10) y Göttingen (100305). Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado previo al enrolamiento en los estudios y se sometieron a exámenes clínicos, neurológicos y parcialmente neurorradiológicos. Todos los métodos se llevaron a cabo según las pautas autorizadas.

Los pacientes de Ulm se dividieron en 6 grupos según su diagnóstico; enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia frontotemporal de variante conductual (DFTvc), sinucleinopatías (enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), enfermedad de Parkinson-demencia (EPD)), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y controles no dementes (CND).

El diagnóstico de 70 pacientes con EA de Ulm se hizo según los criterios del Grupo 2 de trabajo internacional (Dubois B. et al. (2014) *The Lancet Neurology*, 13, 614-629). Los 29 pacientes con ELA fueron diagnosticados con ELA evidente o probable según los criterios revisados de El Escorial (Brooks BR. et al. (2000) *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders: official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, 1, 293-299). Los pacientes con DFTvc (n=18) fueron diagnosticados según criterios internacionales (Rascovsky *et al.*, 2011; *loc. cit.*).

Los especialistas analizaron 46 sujetos con sinucleinopatías para trastornos del movimiento según los criterios del Banco de cerebros de la Sociedad de EP del Reino Unido (Hughes AJ et al. (1992) *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 55, 181-184). Los 23 pacientes con ECJ fueron casos confirmados neuropatológicamente analizados en la unidad para encefalopatías espongiiformes transmisibles del Departamento de Neurología en Göttingen (Brown P et al. (2003) *WHO Manual for Surveillance of Human Transmissible Spongiform Encephalopathies Including Variant Creutzfeldt-Jakob Disease*. World Health Organization, Communicable Disease Surveillance and Response).

En la cohorte de control no demente, se incluyeron 65 sujetos de Ulm sin signos clínicos y radiológicos para neurodegeneración (por ejemplo, quejas subjetivas, cefalea tensional, parálisis del nervio facial (no inflamatoria)). Además, todos los pacientes de control no dementes presentados no fueron positivos para los marcadores típicos de EA (tau total >450 pg/ml, fosfo-tau (p-Tau) >61 pg/ml y Aβ42 <550 pg/ml en el LCR).

La estratificación de la cohorte de EA en pacientes con EA y EA con solo deterioros cognitivos leves (DCL) se hizo según la escala de clasificación de demencia clínica (CDR) (Hughes CP et al. (1982) *The British Journal of psychiatry: the journal of mental science*, 140, 566-572). Para la evaluación la suma de CDR de cajas (CDR SOB) se eligió (O'Bryant, SE et al. (2008) *Archives of neurology*, 65, 1091-1095). Los pacientes que presentaron una CDR SOB inferior a 2,5 se clasificaron como EA-DCL (O'Bryant, SE *et al.*, 2010; en el lugar citado). El diagnóstico de PD-DCL se hizo según los criterios consenso propuestos por el grupo de trabajo de la Sociedad de Trastornos del Movimiento (Litvan I et al. (2012) *Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines*. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 27, 349-356).

Marcadores de laboratorio y reproducibilidad de ensayos

Se recibieron muestras de suero de sangre periférica por centrifugación (800 g, 5 min), se separaron en alícuotas y se almacenaron en 2 horas a -80 °C hasta el análisis. Los exámenes en suero incluyeron la cadena ligera de neurofilamentos (NfL) y la beta-sinucleína en suero, ambas medidas con una plataforma Simoa (Quanterix, Lexington, MA, EE. UU.). Para el análisis de NfL, se aplicó el kit de NfL disponible comercialmente de Quanterix. Para la medición de beta-sinucleína se estableció un ensayo de elaboración propia. Se probó la variabilidad del ensayo de beta-sinucleína en suero por muestras de control como triplicados en dos series diferentes. Para el análisis de beta-sinucleína en suero, se determinó que la variabilidad intranalítica era de 4,3 % y la interanalítica de 12,8 %. Todos los valores deben entenderse como valores medios. Las muestras fueron estables después de hasta cinco ciclos de congelación y descongelación, así como durante 2 h de almacenamiento a temperatura ambiente (variabilidad <6 %).

Ensayo de beta-sinucleína en suero Simoa en detalle

Para el análisis de beta-sinucleína en suero, se estableció un ensayo "de elaboración propia" altamente sensible para la plataforma Simoa de Quanterix. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal anti-beta-sinucleína específico EP1537Y de Abcam se acopló a perlas paramagnéticas carboxiladas (Quanterix, Lexington, MA, EE. UU., 100451) según el protocolo del fabricante. Además, el anticuerpo monoclonal anti-alfa- y beta-sinucleína EP1646Y libre de albúmina de suero bovino y azida de Abcam (ab189217) se biotiniló con un exceso molar 40x de biotina y posteriormente se usó como anticuerpo de detección.

Para la biotinilación, se usó el kit EZ-Link® Micro Sulfo-NHS-Biotinylation (Thermo n.º 21925). Tampones para perlas y detector fueron PBS-Tween 0,5 % y PBS-Tween 0,05 %, respectivamente. La estreptavidina-β-galactosidasa (SBG) proporcionada por Quanterix (100439) se diluyó en tampón SBG proporcionado por el fabricante (100376) a una concentración final de 150 pM.

Como sustrato, se usó resorufina β-D-galactopiranosido (RGP) (Quanterix, 103159). Se prepararon calibradores que variaban de 0,625 a 100 pg/ml en cloruro sódico (NaCl) (2 M) con beta-sinucleína recombinante (rPeptide, S-1003-1) y se añadieron 400 µl de cada uno a una placa de 96 pocillos proporcionada por Quanterix. Las muestras de suero se diluyeron uno a uno con NaCl 4 M dando como resultado una concentración final de NaCl 2 M y se agitaron

durante 10 min a TA a 1200 rpm. Se añadieron 220 µl de muestra diluida a cada pocillo. Se dispusieron perlas, detector, SBG, placa y sustrato en la plataforma Simoa y se inició el ensayo a medida.

Las siguientes etapas/reactivos son cruciales para el satisfactorio establecimiento de este ensayo

- dos anticuerpos Abcam mencionados anteriormente
- preparado de muestra/calibrador usando un tampón de muestra/calibrador preparado a medida (NaCl 4 M / 2 M)
- tiempo de incubación de perlas/muestra prolongado de 120 min (habitual 15 min)
- uso de un tampón de perlas preparado a medida con una concentración especialmente alta de Tween (0,5 %)
- alto volumen de 172 µl de muestra/calibrador (habitual 100 µl)

Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de la U de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas en dos grupos. Para comparaciones de tres o más grupos se eligió la prueba de Kruskal-Wallis con posterior prueba de Dunn a posteriori en caso de resultados significativos. Para los cálculos del corte, se realizaron análisis de las curvas de eficacia diagnóstica (ROC). Se seleccionaron los niveles de corte para maximizar el índice de Youden (sensibilidad+especificidad-1) y la relación de mejor probabilidad. Para determinar correlaciones significativas entre parámetros, se usó el coeficiente de correlación cardinal de Spearman. Para todos los análisis, $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa. Los cálculos estadísticos se realizaron aplicando el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

Rasgos demográficos y manifestaciones clínicas de la cohorte de Ulm

Todos los parámetros demográficos y clínicos relevantes se resumen en la Tabla 4. La edad no se diferenció significativamente entre grupos, excepto para pacientes con ELA y ECJ que fueron más jóvenes en comparación con la cohorte de EA ($p < 0,0001$).

Tabla 4. Datos demográficos de pacientes

	Cohorte de Ulm					
	Con	EA	ELA	DFTvc	Sinucleinopatías	ECJ
N	65	70	29	18	46	23
h/m	30/35	24/46	17/12	9/9	31/15	8/15
Edad en PL ^a (años)	69,7 ± 8,0	73,4 ± 7,2	63,5 ± 11,4	67,8 ± 7,0	69,7 ± 8,7	65,1 ± 8,8
Tau total en LCR ^b [pg/ml]	347 ± 102	780 ± 148	376 ± 148	406 ± 196	305 ± 146	13537 ± 11938
Aβ-42 en LCR ^c [pg/ml]	1241 ± 392	536 ± 174	1283 ± 265	888 ± 302	906 ± 308	
p-Tau ^d en LCR	34,7 ± 15,5	64,3 ± 43,5	34,1 ± 15,2	52,0 ± 26,4	52,5 ± 17,9	
NfL ^e en suero [pg/ml]	18,0 ± 12,2	26,5 ± 18,5	117,0 ± 100	22,5 ± 12,8		204,6 ± 177,5
Beta-sinucleína ^f en LCR [pg/ml]	484 ± 195	875 ± 271	596 ± 204	598 ± 237	561 ± 231	13690 ± 8414
Media ± DE de MMSE		21,3 ± 5,3				
Media ± DE de CDR SOB	-	3,9 ± 2,4	-	-	-	-

Tabla 1. Parámetros demográficos, clínicos y de biomarcadores en LCR y suero de la cohorte de Ulm.

^aELA frente a EA $p < 0,0001$, ECJ frente a ED $p < 0,0001$; ^bELA frente a EA $p < 0,0001$, frente a ECJ $p < 0,0001$; ^cCND frente a EA $p < 0,0001$, frente a ECJ $p < 0,0001$, EA frente a DFTvc $p < 0,0001$, frente a sinucleinopatías $p < 0,0001$, frente a ECJ $p < 0,001$, ECJ frente a DFTvc $p < 0,0001$, frente a sinucleinopatías $p < 0,0001$; ^dELA frente a EA $p < 0,0001$, frente a sinucleinopatías $p < 0,0001$, CND frente a EA $p < 0,0001$, frente a sinucleinopatías $p < 0,05$, EA frente a DFTvc $p < 0,0001$, frente a sinucleinopatías $p < 0,0001$; ^eELA frente a EA $p < 0,001$, frente a sinucleinopatías $p < 0,001$, CND frente a EA $p < 0,001$, frente a sinucleinopatías $p < 0,05$; ^fELA frente a CND $p < 0,0001$, frente a EA $p < 0,0001$, frente a DFTvc $p < 0,0001$, ECJ frente a Con $p < 0,0001$, frente a EA $p < 0,0001$, frente a DFTvc $p < 0,0001$; ^gELA frente a EA $p < 0,0001$, frente a ECJ $p < 0,0001$, CND frente a EA $p < 0,0001$, frente a ECJ $p > 0,0001$, EA frente a DFTvc $p < 0,001$, frente a sinucleinopatías $p < 0,0001$, frente a ECJ $p < 0,001$, ECJ frente a DFTvc $p < 0,0001$, frente a sinucleinopatías $p < 0,001$.

Abreviaturas; - no disponible; Aβ-42, β-amiloide 1-42; EA, enfermedad de Alzheimer; ELA, esclerosis lateral amiotrófica; DFTvc, demencia frontotemporal de variante conductual; CDR SOB, suma de cajas de la clasificación clínica de la demencia; ECJ, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; LCR, líquido cefalorraquídeo; f, mujer; PL, punción

lumbar; m, hombre; MMSE, Miniexamen del estado mental; N, número; CND, control no demente; NfL, cadena ligera de neurofilamento; p-tau, fosfo-tau; DE, desviación estándar.

No se encontró asociación entre los niveles de beta-sinucleína en suero y la edad en todos los pacientes ($r = -0,14$ (IC: $-0,32-0,05$), $p=0,14$), así como en ninguna cohorte individual. No hubo diferencia significativa en el sexo entre las cohortes, excepto por EP frente a CND/ECJ/EA y EA frente a ELA. Sin embargo, el sexo no tuvo efecto sobre los niveles de beta-sinucleína en LCR y suero (datos no mostrados). La mediana del Miniexamen del estado mental (MMSE) y los valores de CDR SOB en la cohorte de EA fueron 23 y 3,25 respectivamente.

10 **Establecimiento de un ensayo Simoa para la detección de beta-sinucleína en sangre**

Para la medición de beta-sinucleína, los inventores desarrollaron un ensayo Simoa sensible para el análisis de beta-sinucleína en sangre con un CV intranalítico e interanalítico de 4,3 % y 12,8 %, respectivamente. Los resultados Simoa demuestran altas asociaciones con los niveles de beta-sinucleína en sangre medidos por espectrometría de masas ($r = 0,76$ (IC: $0,65-0,84$), $p<0,0001$) (Fig. 5).

15 **Cuantificación de beta-sinucleína en suero**

Para el análisis de beta-sinucleína en suero, fue necesario establecer un enfoque de Simoa altamente sensible debido a la baja concentración de la proteína sináptica en sangre. Después del desarrollo satisfactorio de Simoa, los inventores analizaron en total 112 muestras de suero de Ulm agrupados en 35 pacientes CND, 39 EA, 16 DFTvc y 22 ECJ (véase la Fig. 6A).

Los pacientes con ECJ mostraron los mayores niveles de beta-sinucleína que fueron estadísticamente significativamente elevados ($p<0,0001$) en comparación con las otras tres cohortes. Entre EA y CND, los elevados niveles de beta-sinucleína se podrían detectar en sujetos con EA (véase la Fig. 6B). No hubo diferencia en los valores de beta-sinucleína en suero entre pacientes con EA y DFTvc.

30 **Inmunoprecipitación de beta-sinucleína**

Para aumentar más la sensibilidad, los inventores realizaron una inmunoprecipitación (IP) de beta-sinucleína en suero antes del análisis mediante Simoa. Para la validación de la IP Simoa, se eligieron 17 CND, 25 EA, 4 ECJ y esta vez también pacientes con ELA ($n=21$). En la medición de IP, la mediana de los niveles de beta-sinucleína en suero de los pacientes con ECJ no fue solo significativamente elevada ($p<0,0001$) en comparación con pacientes CND, sino que también mostró mayores niveles ($p<0,05$) que los sujetos con ELA. Los casos de EA presentaron, comparables al enfoque de Simoa sin IP previa, elevados niveles ($p<0,05$) en comparación con los controles (véase la Fig. 7A).

40 **Niveles de NfL en suero y análisis ROC**

Además de la evaluación de la beta-sinucleína en suero, los inventores también analizaron los niveles de NfL en suero en las cohortes de pacientes con el objetivo para compararlos con los niveles de beta-sinucleína en suero (véase la Fig. 7B). Como ya se ha descrito, los niveles de NfL de ELA fueron significativamente mayores ($p<0,0001$) que los niveles de EA, DFTvc y CND (EA: 21,3, DFTvc: 20,5, CND: 15,2 pg/ml). Sin embargo, no se pudo detectar una diferencia significativa entre pacientes con ELA y ECJ (139 pg/ml).

Este hallazgo impulsó a los presentes inventores a analizar beta-sinucleína en el suero de un mayor número de pacientes con ELA y ECJ, así como en una cohorte de sujetos con un resultado de NfL "positivo falso" (actualmente en curso). Al realizar análisis de ROC de los niveles de beta-sinucleína en suero de pacientes con ELA/EA/CND frente a ECJ se descubrieron discriminaciones casi perfectas en todas las curvas ROC (resultados preliminares, véase la Fig. 7C).

Para la evaluación de beta-sinucleína en sangre, los inventores desarrollaron un Simoa ultrasensible, esperando evaluar la proteína sináptica también en el suero de pacientes que sería de gran valor en estudios neurológicos longitudinales y ensayos clínicos. Los resultados de beta-sinucleína en suero muestran que también los pacientes con ECJ en sangre tienen los valores más altos con diferencia y los niveles de EA parecen también aumentar en comparación con la cohorte de CND a pesar de un grado mucho más pequeño que en LCR. Los motivos para el gran solapamiento con pacientes de control pueden ser variados y asignarse en dos grupos; (i) motivos fisiológicos, (ii) problemas del ensayo.

Para (i), la beta-sinucleína parece ser casi exclusivamente expresada en el cerebro. (ii), se excluyó la reactividad cruzada de beta-sinucleína con alfa- y gamma-sinucleína. Los efectos de matriz podrían interferir con el análisis, sin embargo, los experimentos con beta-sinucleína con adición mostraron buena recuperación.

Como ya se ha mencionado, los pacientes con ECJ presentaron niveles de beta-sinucleína claramente elevados también en sangre. Esto fue debido a la naturaleza de la rápida enfermedad neurodegenerativa, esperada pero

también una prueba de eficacia preliminar para la beta-sinucleína en suero Simoa. Además, los resultados demostraron que los pacientes con ECJ también tenían altos niveles de NfL comparable a los de los pacientes con ELA, así el análisis de NfL solo no puede distinguir entre ELA y ECJ. Hasta la fecha, los niveles de NfL en LCR y suero de pacientes con ELA son un biomarcador ampliamente aceptado en el diagnóstico de ELA.

5 Lo más interesante, los sujetos con ELA tuvieron, a diferencia de pacientes con ECJ, bajos niveles de beta-sinucleína en suero, que hacen que el ensayo de beta-sinucleína en suero sea una excelente prueba de biomarcadores basados en sangre para el diagnóstico diferencial de ELA frente a ECJ. Al realizar el análisis de ROC para beta-sinucleína en suero de ELA frente a ECJ, los dos trastornos neurológicos se podrían distinguir con casi el
10 100 %.

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico o evaluación del estado de una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, en donde la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica son una o más de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular y/o glioma, comprendiendo el método determinar la concentración de β -sinucleína en una muestra de un paciente, en donde la muestra del paciente es sangre, suero o plasma, y en donde el método se lleva a cabo *ex vivo*.
5
2. Método según la reivindicación 1, en donde la muestra del paciente es una muestra de sangre, preferentemente una muestra de suero sanguíneo.
10
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica son enfermedad de Alzheimer y/o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, preferentemente en donde la enfermedad asociada a la degeneración sináptica es enfermedad de Alzheimer.
15
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método es para evaluar el estado de la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, o alternativamente un método de clasificación de un estadio, preferentemente un estadio pronóstico, de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, o alternativamente un método de monitorización de la progresión de la enfermedad en pacientes diagnosticados con o que se sospecha que tienen la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica.
20
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la determinación de la concentración de β -sinucleína implica espectrometría de masas cuantitativa, preferentemente monitorización de reacciones múltiples/seleccionadas (MRM/SRM) o monitorización de reacciones paralelas (PRM), más preferentemente en donde la determinación de la concentración de β -sinucleína se lleva a cabo por medio de monitorización de reacciones múltiples/seleccionadas o monitorización de reacciones paralelas, incluso más preferentemente midiendo los péptidos de aa 46 a 58 (EGVVQGVASVAEK) y/o 61 a 85 (EQASHLGGAVFSGAGNIAAATGLVK) de β -sinucleína.
25
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el valor de corte para el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer es 10 pg/ml de β -sinucleína en suero, preferentemente 10,6 pg/ml.
30

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el valor de corte para el diagnóstico de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es 39,8 pg/ml, preferentemente como se ha determinado por MRM en suero (índice de Youden).

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la determinación de la concentración de β -sinucleína implica matrices de moléculas individuales (Simoa), preferentemente la determinación de la concentración de β -sinucleína se lleva a cabo por medio de matrices de moléculas individuales, más preferentemente en donde una etapa de inmunoprecipitación de β -sinucleína se lleva a cabo antes de la determinación de la concentración de β -sinucleína a través de matrices de moléculas individuales (Simoa).

9. Método según la reivindicación 8, en donde la configuración de las matrices de moléculas individuales emplea un anticuerpo monoclonal anti- β -sinucleína acoplado a perlas paramagnéticas carboxiladas y/o un anticuerpo monoclonal anti- α - y β -sinucleína biotinilado como anticuerpo de detección y/o estreptavidina- β -galactosidasa (SBG) como reactivo enzimático y/o resorufina β -D-galactopiranosido como sustrato enzimático.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método se usa para discriminar entre sí enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal de variante conductual y esclerosis lateral amiotrófica, en donde el método combina la determinación de los niveles de neurofilamento (NfL) y de β -sinucleína en sangre, preferentemente en donde los niveles de neurofilamento (NfL) en sangre son elevados con respecto a un valor de referencia para sujetos sanos.

11. Uso de β -sinucleína como un biomarcador para el diagnóstico o la evaluación del estado de una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, preferentemente para evaluar la respuesta a terapia de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, y/o para clasificar un estadio de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, y/o para monitorizar el control de enfermedad de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica, y/o para monitorizar la progresión de la enfermedad de un paciente diagnosticado con o que se sospecha que tiene una enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica,

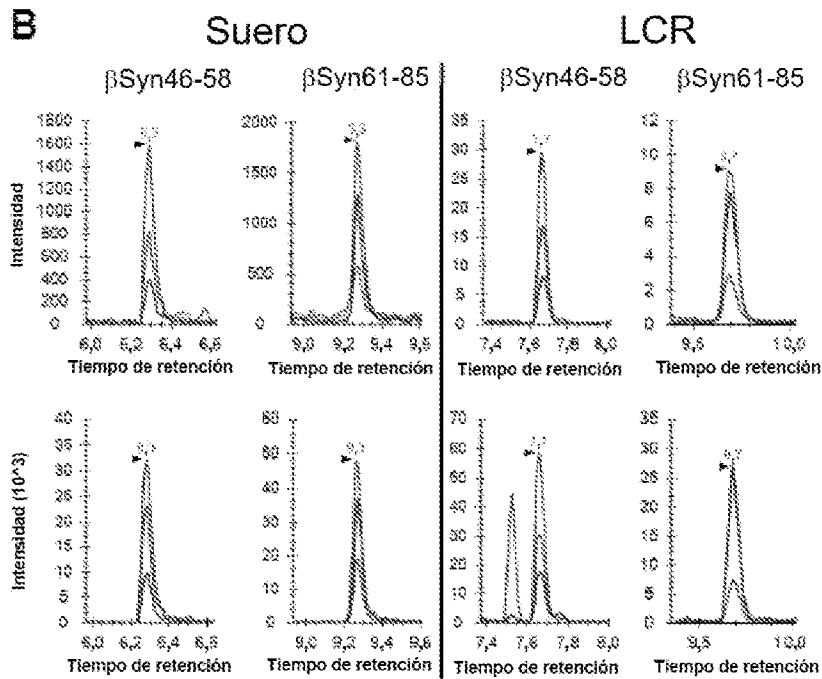
en donde la enfermedad o enfermedades asociadas a la degeneración sináptica son una o más de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular y/o glioma,

en donde el uso comprende determinar la concentración de β -sinucleína en una muestra del paciente, en donde la muestra del paciente es sangre, suero o plasma, y en donde el uso es *ex vivo*.

12. Uso según la reivindicación 11, en donde la β -sinucleína se usa como biomarcador en suero de un paciente.

A Secuencia de β Syn

10 20 30 40 50 60
MDVFMKGLSM AKEGYAAAE KTRQGVTEAA ETRKEGVLYY GSKTRKEGVLYY GSKTRKEGVLYY
70 80 90 100 110 120 130
EQASHESGAY TSCNHNAAA TGLYKREEFP TDLRPEEVAQ EAAEEPLIEP UNEPEGESYE DPPQEYQYQY EPEA



C Correlación de péptidos de β Syn medidos

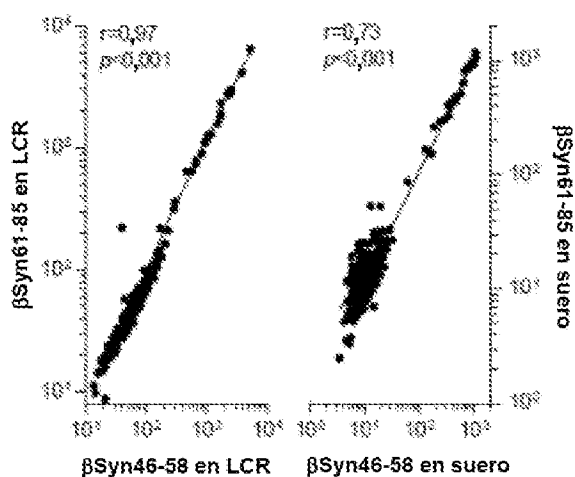


Figura 1

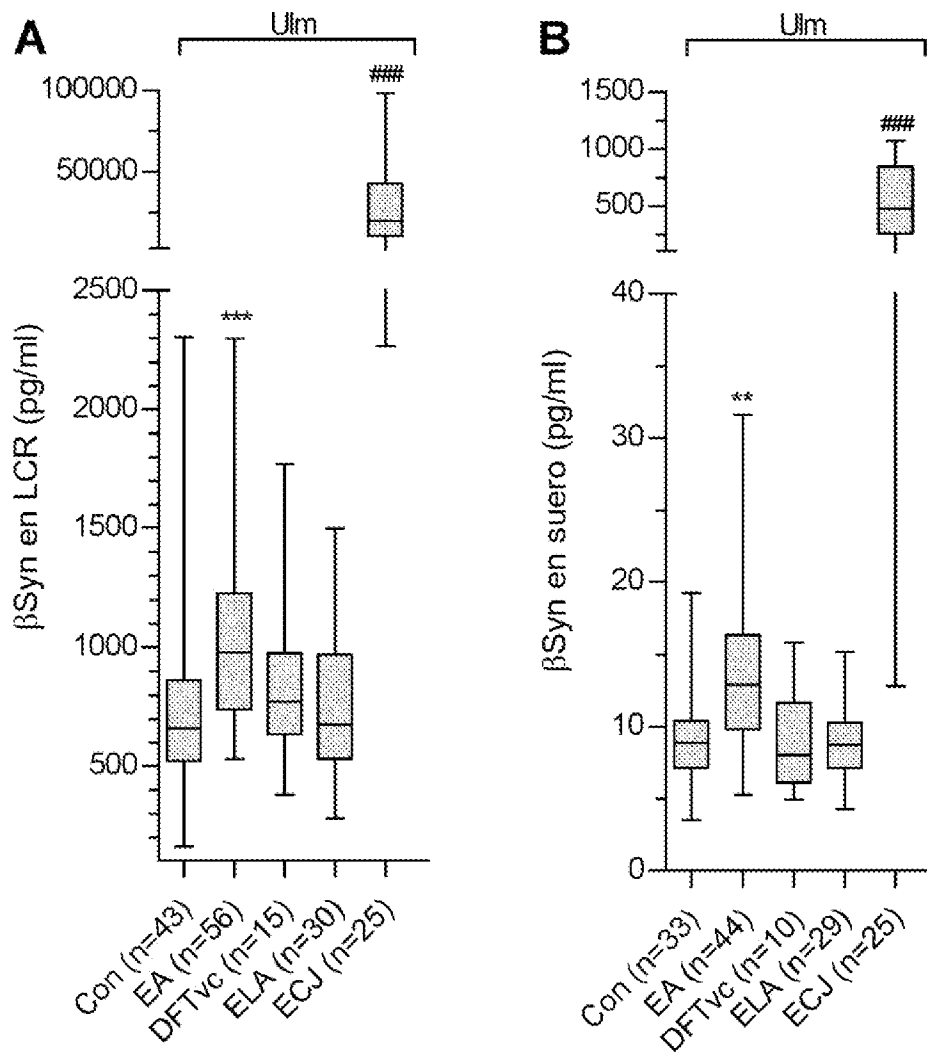


Figura 2

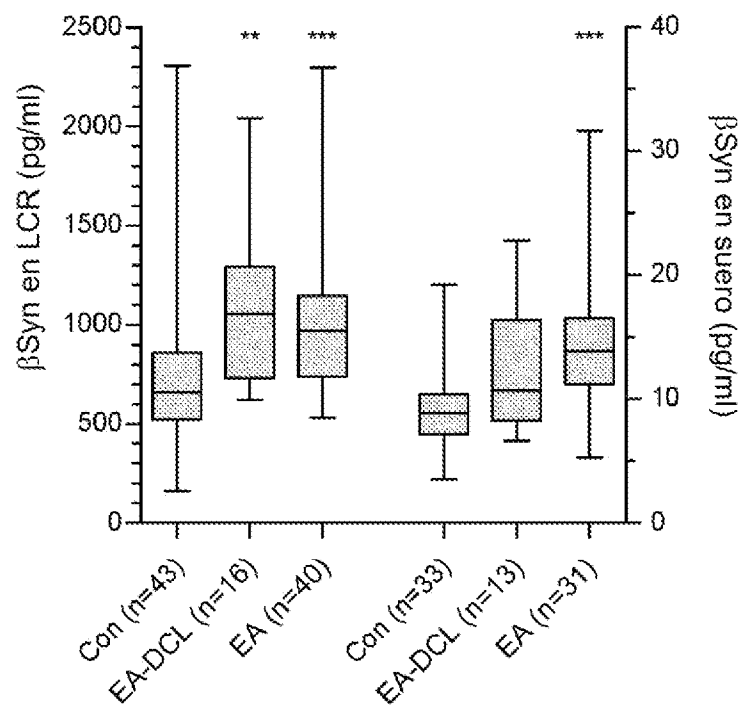


Figura 3

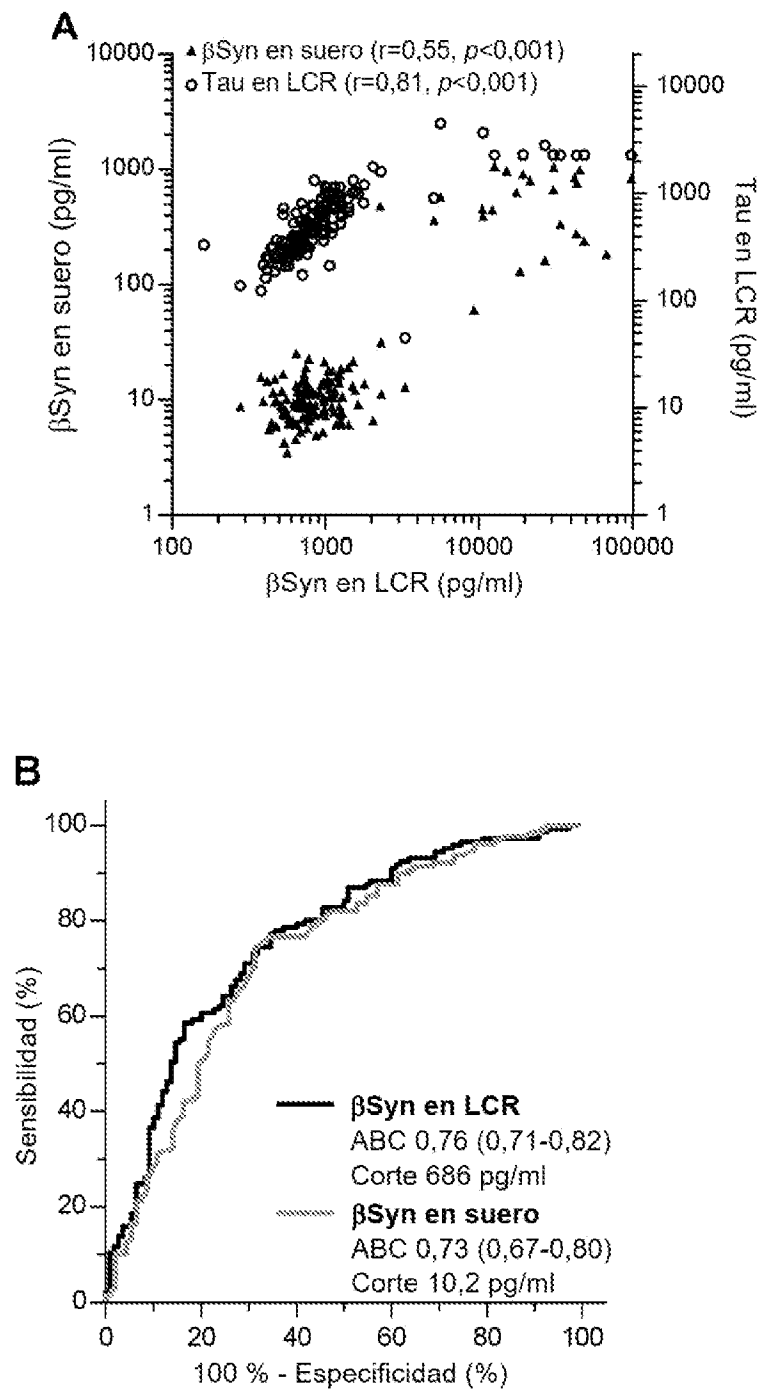


Figura 4

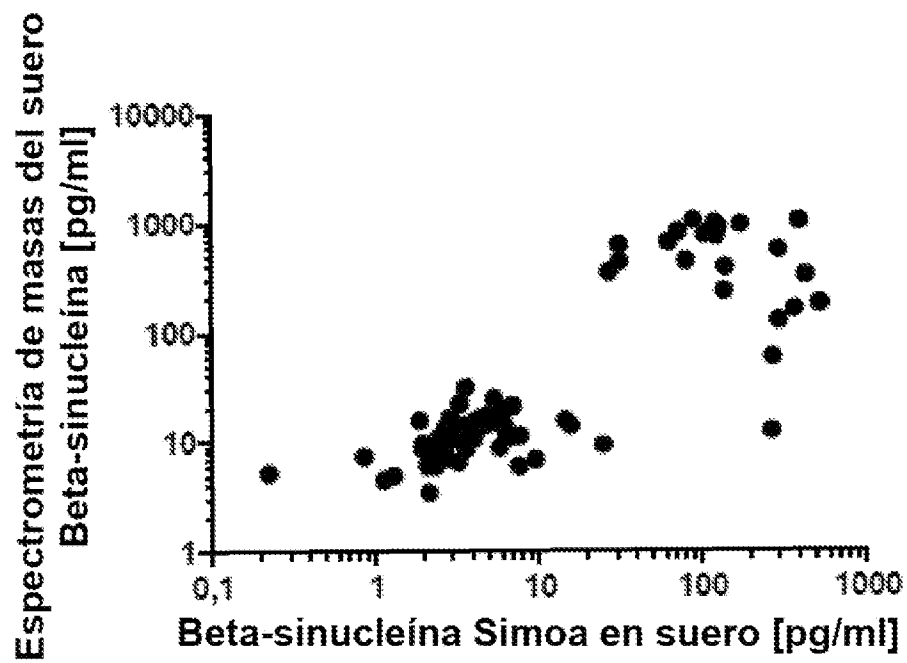


Figura 5

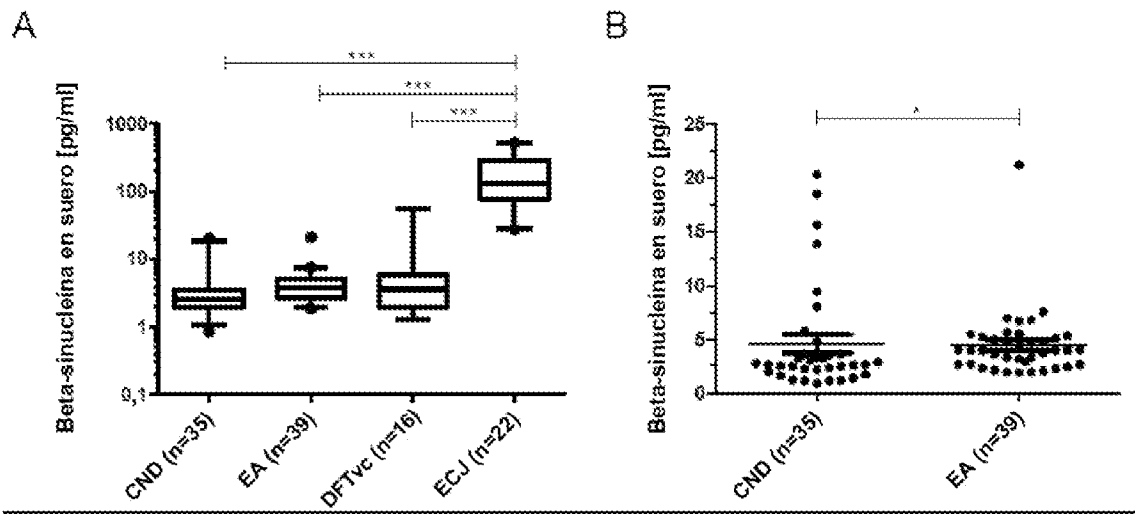


Figura 6

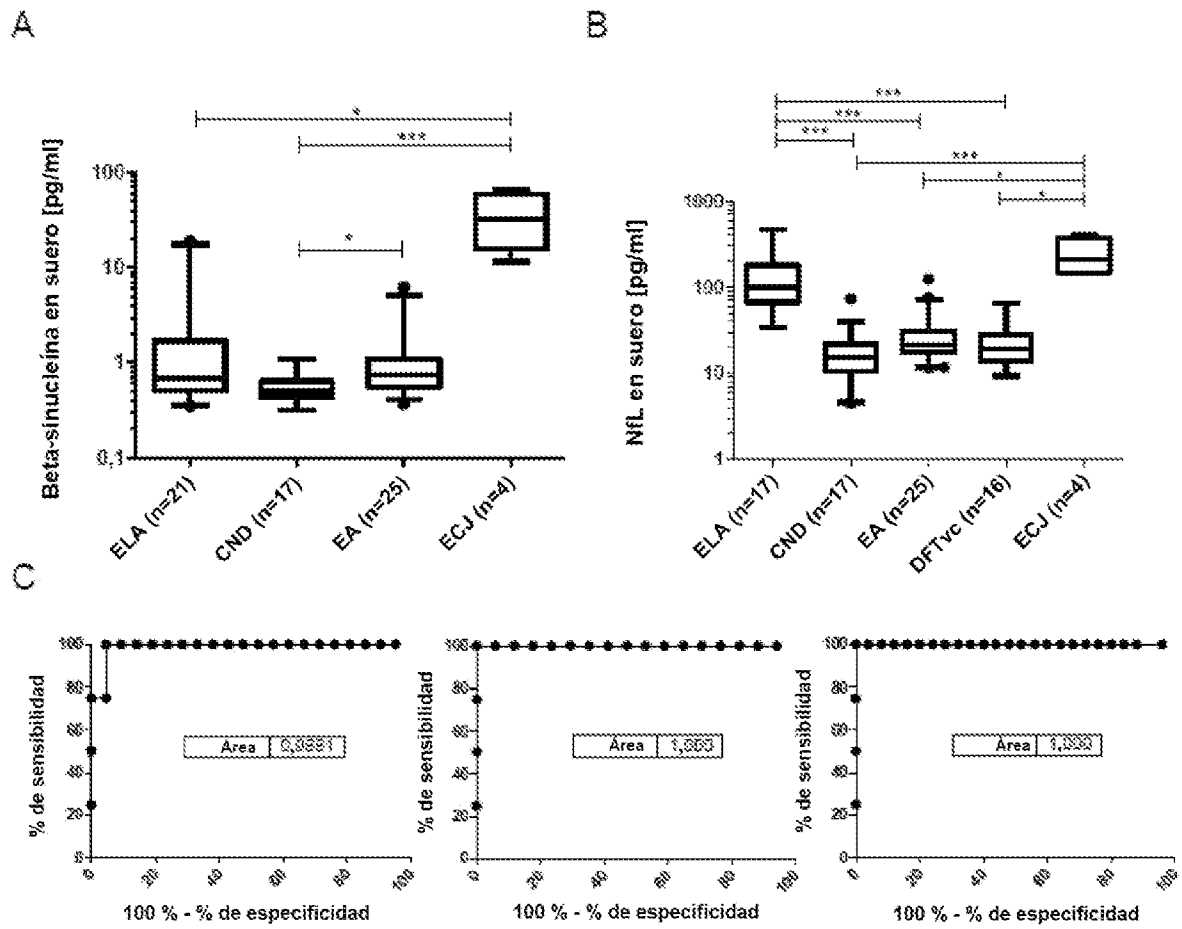


Figura 7