(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
29 de marzo de 2012 (29.03.2012)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/038565 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2011/000282

(22) Fecha de presentación internacional: 20 de noviembre de 2011 (20.11.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad: P201031403 21 de septiembre de 2010 (21.09.2010) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Otri - Universisad de Sevilla, Paseo de las Delicias s/n Pabellón, de Brasil, E-41013 Sevilla (ES).

(72) Inventor; e

(75) Inventor/Solicitante *(para US solamente)*: **FERNÁNDEZ ESPEJO, Emilio** [ES/ES]; Dpto. Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina Avda. Dr. Fedriani s/n, E-41009 Sevilla (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PROTEINS OF THE CRY FAMILY AS MARKERS FOR DETERMINING THE RISK OF DEVELOPING AN α-SYNUCLEINOPATHY OR DETERMINING SAID DISEASE

(54) Título : PROTEÍNAS DE LA FAMILIA CRY COMO MARCADORES PARA DETERMINAR EL RIESGO A DESARROLLAR UNA α-SINUCLEINOPATÍA O DETERMINAR DICHA ENFERMEDAD

Fig. 1A

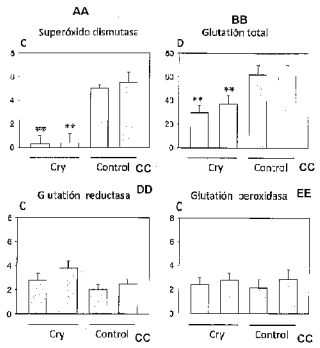
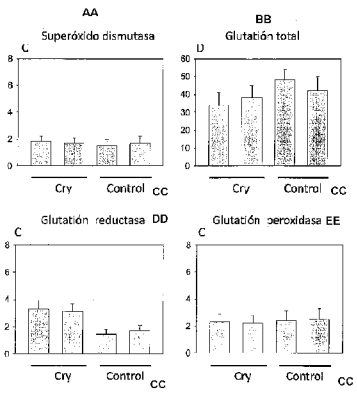


Fig. 1B



AA... Superoxide dismutase
BB... Total glutathione
CC... Control
DD... Glutathione reductase
EE... Glutathione peroxidase

(57) **Abstract**: The invention relates to a method for determining the risk of developing an α-synucleinopathy or determining said neurodegenerative disease, by means of the detection and/or quantification of Cry proteins, neurotoxic agents that can give rise to this disease. Preferably, the α-synucleinopathy is Parkinson's disease.

(57) **Resumen**: 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.

WO 2012/038565 A2

GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*

— *la fecha de presentación de la solicitud internacional está dentro del plazo de dos meses a partir de la fecha de expiración del periodo de prioridad (Regla 26bis.3)*

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 anormalidades en el proceso de ciertas proteínas (principalmente las proteínas amiloides sinucleina 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 neurópilo 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 (^{15}fluorodopa) 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 neurotropo (con afinidad por el tejido nervioso) o un prión (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 INVENCIÓN

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 el 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.

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:

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).

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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

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/.

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 [*Bacillus thuringiensis* serovar berliner ATCC 10792]	ZP_04106093.1	100
Cry1Ab [*Bacillus thuringiensis*]	ABS18384.1	99
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* IBL 200	ZP_04075355.1	95
Cry1Af [*Bacillus thuringiensis*]	AAB82749.1	93
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* subespecie sotto str. T04001]	ZP_04130277.1	91
Cry1Aa [*Bacillus thuringiensis* serovar aizawai]	BAA00257.1	90

Cry1Ac [*Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki]	CAA70856.1	90
Cry1Ad [*Bacillus thuringiensis*]	AAA22340.1	86
Cry1Ag [*Bacillus thuringiensis*]	Q9S515.1	86
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki str. T03a001]	ZP_04118188.1	86
Cry1Ac22 [*Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki]	ABZ01836.1	86
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* 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 [*Bacillus thuringiensis*]	P0A366.1	99
Cry1Ac [*Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki]	CAA70856.1	99
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* serovar sotto str. T04001]	ZP_04130277.1	97
Cry1Ag [*Bacillus thuringiensis*]	Q9S515.1	94

Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* IBL 200]	ZP_04075355.1	93
CrylAd [*Bacillus thuringiensis*]	Q03744.1	91
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* serovar berliner ATCC 10792]	ZP_04106093.1	90
Cry1Ab [*Bacillus thuringiensis*]	ABS18384.1	89
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki str. T03a001]	ZP_04118188.1	85
Cry1Ac [*Bacillus thuringiensis* serovar kenyae]	AAX18704.2	85
Cry1A [*Bacillus thuringiensis*]	AAQ14326.1	74
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* IBL 200]	ZP_04075345.1	66

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 [*Bacillus thuringiensis*]	AAN07788.1	99
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki str. T03a001]	ZP_04118188.1	99
Cry1Ac22 [*Bacillus*	ABZ01836.1	99

thuringiensis serovar kurstaki]		
Cry1Ac [*Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki]	CAQ30431.1	96
Cry1Ab [*Bacillus thuringiensis*]	ABB72460.1	83
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* serovar berliner ATCC 10792]	ZP_04106093.1	83
Cry1Ab [*Bacillus thuringiensis* serovar tolworthi]	AAZ06794.1	83
Cry1Af [*Bacillus thuringiensis*]	P96315.1	79
Cry1Aa [*Bacillus thuringiensis*]	AAP40639.1	76
CrylAd [*Bacillus thuringiensis*]	Q03744.1	73
Cry1A32 [*Bacillus thuringiensis*]	AAX86871.1	65
Cry1Ae [*Bacillus thuringiensis* 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 inmunoadsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o microarrays de proteínas.

El inmunoensayo puede ser un ensayo inmunoadsorbente 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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).

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.

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.

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:

(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.

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.

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 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.

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 diminuyen la transcripción del gen, la maduración del RNAm, la traducción del RNAm y la modificación post-traduccional. Un agente inhibidor puede estar constituido por un péptido, una proteína, 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.

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.

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, 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.

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.

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.

En esta memoria, el término "adyuvante" se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por si 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.

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.

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, intra-arterial, 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 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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

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

1A. Muestra los niveles medidos en la sustancia negra de ratas expuestas a proteínas Cry (*Dipel*) 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.

1B. Muestra los niveles medidos en el estriado dorsal de ratas expuestas a proteínas Cry (*Dipel*) 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.

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

Cry, expuestos a proteínas Cry.
C, U/mg.
D, µM/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.

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.

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.

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

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 neuropatológcas en secciones de cerebro de rata de 22 meses de edad, expuestas a proteínas Cry a los seis meses de edad.

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.

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.

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.

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).

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

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 eosinofiílica).

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).

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.

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.

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.

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.

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 hipercinesia 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.

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).

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 µM 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*.

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.

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.

Para el estudio neuropatológico se sacrificaron las ratas a los 22 meses de edad, se extirpó el cerebro y se almacenó en 4% paraformaldehido en

tampón fosfato (PB) 0.1M (pH 7.2-7.4) a 4ºC, y luego se sumergió toda la noche en 20% sacarosa en PBS (tampón fosfato salino). Se cortaron secciones cerebrales (30 µm espesor) en un criostato (Microm, Italia) y se guardó en PBS. Luego se inactivó la peroxidasa endógena con 0.3% H_2O_2 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.

Respecto a los métodos estereológicos, se aplicó el principio de *Cavaleri* 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.

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-sinucleina o de inclusiones de α-sinucleína con una disposición similar a la de los cuerpos de Lewy en humanos (Figura 4).

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.

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.

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 rafé 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:

    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).

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.

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.

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.

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.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la proteína del paso (b) es detectada y/o cuantificada por inmunoensayo.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la α-sinucleinopatía es Parkinson.

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 o un fragmento de las mismas, como biomarcador para determinar el riesgo de desarrollar una α-sinucleinopatía o para determinar dicha enfermedad neurodegenerativa.

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.

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.

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.

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.

16. Uso de un agente inhibidor 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 o un fragmento de las mismas 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.

21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, donde el agente inhibidor es un anticuerpo específico de dicha proteína.

22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, donde la α-sinucleinopatía es Parkinson.

23. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, donde el medicamento comprende al menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.

24. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, donde el medicamento comprende al menos otro principio activo.

25. Composición farmacéutica que comprende, al menos, un agente inhibidor 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 o un fragmento de las mismas.

26. Composición farmacéutica según la reivindicación 25 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.

27. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25 ó 26 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.

28. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27 donde la proteína es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

29. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, que además comprende al menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.

30. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 que comprende al menos otro principio activo.

31. 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 o un fragmento de la misma.

32. Kit según la reivindicación 31, 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.

33. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32, 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.

34. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33 donde la proteína es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

35. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, donde la molécula indicadora es, al menos, un anticuerpo específico de dicha proteína.

36. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35 para determinar el riesgo de desarrollar una α-sinucleinopatía o para determinar dicha enfermedad neurodegenerativa, en una muestra biológica aislada de un individuo.

37. Uso según la reivindicación 36 donde la muestra biológica es un tejido o un fluido biológico.

38. Uso según la reivindicación 37, donde el fluido biológico es líquido cefalorraquídeo o plasma.

39. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, donde la α-sinucleinopatía es Parkinson.

Fig. 1A

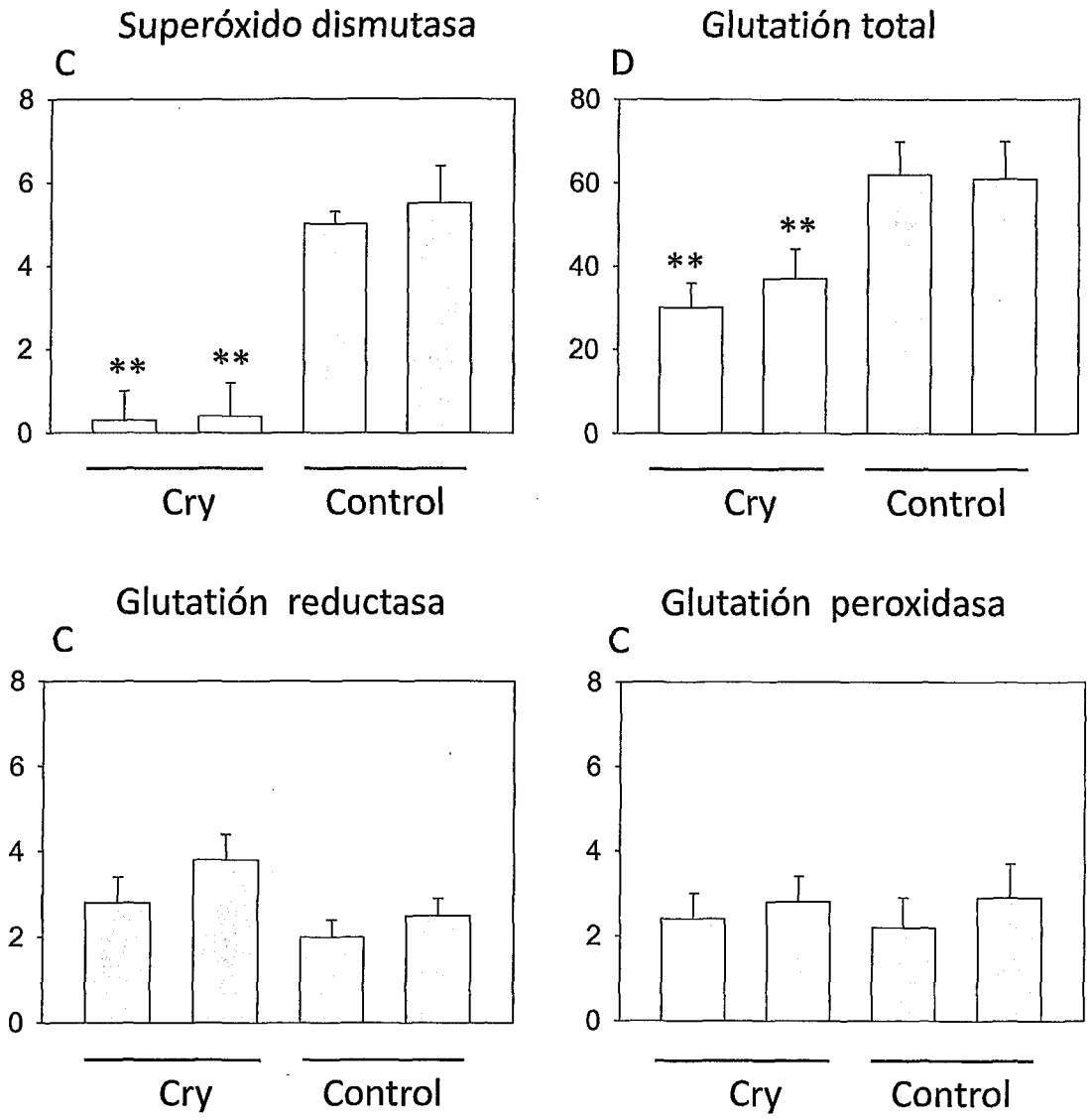

Superóxido dismutasa
C
8
6
4
2
0
**
**
Cry
Control
Glutatión total
D
80
60
40
20
0
**
**
Cry
Control
Glutatión reductasa
C
8
6
4
2
0
Cry
Control
Glutatión peroxidasa
C
8
6
4
2
0
Cry
Control

Fig. 1B

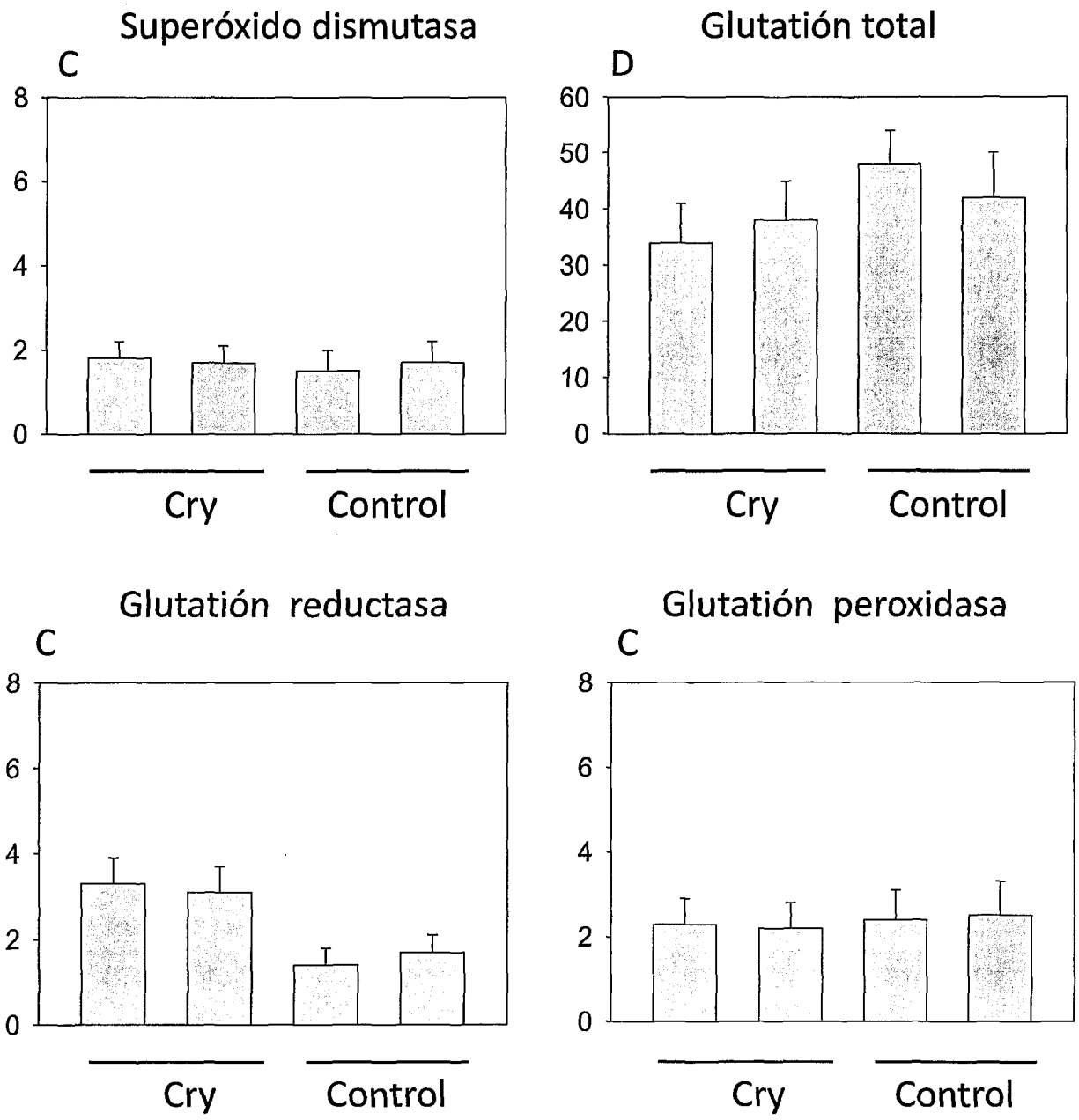

Superóxido dismutasa
C
8
6
4
2
0
Cry
Control
Glutatión total
D
60
50
40
30
20
10
0
Cry
Control
Glutatión reductasa
C
8
6
4
2
0
Cry
Control
Glutatión peroxidasa
C
8
6
4
2
0
Cry
Control

Fig. 2

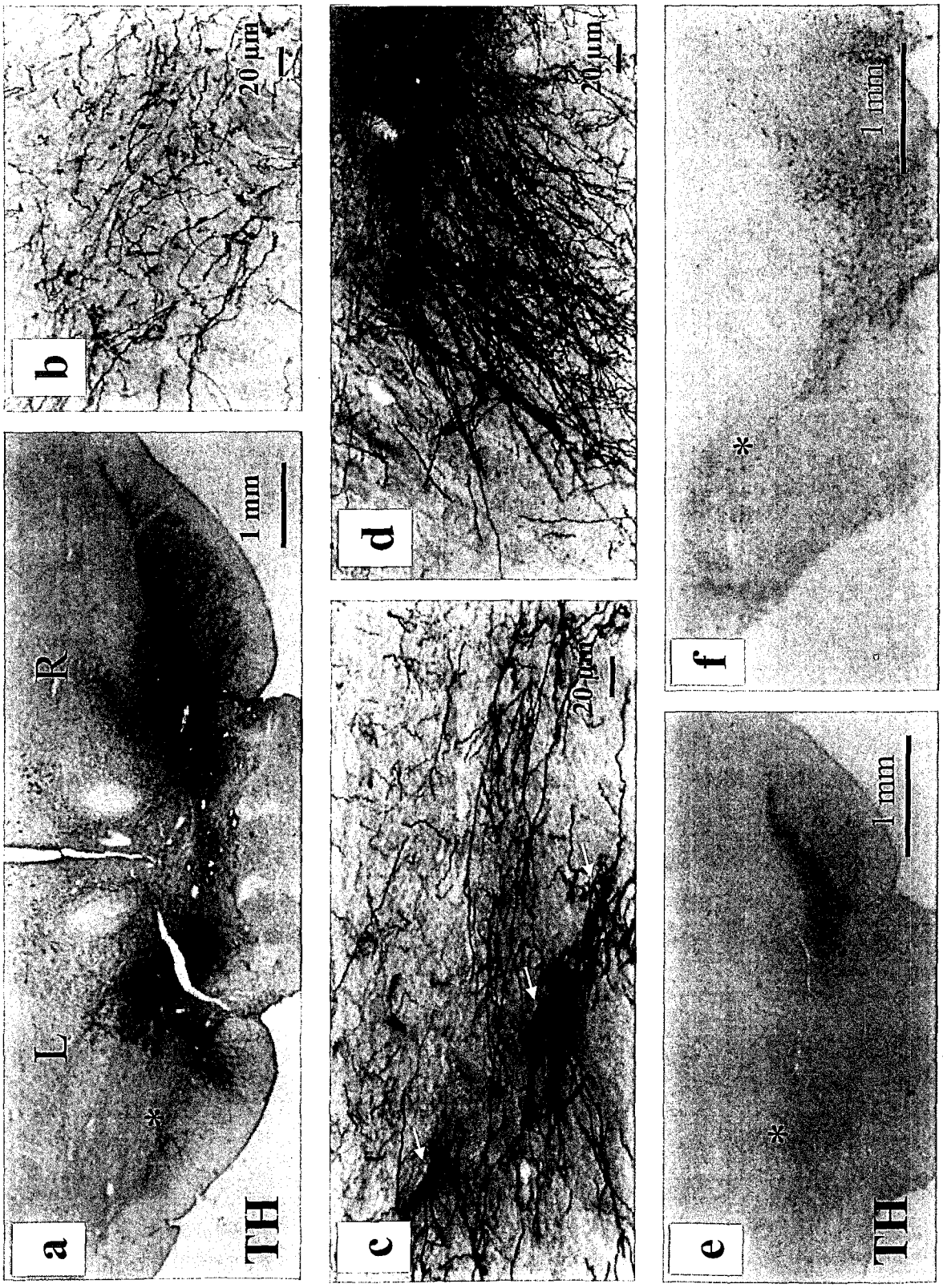


Fig. 3

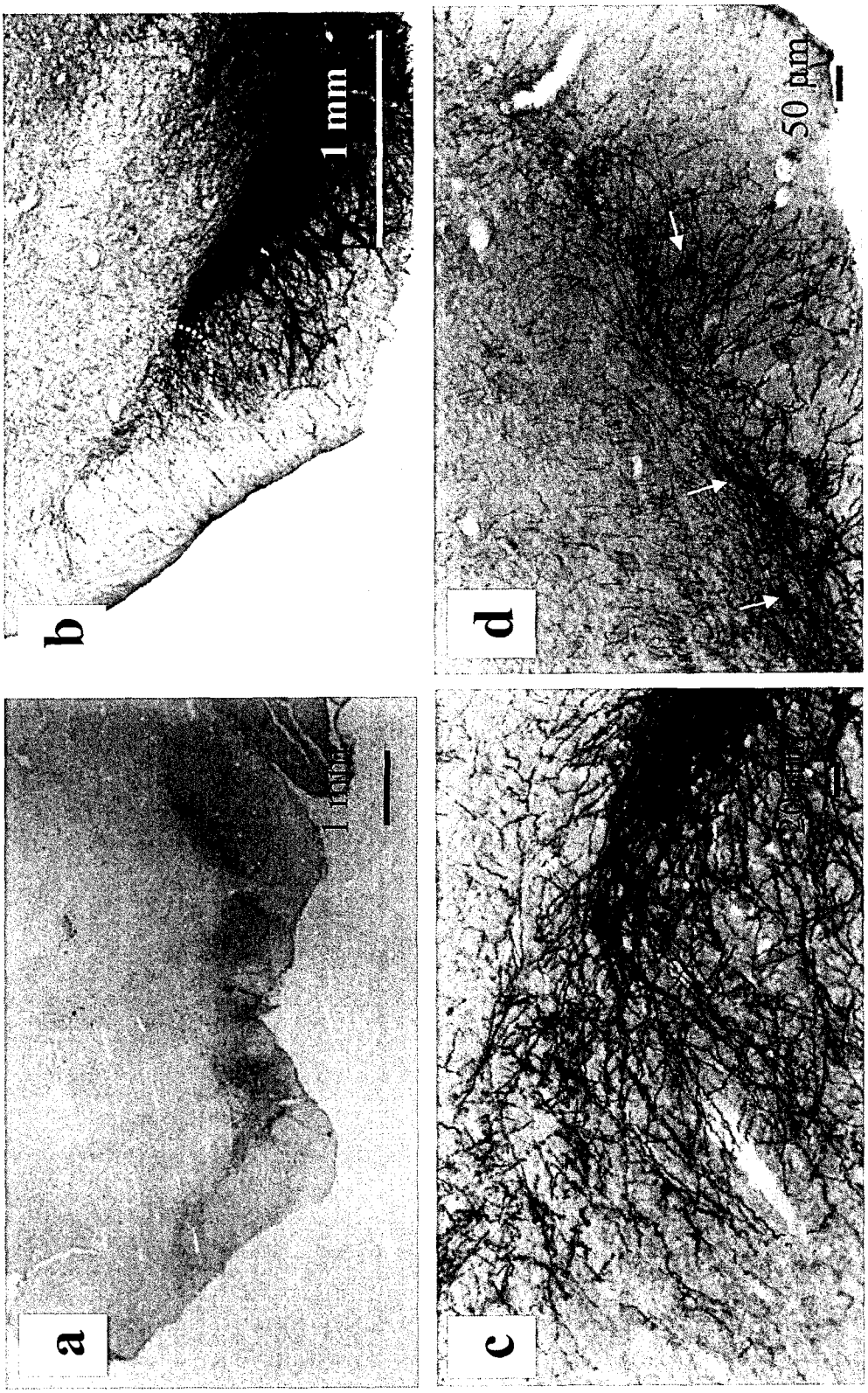


Fig. 4

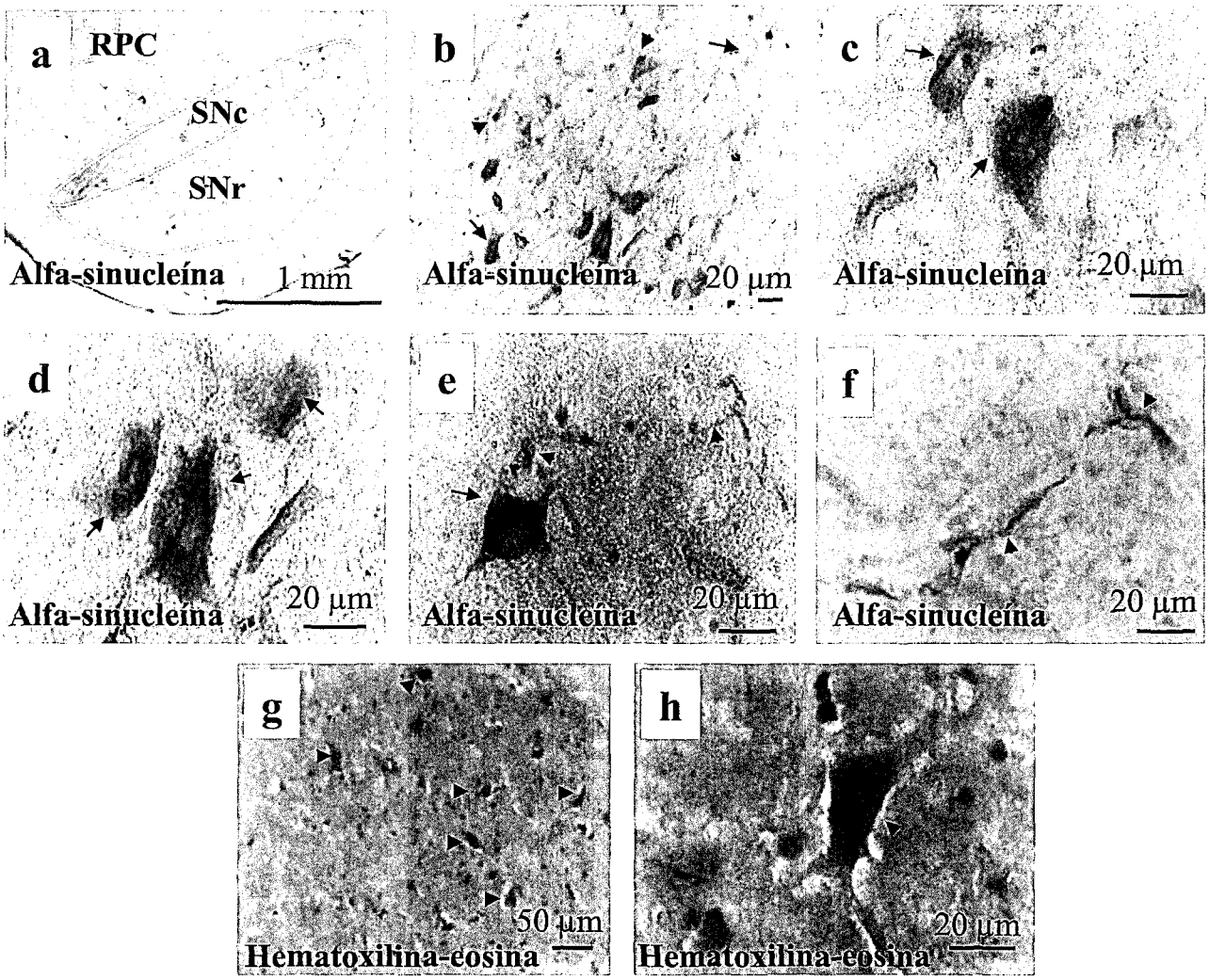

a
RPC
SNc
SNr
Alfa-sinucleína
1 mm
b
Alfa-sinucleína
20 µm
c
Alfa-sinucleína
20 µm
d
Alfa-sinucleína
20 µm
e
Alfa-sinucleína
20 µm
f
Alfa-sinucleína
20 µm
g
50 µm
Hematoxilina-eosina
h
20 µm
Hematoxilina-eosina

Fig. 5

