



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102016000050041
Data Deposito	16/05/2016
Data Pubblicazione	16/11/2017

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	33	68

Titolo

METODO PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE NEURODEGENERATIVE

10899M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

PB/mc **“METODO PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE NEURODEGENERATIVE”**

a nome : **UNIVERSITA' DI PISA**

con sede in: Pisa

* * *

La presente invenzione riguarda un metodo *in vitro* per la determinazione di malattie neurodegenerative, in particolare Parkinson e Alzheimer. Il metodo dell'invenzione è basato sulla misurazione, in un campione di sangue periferico, dei complessi eteromerici di α -sinucleina (di seguito abbreviato “ α -sin”) con β -amiloide 1-42 (di seguito “A β ”) e di α -sin con proteina Tau (di seguito “Tau”). Costituiscono ulteriori oggetti dell'invenzione un saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa di detti complessi eteromerici e un kit diagnostico per l'esecuzione del saggio.

INTRODUZIONE E STATO DELLA TECNICA

Le patologie neurodegenerative (ND), che risultano ad oggi in gran parte incurabili, interessano più di 7 milioni di persone in Europa. Attualmente, il costo per la cura è di circa 130.000.000.000 euro/anno, rappresentando una delle principali sfide mediche e sociali affrontate dalla società europea. Le ND sono difficili da diagnosticare, poiché molte di esse progrediscono per anni prima della comparsa dei sintomi. Per questo motivo, la disponibilità di un kit diagnostico sensibile risulta cruciale per una diagnosi precoce di patologia e una ottimizzazione della terapia, con conseguente riduzione sensibile dei costi di gestione del paziente.

Misfolding e aggregazione delle proteine svolgono un ruolo

fondamentale in molte malattie ND.

Diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato come le proteine β -amiloide, tau e α -sin favoriscano vicendevolmente il loro accumulo o aggregazione (*Science* 2003, 300:636-640; *Trends Neurosci* 2004, 27:129-134), e come queste interazioni proteina-proteina siano coinvolte nella fisiopatologia di patologie come Alzheimer (AD), malattia di Parkinson (PD), e la demenza con corpi di Lewy (*Alzheimer & Research & Therapy* 2012, 4:1).

Ad esempio, AD è associato alla presenza di placche di $A\beta$ e di neurofibrille composte da proteina Tau (*Acta Neuropathol.*2013;125: 699-709). PD è invece caratterizzato da inclusioni cellulari composte da α -sin e proteina Tau (*J Neuropathol Exp Neurol.* 1996;55(3):259-72).

I livelli di α -sin, $A\beta$ e tau (totali, oligomeriche o fosforilate) nel liquor cefalorachidiano vengono ad oggi utilizzati come marker diagnostici in AD (*Clin Chem Lab Med.*2006;44:1472-80; *Ann Neurol* 1995, 389:649-652; *Arch Neurol* 2001, 58:373-379), PD (*Front Aging Neurosci* 2014; 6:1-8) ed altre patologie ND.

L'uso del sangue come fonte di biomarker per patologie ND è a tutt'oggi oggetto di studio. Sebbene siano presenti dati controversi, la letteratura riporta una variazione nei livelli di Tau (soprattutto fosforilata) o $A\beta$ in varie frazioni di sangue in pazienti affetti da AD o PD (*Neurosci Lett.*2000;285(1):49-52; *Alzh Res and Ther* 2013; 5:8-10; *Int J Alz dis* 2012; 2012:1-9; *Jn of Alz Dis* 2011; 25:103-109; *Sci Rep* 2013; 3: 2540).

Le proteine α -sin, $A\beta$ e tau non esistono normalmente nello stesso compartimento subcellulare in cellule sane, limitando in tal modo il loro potenziale di interazione diretta (*Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:

12.245-12.250). In stati patologici, tuttavia, la localizzazione di queste proteine risulta modificato, permettendo il verificarsi di interazioni dirette all'interno delle cellule danneggiate o malate. Ad esempio, alcuni studi dimostrano che α -sin forma complessi eteromerici con A β in modelli transgenici di malattie ND e in cervelli di pazienti affetti da Alzheimer (*PLoS One* 2008, 3: e3135). Allo stesso modo, α -sin può interagire con tau, promuovendone la polimerizzazione e formando aggregati proteici eteromerici all'interno di cellule neuronali isolate da pazienti affetti da Alzheimer (*Science* 2003, 300:636-640; *Trends Neurosci* 2004, 27:129-134; *PLoS One* 2011, 6:e26609).

In commercio e in letteratura si ritrovano test ELISA per la determinazione quantitativa dei livelli totali, fosforilati o mono-oligomerici di α -sin, A β o proteina tau. Al contrario, non sono noti test immunoenzimatici per la quantificazione dei complessi eteromerici Tau- α -syn sin o A β - α -sin.

La presenza di tali complessi proteici è stata dimostrata in tessuti e fluidi biologici attraverso tecniche di co-immunoprecipitazione/western blotting o analisi NMR (*Neurochem Res* 2006, 31: 1153-1162; *Clin Chem Lab Med.*2006;44:1472-80; *Arch Neurol.* 1999;56:673-80; *Neurosci Lett.*2000;285(1):49-52). Si tratta di tecniche piuttosto laboriose, economicamente dispendiose, e che non generano risultati pienamente quantitativi. Tali tecniche non sarebbero dunque applicabili in kit diagnostici.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Si è ora sorprendentemente trovato che la malattia neurodegenerativa può essere determinata precocemente attraverso la quantificazione dei complessi eteromerici α -sin-A β e/o α -sin-Tau a partire da un campione di sangue. I dati ottenuti in pazienti affetti da malattie neurodegenerative, in

particolare Parkinson, dimostrano l'efficacia di tali complessi quali marcatori periferici di patologia. Inoltre, i risultati raccolti da un campione di soggetti sportivi - che, come noto, sono colpiti dalle malattie neurodegenerative in misura inferiore rispetto ai soggetti sedentari - indica che gli stessi complessi eteromerici costituiscono biomarcatori prognostici di patologie ND.

In particolare, analizzando campioni di sangue prelevati da pazienti affetti da malattie neurodegenerative si è osservato un significativo aumento, rispetto ai soggetti sani, dei livelli del complesso α -sin-Tau e una diminuzione del complesso α -sin-A β nei globuli rossi. Si è osservata inoltre una diminuzione del complesso α -sin-Tau nei globuli rossi e nelle piastrine di soggetti sportivi rispetto ai soggetti sedentari. Nell'insieme, questi dati confermano il valore diagnostico dei complessi α -sin-A β e α -sin-Tau e il valore prognostico del complesso α -sin-Tau.

Pertanto, in un primo aspetto, l'invenzione fornisce un metodo *in vitro* per la diagnosi o la prognosi di malattia neurodegenerativa in un individuo, in cui detto metodo comprende:

- (1) la determinazione della quantità del complesso α -sin-Tau in un campione di globuli rossi o di piastrine isolati dal soggetto in esame
- (2) il confronto tra detta quantità e un valore di riferimento corrispondente alla quantità dello stesso complesso presente nei globuli rossi o nelle piastrine di soggetti sani,

dove un aumento della quantità rilevata nei globuli rossi del soggetto in esame rispetto al valore di riferimento indica la presenza di malattia neurodegenerativa o un aumentato rischio di sviluppare la malattia neurodegenerativa, mentre un aumento della quantità rilevata nelle piastrine del

soggetto in esame indica un aumentato rischio di sviluppare la malattia neurodegenerativa

In un altro aspetto l'invenzione fornisce un metodo *in vitro* per la diagnosi di malattia neurodegenerativa in un individuo, che comprende:

- (1) la determinazione della quantità del complesso α -sin-A β in un campione di globuli rossi isolati dal soggetto in esame;
- (2) il confronto tra detta quantità e un valore di riferimento corrispondente alla quantità dello stesso complesso presente nei globuli rossi di soggetti sani;

dove una diminuzione della quantità rilevata nei globuli rossi del soggetto in esame rispetto al valore di riferimento indica la presenza di malattia neurodegenerativa.

Come qui usato, il termine “malattie neurodegenerative” include il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer, la demenza, in particolare la demenza frontotemporale, e il deficit cognitivo lieve.

Le quantità dei complessi α -sin-A β e α -sin-Tau nei campioni in esame possono essere determinate con metodiche note nell'arte. L'interazione tra α -sin e A β è stata dimostrata mediante spettroscopia NMR multidimensionale (*Neurochem Res* 2006; 31:1153–1162) e studi di dinamica molecolare (*Plos One* 2014; 9: e106883). Il legame diretto di α -sin a Tau è stato determinato con tecniche di cromatografia di affinità e saggi di binding (*J Biol Chem* 1999; 274,: 25481–25489). Inoltre, in tessuti e fluidi biologici la presenza di tali complessi eteromerici di α -sin è stata dimostrata attraverso tecniche di co-immunoprecipitazione/western blotting o di immunofluorescenza (*PLoS One* 2008, 3: e3135; *Science* 2003, 300:636-64).

In una realizzazione particolarmente preferita della presente invenzione, i complessi α -sin-A β e α -sin-Tau sono determinati mediante test immunoenzimatico in fase solida (ELISA) che comprende le seguenti fasi:

- (1) preparare un campione di fluido biologico;
- (2) mettere in contatto il campione con un anticorpo specifico per α -sin;
- (3) mettere in contatto il campione del passaggio (2) con un anticorpo specifico per Tau o per A β , dove detto anticorpo è legato a un enzima in grado di sviluppare una reazione colorimetrica quando esposto a un opportuno substrato;
- (4) mettere in contatto il campione del passaggio (3) con detto substrato dell'enzima e misurare la colorazione così prodotta.

Alternativamente, i passaggi (2) e (3) possono essere invertiti e in questo caso si utilizzeranno anticorpi specifici per Tau o per A β nel passaggio (2) e un anticorpo specifico per α -sin legato a un enzima in grado di sviluppare una reazione colorimetrica quando esposto a un opportuno substrato, nel passaggio (3).

Il campione di fluido biologico può essere un campione di sangue o frazioni di sangue separate, quali globuli rossi o piastrine, opportunamente trattati, per esempio sospesi in tampone fosfato contenente sodiododecilsolfato, SDS.

Gli anticorpi contro α -sin, A β e Tau utilizzabili nel saggio immunoenzimatico dell'invenzione sono commercialmente disponibili (fornitori: Sigma Aldrich, DBA Italia) e sono descritti in letteratura in protocolli per l'identificazione delle singole proteine o dei loro complessi

(*Neurobiol of dis*, 2015;79: 81-99; *BBA* 2013 1832: 1249-59; *Biophys J.* 2009; 96: 4200-4211).

Quali marcatori enzimatici legati all'anticorpo secondario possono essere usati perossidasi o alcalino-fosfatasi, preferibilmente perossidasi (Horse Radish Peroxidase, *HRP*), che catalizzando l'ossidazione di un substrato ad opera del perossido di idrogeno, genera un prodotto colorato, misurabile spettrofotometricamente.

In una modalità di realizzazione del test immunoenzimatico, i campioni di sangue (globuli rossi e piastrine), dopo essere stati opportunamente preparati, potranno essere aggiunti ai pozzetti di piastrine in plastica rivestiti con l'anticorpo contro α -sin. I campioni verranno poi incubati con un anticorpo specifico per la proteina Tau (per la rilevazione dei complessi Tau- α -sin) o per $A\beta$ (per la rilevazione dei complessi $A\beta$ - α -sin). Dopo opportuni lavaggi, il complesso antigene-anticorpo verrà rilevato da un anticorpo secondario marcato con perossidasi. Dopo aggiunta di un opportuno substrato, i campioni svilupperanno una colorazione che verrà quantificata spettrofotometricamente fornendo una misura della quantità dei complessi proteici presenti nel campione.

Una strategia alternativa prevede il "coating" dei pozzetti con un anticorpo specifico per Tau (per la rilevazione dei complessi Tau- α -sin) o per $A\beta$ (per la rilevazione dei complessi $A\beta$ - α -sin). In questo caso, dopo l'incubazione con i campioni da saggiare, verrà utilizzato un anticorpo primario specifico per α -sin. Il complesso antigene anticorpo verrà poi rilevato come sopra descritto.

Per la determinazione dei valori di riferimento da utilizzare nel metodo

diagnostico/prognostico secondo la presente invenzione, le quantità dei complessi α -sin-A β e α -sin-Tau verranno misurate come descritto, a partire da un pool statisticamente significativo di campioni biologici ottenuti da soggetti sani (non affetti da malattie neurodegenerative). Operando in questo modo si è potuto stabilire il valore di riferimento per il complesso α -sin-Tau nei globuli rossi e nelle piastrine, rispettivamente pari a $2,35 \pm 0,17/\text{mg}$ proteine e $0,170 \pm 0,030/\mu\text{g}$ proteine. Allo stesso modo, si è determinato il valore di riferimento per il complesso α -sin-A β , pari a $4,54 \pm 0,20/\text{mg}$ proteine e $0,336 \pm 0,048/\mu\text{g}$ proteine in globuli rossi e piastrine, rispettivamente.

Un ulteriore aspetto dell'invenzione riguarda un kit diagnostico contenente i reagenti e le istruzioni per effettuare il test immunoenzimatico qui descritto. In particolare il kit può contenere, in contenitori separati, anticorpi contro α -sin e contro A β o Tau, eventualmente marcati con un enzima in grado di produrre una reazione colorimetrica, il substrato enzimatico e soluzioni tampone. Inoltre il kit può contenere campioni a concentrazione nota (standard) di Tau- α -sin o di A β - α -sin, in modo che possa essere eseguita, parallelamente alle analisi dei campioni di sangue, anche una retta di calibrazione (o taratura).

Rispetto ad altre tecniche note, il dosaggio ELISA a sandwich oggetto dell'invenzione permette di determinare i livelli di α -sin-Tau e α -sin-A β in modo quantitativo, economico e veloce.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Complessi eteromerici Tau- α -syn. Il complesso Tau- α -sin è stato preparato incubando 0.5 μg di ciascuna proteina. α -sin è stata in seguito immunoprecipitata utilizzando un anticorpo monoclonale specifico; il campione ottenuto è stato sospeso in tampone di corsa, ed il complesso

Tau- α -sin è stato rilevato mediante immunoblot utilizzando un anticorpo specifico anti-Tau. La proteina Tau da sola è stata utilizzata come controllo positivo dell'esperimento. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

Figura 2. Correlazione diretta tra assorbanza e concentrazione del complesso α -sin-Tau. Diverse quantità di complesso α -synsin-Tau ricombinante (incubazione a 37°C per 60 minuti, in SDS 2 mM) sono state incubate nei pozzetti pre-assorbiti con l'anticorpo anti- α -synsin. I dati sono espressi come assorbanza specifica, e rappresentano la media $\pm$ SD di 5 diversi esperimenti.

Figura 3. Retta di taratura "teorica" e "reale" del complesso α -sin-Tau. Diverse quantità di complesso α -sin-Tau (incubazione a 37°C per 60 minuti in SDS 2 mM) ricombinante sono state incubate nei pozzetti pre-assorbiti con l'anticorpo anti- α -sin. Al termine dell'incubazione con i campioni, i sovranatanti sono stati raccolti, e su di essi è stata dosata la quantità di Tau rimasta utilizzando un dosaggio ELISA commerciale. In questo modo è stata determinata la correlazione tra la quantità reale di complesso α -sin-Tau e l'assorbanza. I dati sono espressi come assorbanza specifica, e rappresentano la media $\pm$ SD di 5 diversi esperimenti.

Figura 4. Complessi eteromerici $A\beta$ - α -sin. Il complesso $A\beta$ - α -sin è stato preparato incubando 0,5 μ g di ciascuna proteina. α -sin è stata in seguito immunoprecipitata utilizzando un anticorpo monoclonale specifico; il campione ottenuto è stato sospeso in tampone di corsa, ed il complesso $A\beta$ - α -sin è stato rilevato mediante immunoblot utilizzando un anticorpo specifico anti- $A\beta$. La proteina $A\beta$ da sola è stata utilizzata come controllo

positivo dell'esperimento.

Figura 5. Correlazione diretta tra assorbanza a 450 nm e concentrazione del complesso α -sin-A β . Diverse quantità di complesso α -sin-A β (incubazione a 37°C per 20 ore in SDS 2 mM) sono state incubate nei pozzetti pre-absorbiti con l'anticorpo anti-A β . I dati sono espressi come assorbanza specifica, e rappresentano la media $\pm$ SD di 5 diversi esperimenti.

Figura 6. Retta di taratura "teorica" e "reale" del complesso α -sin-A β . Diverse quantità di complesso α -sin-A β (incubazione a 37°C per 20 ore in SDS 2 mM) sono state incubate nei pozzetti pre-absorbiti con l'anticorpo anti-A β . Al termine dell'incubazione con i campioni, i sovrantanti sono stati raccolti, e su di essi è stata dosata la quantità di α -syn rimasta utilizzando un dosaggio ELISA commerciale. In questo modo è stata determinata la correlazione tra la quantità reale di complesso α -sin-A β e l'assorbanza. I dati sono espressi come assorbanza specifica, e rappresentano la media $\pm$ SD di 5 diversi esperimenti.

Figura 7. Range fisiologico del complesso α -sin-Tau. Le frazioni di globuli rossi (pannello A) o piastrine (pannello B) di soggetti sani, dopo essere state opportunamente solubilizzate, sono state incubate nei pozzetti pre-absorbiti con l'anticorpo anti- α -sin. La quantità di complesso α -sin-Tau è stata determinata come descritto in precedenza. I dati sono espressi come ng di complesso eteromero/mg proteine totali per i globuli rossi oppure come ng di complesso eteromero/ μ g proteine totali per le piastrine.

Figura 8. Range fisiologico del complesso α -sin-A β . Le frazioni di globuli rossi o piastrine di soggetti sani, dopo essere state opportunamente solubilizzate, sono state incubate nei pozzetti pre-absorbiti con l'anticorpo

anti-A β . La quantità di complesso α -sin-A β è stata determinata come descritto in precedenza. I dati sono espressi come ng di complesso eteromerico/mg proteine totali per i globuli rossi oppure come ng di complesso eteromerico/ μ g proteine totali per le piastrine.

Figura 9. Livelli di complessi eteromerici di syn in soggetti affetti da PD. Le frazioni di globuli rossi di soggetti sani o affetti da morbo di PD, dopo essere state opportunamente solubilizzate, sono state incubate nei pozzetti pre-assorbiti con l'opportuno anticorpo. Le quantità di complesso α -sin-A β o α -sin-Tau sono state determinate come descritto in precedenza. I dati sono espressi come ng di complesso eteromerico/mg proteine totali.

Figura 10. Livelli del complesso α -syn-Tau in soggetti sedentari e sportivi. Le frazioni di globuli rossi di soggetti sani (sportivi o sedentari), dopo essere state opportunamente solubilizzate, sono state incubate nei pozzetti pre-assorbiti con l'anticorpo anti- α -sin. La quantità di complesso α -sin-Tau è stata determinata come descritto in precedenza. I dati sono espressi ng di complesso eteromerico/mg proteine totali.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Determinazione dei complessi Tau- α -sin

La determinazione dei complessi Tau- α -sin è stata condotta tramite incubazione di concentrazioni note e crescenti di proteine ricombinanti umane, Tau e α -sin.

La formazione degli eteromeri è stata confermata mediante saggi di co-immunoprecipitazione-western blot. In Figura 1 è mostrato un esempio rappresentativo dei risultati ottenuti.

I campioni ottenuti utilizzando concentrazioni note e crescenti dei due

monomeri sono stati dosati utilizzando il procedimento ELISA “a sandwich”. Da tali esperimenti si è ottenuta una correlazione diretta tra l’assorbanza e la concentrazione di eteromeri α -sin-Tau, in un range di uguali concentrazioni tra 10 ng/100 μ l e 1000 ng/100 μ l di ciascuna proteina (Figura 2). L’assorbanza dei bianchi, ottenuti in assenza di anticorpo anti-Tau, risulta sotto il 20% del valore totale.

Concentrazioni diverse di una proteina rispetto all’altra hanno determinato risultati sovrapponibili a quelli ottenuti con quantità equivalenti (1:1) di ciascuna proteina, suggerendo che l’eteromero contenga quantità stechiometriche di α -sin e Tau.

Al fine di determinare la eventuale quota libera (“non legata”) di tau dopo la formazione del complesso con α -sin è stato utilizzato un dosaggio standardizzato ELISA commerciale. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la percentuale di Tau non legata a α -sin risulta in un *range* compreso 16 e 29%.

Questi dati hanno permesso la correzione della retta di correlazione fra assorbanza e concentrazione di eteromeri, chiamata “retta di taratura α -sin-Tau”, corretta per la quota libera di tau (Figura 3).

Determinazione dei complessi β -amiloide- α -sin

Il complesso $A\beta$ - α -sin è stato preparato incubando per diversi tempi concentrazioni note e crescenti di proteine ricombinanti umane, $A\beta$ e α -sin.

La formazione degli eteromeri è stata confermata mediante saggi di co-immunoprecipitazione-western blot (Figura 4).

Individuato il tempo di incubazione ottimale, si è proceduto inversamente rispetto a quanto effettuato per Tau- α -sin, cioè ponendo il campione in pozzetti rivestiti con l’anticorpo contro $A\beta$ e successivamente

aggiungendo l'anticorpo α -sin marcato con perossidasi. Tale approccio ha permesso di superare il problema del legame aspecifico della $A\beta$, sfruttando la lipofilità della proteina per un ancoraggio ottimale alla piastra.

L'assorbanza nelle condizioni sperimentali utilizzate risulta aumentare linearmente con la concentrazione di complesso $A\beta$ - α -sin (Figura 5).

Al fine di determinare la eventuale quota libera ("non legata") di α -sin dopo la formazione del complesso con la beta è stato utilizzato un dosaggio standardizzato ELISA commerciale.

La sperimentazione effettuata utilizzando un ELISA commerciale e standardizzato, ha permesso di evidenziare che la percentuale di $A\beta$ non legata a α -sin risultava in un *range* compreso tra il 5 e 20%.

Questi dati hanno consentito di correlare l'assorbanza ottenuta alle reali concentrazioni dei complessi eteromerici (Figura 6).

Dosaggio dei complessi α -sin- $A\beta$ e α -sin-Tau in campioni di sangue ottenuti da soggetti sani

I complessi eteromerici di α -sin con Tau e $A\beta$ sono stati dosati in ottanta campioni di sangue, provenienti da soggetti sani volontari, e raccolti seguendo le normative vigenti. Le piastrine e i globuli rossi sono stati separati mediante centrifugazione, seguendo i protocolli riportati in letteratura.

Sono stati eseguiti esperimenti per la quantificazione delle proteine totali sulle due diverse frazioni di sangue e dei complessi eteromerici di α -sin mediante i dosaggi ELISA sopra descritti, utilizzando in parallelo quantità crescenti e note di $A\beta$ - α -sin o Tau- α -sin.

I complessi $A\beta$ - α -sin e Tau- α -sin sono risultati rilevabili in entrambe le frazioni di sangue, confermando la validità del nostro approccio. Come

mostrato in Figura 7A e B, i valori (espressi come valore medio $\pm$ *errore standard dalla media*) di Tau- α -sin nei soggetti sani sono risultati pari a $2,35 \pm 0,17/\text{mg}$ proteine e $0,170 \pm 0,030/\mu\text{g}$ proteine in globuli rossi e piastrine, rispettivamente.

I livelli di complessi A β - α -sin in volontari sani sono invece pari a $4,54 \pm 0,20/\text{mg}$ proteine e $0,336 \pm 0,048/\mu\text{g}$ proteine in globuli rossi e piastrine, rispettivamente (Figura 8A e B).

Tali esperimenti hanno permesso di determinare il range fisiologico dei complessi eteromerici studiati (si veda Tabella).

Dosaggio dei complessi α -sin-A β e α -sin-Tau in campioni di sangue ottenuti da soggetti affetti da patologie neurodegenerative

Analogamente a quanto riportato per soggetti sani, la frazione di globuli rossi è stata isolata da 15 soggetti affetti da morbo di Parkinson (PD).

I risultati ottenuti (Figura 9 e Tabella) hanno dimostrato un significativo aumento dei livelli di complessi Tau- α -sin nei soggetti PD rispetto ai controlli. Al contrario, i livelli di α -sin-A β mostrano un trend di diminuzione nei pazienti PD rispetto ai soggetti sani (Figura 9 e Tabella).

La variazione dei livelli dei complessi eteromerici nei soggetti PD rispetto ai controlli ci permette di identificare tali complessi come nuovi biomarker periferici di patologia.

Influenza dell'attività sportiva sui livelli dei complessi α -sin-A β e α -sin-Tau

Dati di letteratura suggeriscono che negli animali l'esercizio fisico costante previene e rallenta il tasso di neurodegenerazione, probabilmente promuovendo la neurogenesi o attivando vie di segnale anti-ossidative

(*Frontiers in aging Neuroscience*, 2010; 25:1-8).

I nostri dati raccolti sulla popolazione di soggetti sani hanno evidenziato una significativa diminuzione dei livelli dei complessi Tau- α -syn nei soggetti sportivi rispetto a quelli sedentari (Figura 10 e Tabella). Tali dati confermano che i livelli di complessi eteromerici di syn rappresentano dei validi biomarker predittivi per patologie ND.

TIPO DI CAMPIONE	Globuli Rossi		Piastrine	
	α -sin- A β (ng/mg proteine)	α -sin-Tau (ng/mg proteine)	α -sin-A β (ng/ μ g proteine)	α -sin-Tau (ng/ μ g proteine)
Controlli Sani	4,54 $\pm$ 0,20	2,35 $\pm$ 0,17	0,336 $\pm$ 0,048	0,170 $\pm$ 0,030
Sedentari		2,87 $\pm$ 0,13	-	0,181 $\pm$ 0,030
Sportivi		2,06 $\pm$ 0,12	-	0,133 $\pm$ 0,040
PD	3,70 $\pm$ 0,36	4,09 $\pm$ 0,36	-	-

Tabella. Intervalli fisiologici e patologici dei livelli di α -sin-Tau e α -sin-A β . I livelli sono stati determinati in piastrine o globuli rossi, come indicato. I dati rappresentano la media $\pm$ errore standard dalla media; i valori sono espressi come ng di complesso eteromerico/mg proteine totali per i globuli rossi oppure come ng di complesso eteromerico/ μ g proteine totali per le piastrine).

RIVENDICAZIONI

1. Metodo *in vitro* per la diagnosi o la prognosi di malattia neurodegenerativa in un individuo, che comprende:

- (1) la determinazione della quantità del complesso α -sin-Tau in un campione di globuli rossi o di piastrine isolati dal soggetto in esame
- (2) il confronto tra detta quantità e un valore di riferimento corrispondente alla quantità dello stesso complesso presente nei globuli rossi o nelle piastrine di soggetti sani,

dove un aumento della quantità rilevata nei globuli rossi del soggetto in esame rispetto al valore di riferimento indica la presenza di malattia neurodegenerativa o un aumentato rischio di sviluppare la malattia neurodegenerativa in detto soggetto, mentre un aumento della quantità rilevata nelle piastrine del soggetto in esame indica un aumentato rischio di sviluppare la malattia neurodegenerativa in detto soggetto.

2. Metodo *in vitro* per la diagnosi di malattia neurodegenerativa in un individuo, che comprende:

- (1) la determinazione della quantità del complesso α -sin-A β in un campione di globuli rossi isolati dal soggetto in esame
- (2) il confronto tra detta quantità e un valore di riferimento corrispondente alla quantità dello stesso complesso presente nei globuli rossi di soggetti sani,

dove una diminuzione della quantità rilevata nei globuli rossi del soggetto in esame rispetto al valore di riferimento indica la presenza di malattia neurodegenerativa in detto soggetto.

3. Metodo secondo le rivendicazioni 1 o 2, in cui la malattia neurodegenerativa include il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer, la demenza, in particolare la demenza frontotemporale, e il deficit cognitivo lieve.

4. Metodo secondo le rivendicazioni 1-3, in cui la quantità dei complessi α -sin-A β e α -sin-Tau viene determinata attraverso le seguenti fasi:

- (1) preparare un campione di fluido biologico
- (2) mettere in contatto il campione con un anticorpo specifico per α -sin;
- (3) mettere in contatto il campione proveniente dal passaggio (2) con un anticorpo specifico per Tau o per A β , dove detto anticorpo è legato a un enzima in grado di sviluppare una reazione colorimetrica quando esposto a un opportuno substrato;
- (4) mettere in contatto il campione proveniente dal passaggio (3) con detto substrato dell'enzima e misurare la colorazione prodotta dalla reazione enzima-substrato.

5. Metodo secondo le rivendicazioni 1-3, in cui la quantità dei complessi α -sin-A β e α -sin-Tau viene determinata attraverso le seguenti fasi:

- (1) preparare un campione di fluido biologico
- (2) mettere in contatto il campione con un anticorpo specifico per A β o per Tau;
- (3) mettere in contatto il campione proveniente dal passaggio (2) con un anticorpo specifico per α -sin, dove detto anticorpo è legato a un enzima in grado di sviluppare una reazione colorimetrica quando esposto a un opportuno substrato;
- (4) mettere in contatto il campione proveniente dal passaggio (3) con

detto substrato dell'enzima e misurare la colorazione prodotta dalla reazione enzima-substrato.

6. Metodo secondo le rivendicazioni 4 e 5, che comprende inoltre l'interpolazione della quantità di complesso presente nel campione su una retta di taratura ottenuta con quantità note dello stesso complesso.
7. Metodo secondo le rivendicazioni 4 e 5, in cui detto campione di fluido biologico è costituito da una preparazione di globuli rossi o piastrine.
8. Metodo secondo le rivendicazioni 4 e 5, in cui l'enzima in grado di sviluppare una reazione colorimetrica è la perossidasi.
9. Metodo secondo le rivendicazioni 1-8, in cui il valore di riferimento corrispondente alla quantità del complesso presente nei globuli rossi o nelle piastrine dei soggetti sani è uno dei seguenti:
 - (a) α -sin-Tau nei globuli rossi: $2,35 \pm 0,17/\text{mg}$ proteine
 - (b) α -sin-Tau nelle piastrine: $0,170 \pm 0,030/\mu\text{g}$ proteine
 - (c) α -sin- $A\beta$ nei globuli rossi: $4,54 \pm 0,20/\text{mg}$ proteine
 - (d) α -sin- $A\beta$ nelle piastrine: $0,336 \pm 0,048/\mu\text{g}$ proteine
10. Kit contenente i reagenti e le istruzioni per realizzare il metodo secondo le rivendicazioni 1-9.
11. Kit secondo la rivendicazione 10 contenente, in contenitori separati, anticorpi contro α -sin e contro $A\beta$ o Tau, eventualmente marcati con un enzima in grado di produrre una reazione colorimetrica quando esposto al suo substrato; il substrato enzimatico; opzionalmente soluzioni tampone e campioni a concentrazione nota di Tau- α -sin o di $A\beta$ - α -sin per preparare una retta di taratura.

Milano, 16 maggio 2016

FIGURA 1

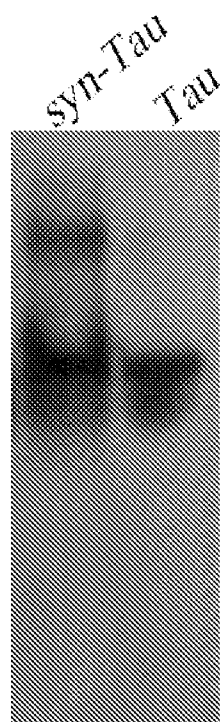


FIGURA 2

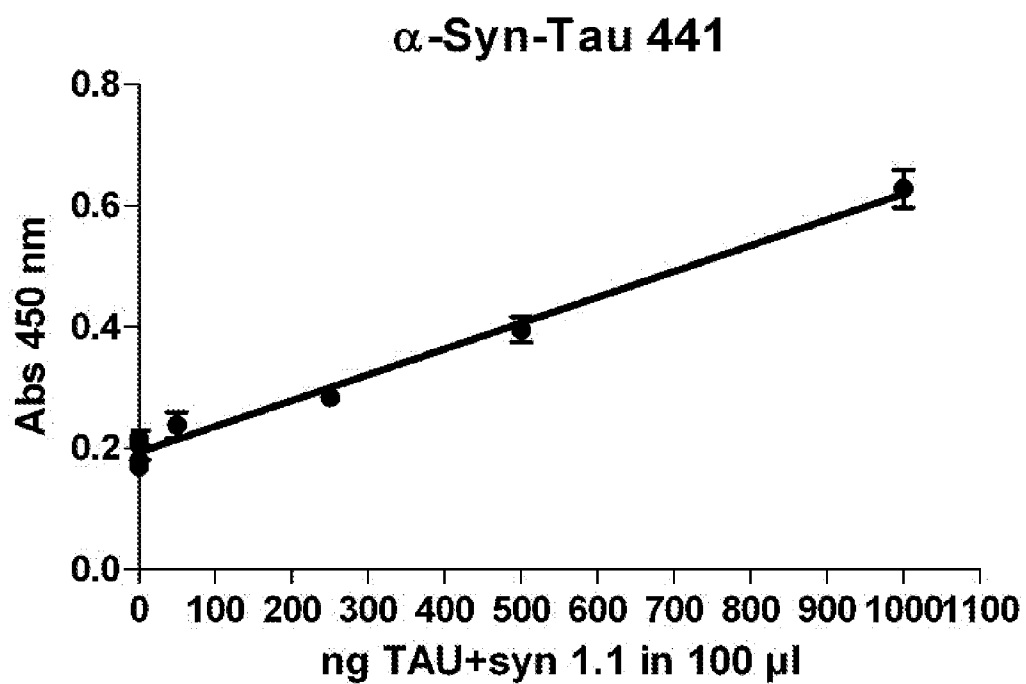


FIGURA 3

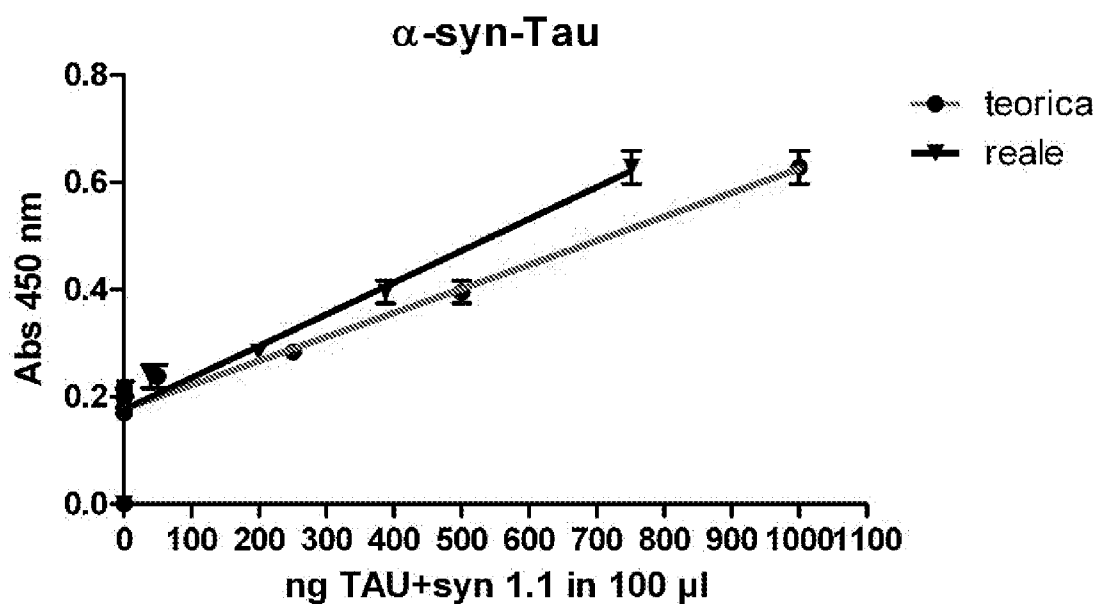


FIGURA 4

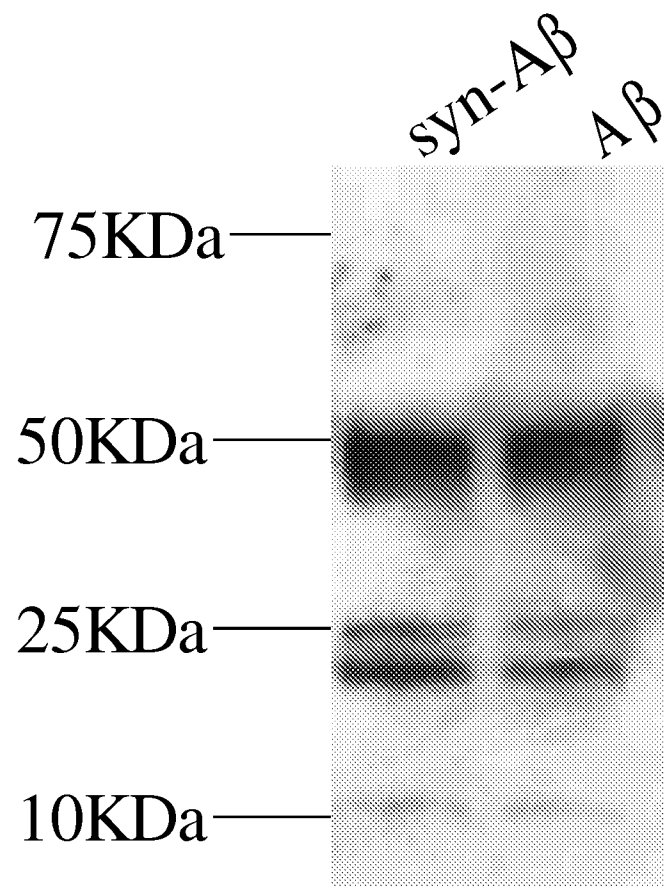


FIGURA 5

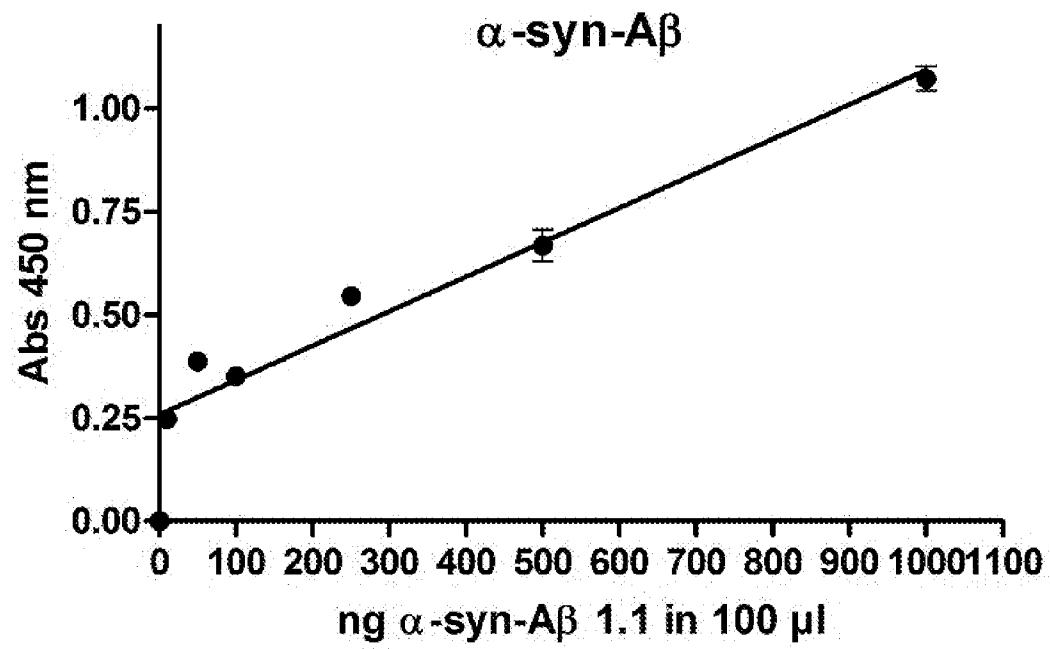


FIGURA 6

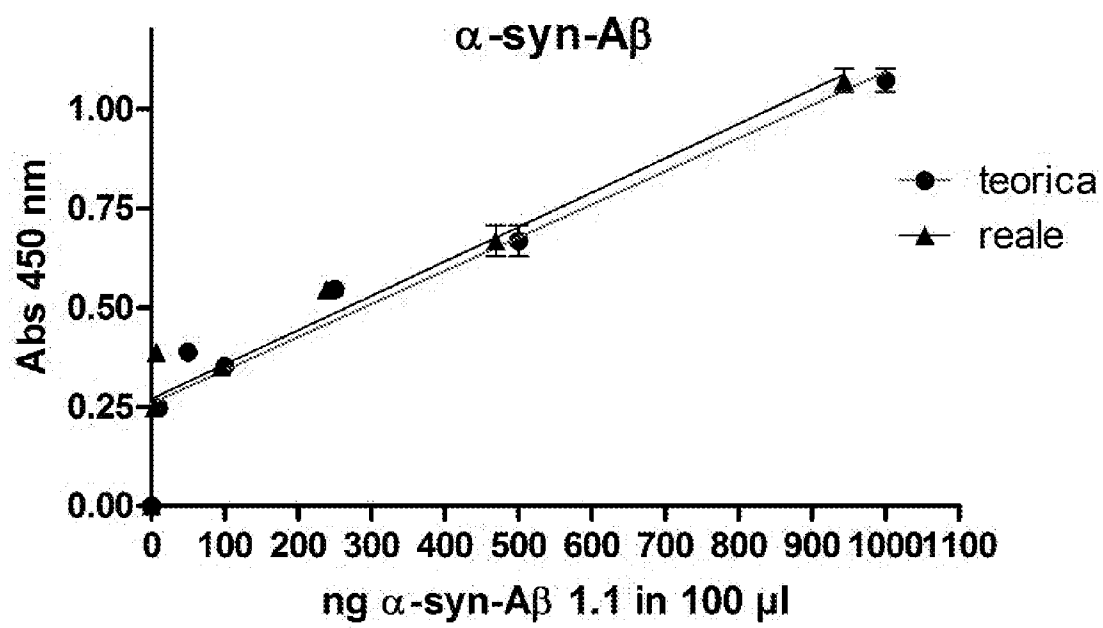


FIGURA 7

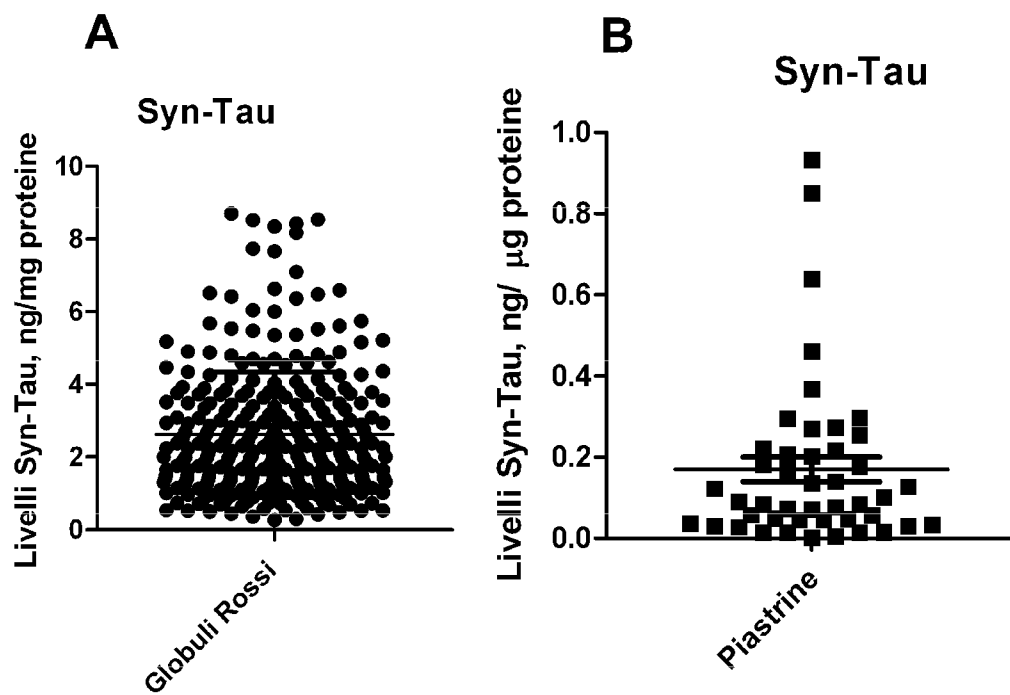


FIGURA 8

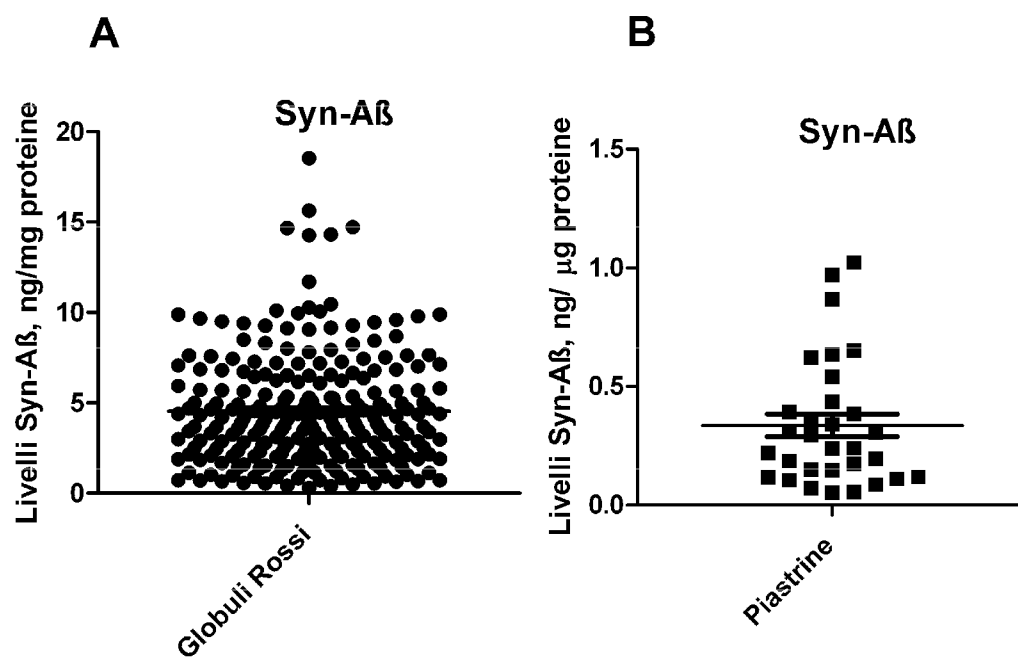


FIGURA 9

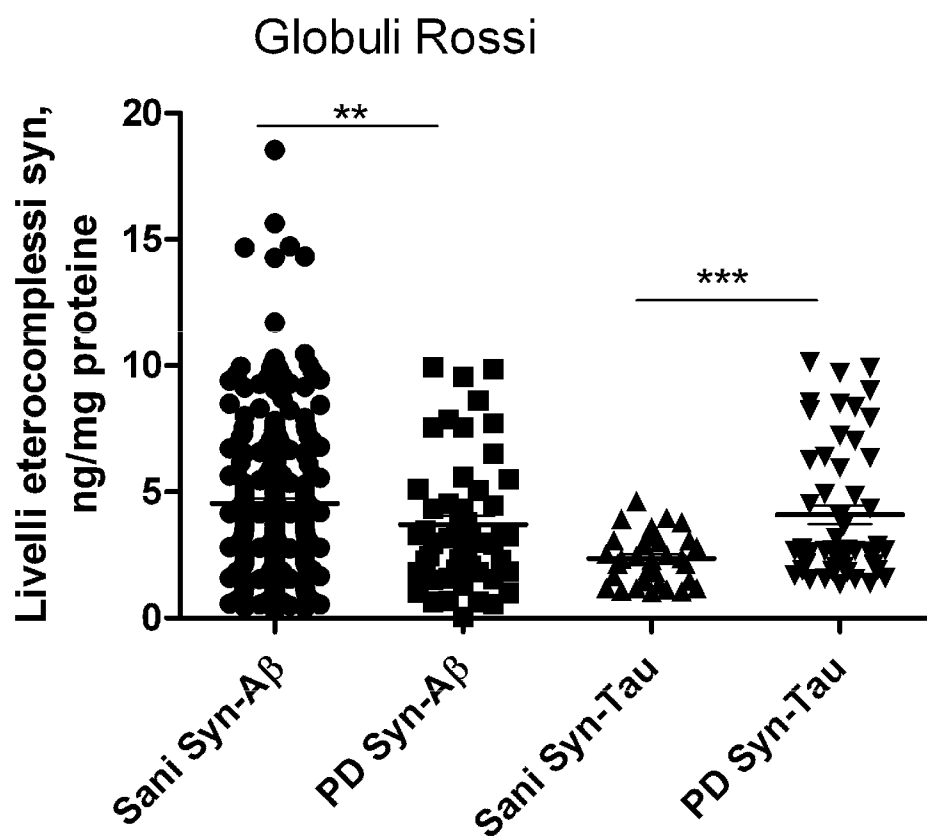


FIGURA 10

