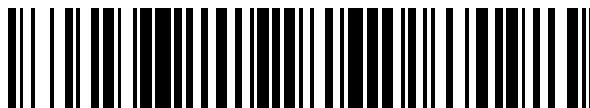


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 923 049**

21 Número de solicitud: 202130213

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6876 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.03.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.09.2022

71 Solicitantes:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES y
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ ESPEJO, Emilio;
RODRÍGUEZ DE FONSECA, Fernando;
SUÁREZ PÉREZ, Juan y
MARTÍN DE PABLOS, Angel Ignacio**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **LACTOPEROXIDASA COMO BIOMARCADOR DE LA ENFERMEDAD DE PÁRKINSON
IDIOPÁTICA**

57 Resumen:

Lactoperoxidasa como biomarcador de la enfermedad de Pákinson idiopática.

Uso de la lactoperoxidasa como biomarcador, método, kit, dispositivo de diagnóstico y usos para el diagnóstico del parkinsonismo, y preferiblemente de la enfermedad de Parkinson idiopática.

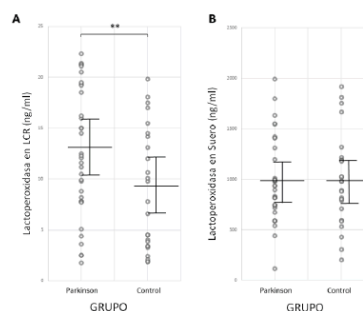


FIG. 1

DESCRIPCIÓN

LACTOPEROXIDASA COMO BIOMARCADOR DE LA ENFERMEDAD DE PÁRKINSON IDIOPÁTICA

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y se refiere a un nuevo biomarcador y a un método de diagnóstico del parkinsonismo, y en concreto de la enfermedad de Parkinson idiopática.

10

ESTADO DEL ARTE

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que afecta a más del 1% de las personas mayores de 65 años. Se caracteriza por la degeneración selectiva de neuronas pigmentadas de la sustancia negra que producen el neurotransmisor dopamina. La EP es un trastorno multifactorial, y muchos factores como los genes, la presencia de neuroinflamación, la desregulación de los procesos de oxidación, las infecciones y otros están involucrados en la patogénesis de la EP.

El estrés oxidativo y las infecciones microbianas se reconocen como factores patógenos de creciente importancia en la EP. En cuanto al estrés oxidativo, se ha detectado un exceso de especies oxidantes reactivas como el superóxido y el peróxido de hidrógeno en la sustancia negra en pacientes con EP. Por otro lado, en lo que respecta a las infecciones cerebrales, aún no se ha demostrado la evidencia de la presencia de microorganismos dentro de la sustancia negra en pacientes con EP.

25

Es de destacar que algunas enzimas relacionadas con procesos neurodegenerativos poseen propiedades oxidativas y antimicrobianas. Por ejemplo, las hemoperoxidasas como la lactoperoxidasa (LPO) y mieloperoxidasa (MPO) producen poderosas moléculas oxidantes para protegerse contra patógenos. Estas hemoperoxidasas se encuentran en la sustancia negra humana, son inhibidas por la dopamina (DA) y se ha propuesto que desempeñan un papel en la enfermedad de Parkinson (Fernández-Espejo, 2019).

Hasta la fecha, ningún estudio ha examinado cómo el nivel de LPO en el LCR se relaciona con las características clínicas de la EP idiopática.

35

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Concentraciones individuales de lactoperoxidasa (LPO) en **(A)** el líquido cefalorraquídeo y **(B)** suero en pacientes con Enfermedad de Parkinson idiopática y sujetos controles. Las concentraciones medias de LPO (ng/ml) se encuentran elevadas significativamente en el LCR de los pacientes de enfermedad de Parkinson. Los datos se presentan como valores individuales (puntos) y media y desviación estándar (líneas sólidas). ** $p=0.0202$ (test de Student). Abbrev.: LCR, Líquido cefalorraquídeo; LPO, lactoperoxidasa.

Figura 2. Correlaciones entre la concentración de LPO en el LCR, los valores de la escala MDS-UPDRS parte-IV y la dosis diaria equivalente de L-DOPA en pacientes con Enfermedad de Parkinson idiopática **(A)** Existe una correlación inversa significativa entre la concentración de LPO en el LCR y los valores de la escala MDS-UPDRS parte IV, que sirve para evaluar las complicaciones motoras de la terapia con L-DOPA (Discinesias y fluctuaciones motoras). ($r=-0.521$, $p<0.0001$), **(B)** Existe también una correlación inversa significativa entre la concentración de LPO en el LCR y la dosis diaria equivalente de L-DOPA ($r=-0.626$, $p<0.0001$). **(C)** Hay también una correlación positiva entre los valores de LED y de la escala MDS-UPDRS parte IV ($r=0.697$, $p<0.0001$). Abbrev.: LCR, Líquido cefalorraquídeo; LPO, lactoperoxidasa; MDS-UPDRS, International Parkinson and Movement Disorder Society-Sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (Escala para discinesias y fluctuaciones motoras); LED, dosis diaria equivalente de L-DOPA.

Figura 3. Valores individuales de **(A)** Concentración de LPO en el LCR, y **(B)** Dosis diaria equivalente de L-DOPA, en pacientes con y sin complicaciones motoras. **(A)** Los pacientes con complicaciones motoras tienen menores concentraciones de LPO en el LCR. Los datos se presentan como valores individuales (puntos) y media y desviación estándar (líneas sólidas). ** $p=0.0003$. **(B)** La dosis diaria equivalente de L-DOPA es mayor en los pacientes con complicaciones motoras que sin complicaciones motoras.. ** $p<0.0001$ (Student's t-test). Abbrev.: LCR, Líquido cefalorraquídeo; LPO, lactoperoxidasa.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han analizado la relación del LCR y la LPO sérica

con las características clínicas de la EP idiopática. La concentración de LPO se analizó mediante técnicas de ELISA. Se examinó la correlación de LPO del LCR y sérica y MDS-UPDRS, escala de Hoehn-Yahr y otros parámetros clínicos. Los hallazgos revelaron que la concentración de LPO estaba elevada en el LCR, no en el
5 suero, en pacientes con EP al compararla con los controles ($p < 0,001$). El análisis por regresión logística binaria y de su correspondiente curva ROC indicó un punto de corte de LPO en LCR de 19 ng/ml para discriminar a los pacientes de los controles. La concentración de LPO en el LCR se correlacionó inversamente ($p < 0,0001$) con la intensidad del régimen de medicación dopaminérgica (expresada como dosis
10 equivalente de levodopa o LED, mg / día), y la concentración de LPO en el LCR fue significativamente menor en pacientes bajo un régimen dopaminérgico ≥ 19 ng/ml LED. La concentración de LPO en LCR y el LED también se correlacionaron con las puntuaciones de la parte IV de MDS-UPDRS ($p < 0,0001$), una escala de calificación (*International Parkinson and Movement Disorder Society-Sponsored revision of the*
15 *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*) que permite evaluar las complicaciones motoras de la terapia.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de la latoperoxidasa como biomarcador para el diagnóstico del parkinsonismo.

20

El parkinsonismo, en esta memoria, es aquel que resulta de la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del mesencéfalo e incluye la enfermedad de Parkinson idiopática (esporádica y hereditaria), pero también puede incluir casos de parkinsonismo secundario causado, por ejemplo, por
25 sustancias químicas tóxicas, fármacos, virus, bacterias, metales pesados, traumatismos, etc. y síndromes de parkinsonismo plus.

El término "parkinsonismo", como se usa aquí, se refiere a un síndrome clínico que se manifiesta por una combinación de los síntomas motores, tales como temblor,
30 bradicinesia, rigidez, inestabilidad postural, postura flexionada y la congelación. Las clasificaciones del parkinsonismo son la enfermedad de Parkinson, el parkinsonismo secundario, el parkinsonismo hereditario y los síndromes de parkinsonismo plus (degeneraciones multisistémicas, parálisis supranuclear progresiva o PSP, demencia con cuerpos de Lewy).

35

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto el parkinsonismo se selecciona de la lista que consiste en: la enfermedad de Parkinson (EP idiopático), el parkinsonismo secundario, el parkinsonismo hereditario y los síndromes de parkinsonismo plus. Más preferiblemente el parkinsonismo plus se selecciona de la lista que consiste en: degeneraciones multisistémicas, parálisis supranuclear progresiva o PSP, y demencia con cuerpos de Lewy.

El término "lactoperoxidasa" (también llamada LPO) se refiere tanto al gen como a la proteína humanos, En esta memoria se entiende por lactoperoxidasa a un miembro de la familia de proteínas de la peroxidasa. La preproteína codificada se procesa proteolíticamente para generar la enzima madura. Tras su secreción de las glándulas salivales, mamarias y otras mucosas, esta enzima cataliza la generación de la sustancia antimicrobiana ácido hipotiocianoso. Este gen está presente en un grupo de genes en el cromosoma 17.

Se refiere también a una proteína que tiene actividad peroxidasa, según se analiza mediante pruebas enzimológicas estándar. Las pruebas de actividad peroxidasa están disponibles comercialmente y se describen en documentos conocidos por el experto en la materia.

En el contexto de la presente invención, LPO también se define por una secuencia de nucleótidos o polinucleótidos que comprendería diversas variantes derivadas de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya hebra híbrida complementaria con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 80%, 90%, 95%, 98% o 99% con SEQ ID NO: 2 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y características estructurales de la proteína lactoperoxidasa. Otras posibles secuencias de nucleótidos que codifican la lactoperoxidasa incluyen, pero no se limitan a, SEQ ID NO: 1.

ID del gen: 4025

Ubicación del gen: 17q22

SEC ID NO: 1

CTTTCCTGCTAAGCCTCAGCGTCTCCTCCAAGCCACATCAAAATCTTTCCTTCTGG
 GCCTTTCCAGAAAGTGAATTCTTGCTGGAAGGTATAAAAGACCAGCTCCTCCAAG
 5 CAGAGCAACTCCCTGGCTGCCGTGAAAAGACAAGGCACTGGGCAGTGATGAGGG
 TCCTTCTCCATCTCCCAGCCCTCCTGGCTTCCCTCATCTTGCTTCAGGCTGCAGC
 ATCTACCACAAGAGCGCAGACTACCAGAACCTCTGCCATCTCCGATACTGTGAGT
 CAGGCCAAGGTCCAAGTCAACAAGGCCTTCTGGAAGTCCCAGAACAGGCTGAAG
 ACCGCCATGAGCTCTGAGACTCCCACCAGCCGACAGCTCTCAGAATACCTCAAGC
 10 ATGCCAAAGGCCGGACGCGCACAGCCATCCGCAATGGACAGGTGTGGGAGGAG
 TCTTTAAAGAGACTGAGGCAGAAGGCATCCTTGACCAATGTCACAGATCCCAGCC
 TGGACTTGACTTCACTGTCTCTGGAGGTGGGCTGTGGTGCTCCTGCTCCCGTGGT
 GAGATGCGACCCGTGCAGCCCTTACCGCACCATTACGGGAGACTGCAATAACAG
 GAGGAAGCCTGCGCTGGGCGCCGCCAACAGGGCTCTGGCGCGCTGGCTGCCCCG
 15 CGGAGTACGAGGACGGGCTCTCCCTGCCCTTCGGCTGGACGCCGGGGAAGACG
 CGCAACGGCTTCCCTCTCCCGCTGGCCCGGGAGGTATCTAACAAGATTGTTGGCT
 ATCTGAATGAGGAGGGTGTCTGGAACAAAACAGGTCCCTGCTCTTCATGCAGTG
 GGGTCAGATTGTGGATCATGACCTGGACTTTGCCCTGACACCGAGCTGGGGAG
 TAGCGAGTACTCCAAAGCCCAGTGTGATGAGTACTGTATCCAGGGAGACAACCTGC
 20 TTCCCCATCATGTTCCACCCAATGACCCCAAGGCGGGGACTCAAGGGAAATGCA
 TGCCTTTCTTCCGAGCTGGGTTCGTCTGCCCCACTCCACCCTACAAGTCCCTGGC
 CCGAGAGCAGATCAACGCTCTGACCTCCTTCTGGATGCCAGCTTTGTGTACAGC
 TCCGAGCCAAGCCTGGCCAGCCGCCTCCGCAACCTCAGCAGCCCCCTGGGCCTC
 ATGGCTGTCAACCAGGAGGTCTCAGACCATGGACTACCCTACCTGCCCTATGACA
 25 GCAAGAAGCCAAGCCCCTGTGAGTTCATCAACACCACTGCCCGTGTGCCCTGCTT
 CCTGGCAGGAGATTCTCGAGCCTCAGAGCATATTCTGCTGGCCACATCCCACACC
 CTCTTTCTCCGCGAGCATAACCGGCTGGCCAGAGAACTAAAGAGACTCAACCCTC
 AGTGGGATGGAGAGAAGCTCTACCAGGAAGCCCGGAAAATCCTGGGAGCCTTCG
 TGCAGATTATCACCTTTAGGGACTACCTACCCATTTTGCTAGGTGACCACATGCAG
 30 AAGTGGATACCCCATATCAAGGCTACAGTGAATCTGTGGATCCCAGAATTTCCAA
 TGTCTTCACCTTCGCCTTCCGCTTTGGCCACTTGAGAGTCCCCTCTAGTATGTTCC
 GCCTGGATGAGAATTATCAGCCATGGGGGCCAGAACCAAGAACTCCCCCTCCACA
 CCCTCTTCTTCAACACTTGAGGATGGTCAAAGATGGTGGAAATTGATCCTCTGGT
 GCGGGGCCTGCTGGCCAAGAAATCCAAGCTGATGAAACAGAATAAAATGATGACT
 35 GGAGAGCTGCGCAACAAGCTTTTCCAGCCAACTCACAGGATCCATGGCTTTGACC
 TGGCTGCCATCAACACACAGCGTTGCCGGGACCATGGGCAACCTGGGTACAATT
 CCTGGAGAGCCTTCTGTGACCTCTCACAGCCGACAGACTAGAGGAGTTGAACAC
 AGTGCTGAAGAGCAAGATGCTGGCCAAGAAGTTACTGGGTCTCTACGGGACCCC
 TGACAACATCGACATCTGGATAGGGGCCATTGCTGAGCCGCTGGTGGAAAGGGG
 40 TCGGGTGGGGCCTCTCCTGGCCTGCCTCTTGGGCAAGCAGTTCCAGCAGATCCG
 TGATGGAGACAGGTTCTGGTGGGAAAACCCTGGGGTCTTCACGAACGAGCAGAA
 GGAATCTCTACAGAAAATGTCTTCTCACGCCTTGTCTGTGACAACACCCGCATCA
 CCAAGGTCCCACGGGACCCATTCTGGGCCAACAGCTACCCCTATGACTTCGTGG
 ATTGCTCAGCCATCGACAAGCTGGACCTGTCACCCTGGGCCTCAGTGAAGAATTA
 45 GGGGCCCGCGCTGCACAGGAAAGTTCCCTTTGGTCCACAGGGGCCATTTCAAGCA
 AGTTCAATGACCTGGTCCCTTAGAGCTCCATATCCCAGTCCCAGCCCTTCTTTGCA
 GCTGGGCCTCTCTATACCCCTGGATGAACAGCTTGCTCAGGCCCCAGGGTGGCT
 GCCTCGGGCCTCCCAGCTCTTACACTCAGCTCCAGTGGCTTCTCCTTTCTGTCAA
 GACTTAGCCCCGCTGAGATGCCCTTCTGCTCCAGCTTGCTGGATGTTACCTGTCC
 50 TCTTCCCTCCACAAGTCTTGGCCCTTAACCTTTATCTTTCTTCTCCTGTCTCTCACCT
 AGATTGTAAGCTCCCTGGGCCAGGACTTCAGCCTGCCTCCGAGGGTCCCCTGTG
 GCACCTAGCATGGTGCACAGCACATTAGAAGTGCTCAAAAACATCTGATGACTGA

CTAAAGATGCTAGGCGTGACACCGTTCCCTCCAAAAGCAGACCTCGGAATCACTG
CCAAATAAGTAACTAGACGTTTACAGGCCA

SEQ ID NO: 2

5 MRVLLHLPALLASLILLQAAASTTRAQTTRTSAISDTV SQAKVQVNKAFLDSRTRLKTA
MSSETPTSRQLSEY LKHAKGRTRTAIRNGQVWEESLKRLRQKASLTNVTDP SLDLTSL
SLEVGCGAPAPVVRCDPCSPYRTITGDCNNRRKPALGAANRALARWLPAEYEDGLSL
PFGWTPGKTRNGFPLPLAREVSNKIVGYLNEEGVLDQNRSLLFMQWGQIVDHDLDFA
PDTELGSSEYSKAQCDEYCIQGDNCFPIMFPPNDPKAGTQGKCMPPFFRAGFVCPTPP
10 YKSLAREQINALTSFLDASFVYSSEPSLASRLRNLSSPLGLMAVNQEVS DHGLPYLPY
DSKKPSPCEFINTTARVPCFLAGDSRASEHILLATSHTLFLREHNRLARELKRLNPQW
DGEKLYQEARKILGAFVQIITFRDYL PILLGDHMQKWIPPYQGYSESVDPRISNVFTFAF
RFGHLEVPSSMFRLDENYQPWGPEPELPLHTLFFNTWRMVKDGGIDPLVRGLLAKKS
KLMKQNKMMTGELRNKLFQPTHRIHGFDLAAINTQRCRDHGQPGYNSWRAFCDSLQ
15 PQTLEELNTVLKSKMLAKKLLGLYGTPDNIDIWIGAIAEPLVERGRVG PLLACLLGKQF
QQIRDGDRFWWENPGVFTNEQKDSLQKMSFSRLVCDNTRITKVPRDPFWANSYPYD
FVDCSAIDKLDLSPWASVKN

En una realización más preferida, el parkinsonismo es la EP idiopática.

20

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LA INVENCION

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico del parkinsonismo, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- 25 a) obtener una muestra biológica aislada que comprende células de un individuo, y
b) detectar los niveles de lactoperoxidasa en la muestra biológica aislada de (a),
c) Comparar la expresión del paso (b) con una cantidad de referencia.

Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o
30 parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o
35 fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada de (a) es el líquido cefalorraquídeo (LCF).

5 Otro **aspecto** de la invención se refiere a un método para el diagnóstico del parkinsonismo en un individuo, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) – (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

(d) diagnosticar al individuo del paso (a) como un individuo con del parkinsonismo,
10 cuando presente una concentración estadísticamente significativa mayor de LPO en la muestra obtenida en (a), en relación a la cantidad de expresión detectada para dicho gen o dicha proteína en una población de individuos de referencia.

Más preferiblemente, la concentración de LPO en LCR es mayor o igual al 1,35 veces
15 la concentración en una muestra de individuos controles de referencia, más preferiblemente mayor o igual a 1,4 veces, a 1,5 veces, a 1, 8 veces la concentración en una muestra de individuos controles de referencia. Aún mucho más preferiblemente la concentración es mayor o igual a 2 veces la concentración en una muestra de individuos controles de referencia. En una realización particular la concentración de
20 LPO en LCR es mayor o igual a 19 ng/ml.

La detección de la expresión de los genes, o la detección de la cantidad de proteína, puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica.

25 La medida de la concentración, preferiblemente de manera cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la expresión de los genes, basada en una señal que se obtiene directamente de los transcritos de dichos genes, o de las proteínas a las que se traducen, y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de RNA o de proteínas
30 producidas por los genes. Dicha señal - a la que también podemos referirnos como señal de intensidad - puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiquetas" o productos de
35 reacción enzimática).

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de los niveles de expresión del gen de LPO (OMIM:150205), en la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con los niveles de expresión de los genes de LPO de una o varias muestras de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) del método de la presente invención puede ser asistida por ordenador.

10

Los niveles de expresión de los genes o de las proteínas van a dar un determinado perfil de expresión génica o proteica. El término "nivel de expresión", se refiere al material bioquímico, ya sea ARN o proteína, resultado de la expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen. Se entiende por "perfil de expresión génica" el perfil génico obtenido tras la cuantificación del ARNm producido por los genes de interés o biomarcadores. El perfil de expresión del gen se realiza, preferiblemente, determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica. La determinación del nivel de ARNm derivado de la transcripción del gen, puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR), secuenciación directa de ARNm, análisis en serie de la expresión génica (SAGE, SuperSAGE); chips de ARN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de ARN elaborados con oligonucleótidos sintetizados in situ mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación in situ utilizando sondas específicas para el gen marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

35 En la presente invención, preferiblemente, como producto de expresión génica nos

referimos a la proteína LPO. Se entiende por perfil de expresión proteica al que se obtiene mediante la detección y/o cuantificación de la proteína o las proteínas producto de la traducción del ARNm derivado de la transcripción del los genes, mediante por ejemplo, pero sin limitarnos, inmunodetección por western blot. La detección

5 cuantitativa de la expresión del gen *LPO* puede realizarse más preferiblemente mediante PCR en tiempo real (RT-PCR ó RTqPCR). La detección en tiempo real de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas.

10

A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos o tratamiento adecuados. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser

15 correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos

20 de confianza, determinación del valor significación P, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann Whitney, correlación de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de

25 p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada. En una realización

30 preferida de este aspecto de la invención, el individuo del paso (a) no recibe un tratamiento con levodopa.

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no

35 pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y

condición física.

La cantidad de referencia se obtiene a partir de los valores de expresión constitutiva de los genes, o de los valores medios de las proteínas, en un grupo de individuos
5 sanos, o de la expresión de los genes o los valores medios de las proteínas en el grupo de individuos antes de ser sometidos al tratamiento.

La cantidad de referencia será, por ejemplo, en el caso de la diferenciación entre los pacientes afectados por parkinsonismo, y preferiblemente EP idiopática, de los
10 individuos sanos, la expresión constitutiva del gen o la cantidad de proteína detectada en un grupo control de individuos sanos. Sin embargo, en el caso de la subclasificación de los pacientes afectados por parkinsonismo, y preferiblemente EP idiopática, en distintos estadios, el grupo control estará formado por un grupo de enfermos parkinsonismo, y preferiblemente EP idiopática, en una determinada fase de
15 desarrollo. En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia. La cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras obtenidas de una población de individuos con parkinsonismo, y preferiblemente EP idiopática, en distintas fases, mediante
20 técnicas estadísticas bien conocidas. En otra realización preferida, la muestra de referencia se obtiene de los pacientes antes y después del tratamiento.

La cuantificación de la cantidad de LPO puede hacerse por cualquiera de las técnicas conocidas por el experto en la materia, preferiblemente mediante técnicas
25 inmunológicas.

En una realización más preferida, las técnicas inmunológicas están basadas en reacciones de precipitación, basadas en reacciones de aglutinación, inmunomarcación, radioinmunoanálisis y técnicas radioinmunométricas, ELISA
30 (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), o en cualquiera de sus combinaciones. En otra realización más preferida, las técnicas inmunológicas comprenden el inmunomarcaje. En otra realización aún más preferida, el inmunomarcaje se selecciona de entre inmunomarcaje con anticuerpos conjugados a enzimas, inmunomarcaje con anticuerpos conjugados a fluorocromos, o citometría. Aún más
35 preferiblemente, la citometría es citometría de flujo.

KIT O DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO, MICROARRAY o MICROARRAY DE PROTEÍNAS Y USOS

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos y/o reactivos necesarios para analizar el producto de expresión de LPO en una muestra biológica.

En una realización preferida, el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión de LPO, y donde:

- 10 - los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%,
- 15 aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de la secuencia complementaria a la SEQ ID NO: 1,
- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 150 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%,
- 20 más 25 preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1,
- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.

25

El kit de la invención puede incluir controles positivos y/o negativos. El kit además puede contener, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de ADN/ARN o proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación del ADN/ARN y/o las proteínas, etc.

30

Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

35 El kit o dispositivo de la invención puede usarse y el uso no está particularmente

limitado, aunque se prefiere el uso en el método de la invención en cualquiera de sus realizaciones.

Por tanto, otro **aspecto** de la invención se refiere al uso de un kit o dispositivo de la invención para diagnosticar el parkinsonismo en un individuo. En una realización preferida de este aspecto de la invención el parkinsonismo es la EP idiopática.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los oligonucleótidos, cebadores, sondas o anticuerpos están modificados o marcados, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante un marcaje radiactivo o inmunológico. Así, preferiblemente, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo radiactivo, normalmente ^{32}P o tritio, nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

AUTOMATIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE LA INVENCION

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de

almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN ó DNA). Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

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.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

5

1. Procedimiento experimental

1.1. Participantes, información clínica y ética.

Los pacientes y controles se inscribieron en el Hospital Macarena, Sevilla, España. Todos los pacientes tenían una duración de la enfermedad > 2 años y fueron
 10 diagnosticados de EP por neurólogos expertos en base a la presencia de los tres signos motores clásicos del parkinsonismo (bradicinesia, rigidez y temblor en reposo), junto con una reducción confiable de la señal Dat-SPECT. en los ganglios basales. Se seleccionó una reducción de más del 35% de la señal Dat-Scan de putamen o caudado en relación con controles de la misma edad y sexo, según otros autores
 15 (Iranzo *et al.*, 2017. Ann. Neurol. 82(3), 419-428). Para excluir formas hereditarias de parkinsonismo, se descartaron aquellos pacientes con familiares con EP, menores de 45 años o con déficits atípicos. Los sujetos control estaban libres de trastorno neurológico, y fueron reclutados entre voluntarios sometidos a anestesia intradural antes de la cirugía en la Unidad de Anestesia del hospital Macarena. La anestesia y la
 20 cirugía en sí no tuvieron impacto en los parámetros del LCR y del suero a analizar, porque todos los fluidos corporales se obtuvieron antes de la anestesia. Los controles se emparejaron por grupos por edad y sexo con los sujetos con EP. Se excluyeron los controles si tenían un familiar de primer grado con EP.

25 Se realizó un estudio estandarizado, que incluyó información clínica como edad, sexo, índice de masa corporal, educación (años), tratamiento farmacológico y escalas de calificación. Se excluyeron las personas que presentaban alguna disfunción cardíaca, hepática, renal o hematológica, cáncer, trastornos autoinmunitarios, SIDA y afecciones infecciosas (el LCR y los marcadores séricos pueden estar alterados en tales
 30 afecciones) (Martin de Pablos *et al.*, 2015. Antioxid. Redox Signal. 23(11), 893-898; Martin de Pablos *et al.*, 2018. Exp. Gerontol. 110, 54-60). Además, todos los participantes deben ser no fumadores, no bebedores de café o alcohol. El tabaquismo se definió como el fumador actual que consumía cigarrillos a diario o los fumadores ocasionales que consumían cigarrillos menos que a diario. El abuso de alcohol se
 35 definió como beber > 210 g por semana. Beber café se definió como la ingesta diaria

de más de 300 mg de cafeína (más de tres tazas de 50-60 ml de café expreso).

Treinta y cuatro pacientes con EP esporádica y 25 sujetos de control se inscribieron para este estudio. Se obtuvieron formularios de consentimiento informado de todos los
 5 sujetos. Todos los protocolos fueron aprobados por los consejos internos de ética y ciencia de la Universidad de Sevilla (CEI 27/05/2010), Comité de Ética de Investigación de la Junta de Andalucía (PEIBA; # 2017121418738), y Hospital Universitario Macarena (CEI Macarena, 19/05/2010 y 29/10/2013). El consentimiento de los sujetos se obtuvo de acuerdo con la Declaración de Helsinki (BMJ 1991; 302:
 10 1194).

1.2. Datos clínicos

Los datos clínicos incluyeron la revisión patrocinada por la International Parkinson and Movement Disorder Society de la Unified Parkinson Disease Rating Scale (MDS-
 15 UPDRS), la estadificación de Hoehn-Yahr modificada y la escala de actividades de la vida diaria de Schwab-England modificada (Hoehn y Yahr, 1967. *Neurology* 17, 427–442; Fahn y Elton, 1987. Recent developments in Parkinson's disease, Vol. 2, Macmillan Health Care Information, Florham Park NJ; Fahn, 2003. Ann. N. Y. Acad. Sci. 991, 1-14). También se evaluó la duración de la enfermedad en años y la edad al
 20 inicio de la EP. En cuanto a la medicación, los pacientes fueron tratados con diferentes regímenes de fármacos antiparkinsonianos y la intensidad de la dosis de medicación dopaminérgica se expresó como dosis equivalente de levodopa (LED, mg por día). El cálculo de la dosis equivalente de levodopa se basó en los datos reportados por varios autores (Tomlinson *et al.*, 2010. *Mov. Disord.* 25(15), 2649-53; Ferreira *et al.*, 2016.
 25 *Lancet Neurol.* 15(2), 154-165; Verber *et al.*, 2020. *Comput. Methods Programs Biomed.* 196, 105633), de acuerdo con la siguiente fórmula: LED = levodopa de liberación inmediata x 1 + levodopa de liberación controlada x 0,75 + levodopa con entacapona x 1,33 + pramipexol x 100 + ropinirol x 20 + rotigotina x 30 + apomorfina x 10 + amantadina x 1 + rasagilina x 100.

30

1.3. Recolección de LCR y suero.

El LCR se recogió mediante punción lumbar, por médicos expertos. Se recogieron dos ml de LCR y se dividieron rápidamente en alícuotas y se congelaron a -80°C. Se empleó una colección fresca de 0,5 ml para observar la ausencia de punción
 35 traumática y para cuantificar los glóbulos rojos antes de almacenarlos. Se descartó el

LCR con exceso de glóbulos rojos (> 500 glóbulos rojos / microL). Se recogieron cinco ml de sangre mediante punción en la vena cefálica para obtener suero (BD Vacutainer). El suero se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, luego se alicuotó inmediatamente y se congeló a -80°C en alícuotas de 0,5 ml.

5

1.4. Análisis de muestras biológicas.

El contenido de lactoperoxidasa se evaluó con un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas disponible comercialmente (kit ELISA para lactoperoxidasa humana, ref. SEA296Hu, Cloud-Clone Corp., EE. UU.), Siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizaron alícuotas frescas de 0,5 ml para cada sujeto en placas de 96 pocillos en la misma sala analítica para este estudio a fin de minimizar las fuentes de variación entre análisis y lotes del kit de reactivos. Cada muestra se analizó por duplicado (LCR, sin dilución; suero, dilución 1/200).

10

15

1.5. Estadísticas.

20

Las comparaciones de variables dicotómicas se realizaron con la prueba de la χ^2 y las variables cuantitativas se compararon con la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney si la distribución era no paramétrica. La normalización de los datos se verificó con la prueba de Shapiro-Wilk. Las correlaciones se realizaron con la prueba de Pearson o la prueba de Spearman en distribución no paramétrica. Si uno de los factores era independiente del investigador, se realizaban análisis de regresión lineal simple para discernir las correlaciones.

2. Resultados

25

2.1. Parámetros demográficos y clínicos

Primero, verificamos que las características demográficas básicas no fueran diferentes entre los participantes de control y los pacientes con EP, como se muestra en la Tabla 1. Los parámetros clínicos de los pacientes con EP también se muestran en la Tabla 1.

30

35

Tabla 1. Parámetros clínicos y demográficos, y concentración de LPO en LCR y Suero en pacientes con EP y controles

Parámetros	EP (n=34)	Control (n=25)	P
Edad, años	61.2±18.2	59.2±12.1	NS
Género, varón n (%)	20(60)	10(40)	NS
Índice de masa corporal	22.1±3	24.6±3	NS
Educación, años	17.1±3.1	17.3±3.5	NS
Dosis equivalente de levodopa, mg al día	633.6±648		
Duración de la EP, años	11±7		
Edad de comienzo de la EP, años	57.7±11.2		
Estadio de Hoehn-Yahr	2.1±0.8		
Escala de Schwab-England	85±23		
MDS-UPDRS parte III (fase en ON)	19.2±12.2		
MDS-UPDRS total (I-III) (fase en ON)	32.3±21.2		
MDS-UPDRS parte IV	2.1±1.7		
Valores en los biofluidos			
LPO en LCR (ng/ml)	12.7±6.4	8.8±5.9	=.0202
LPO en suero (ng/ml)	993±413	992±456	NS
LPO en LCR/LPO en suero	0.015±0.01	0.013±0.01	NS
Correlación de Pearson entre LPO en LCR y LPO en suero	0.047	-0.068	NS

Media ± error estándar. Abrev.: EP, enfermedad de Parkinson; LPO, lactoperoxidasa; NS, no significativo; MDS-UPDRS, International Parkinson and Movement Disorder Society-Sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale; LCR, líquido cefalorraquídeo; P, probabilidad.

2.2. LCR y lactoperoxidasa sérica

- La concentración de LPO en el LCR se elevó significativamente en los pacientes en relación con los controles, como se muestra en la Tabla 1 ($t = 2.38$, $p = .0202$). Los valores individuales de la concentración de LPO en el LCR en pacientes con EP y los participantes de control se muestran en la Figura 1. El nivel de LPO en suero de esta enzima no fue significativamente diferente en los pacientes en relación con los controles, y no se encontró correlación entre el nivel de LPO en suero y el nivel de

LPO en el LCR (Tabla 1). La proporción de LPO en LCR / LPO en suero fue similar tanto en pacientes con EP como en participantes de control, como se muestra en la Tabla 1. El análisis de la curva ROC, utilizando la concentración de LPO en LCR como un predictor de la enfermedad, reveló 19 ng / ml como el mejor punto de corte para discriminar pacientes en EP y controles sanos, con una fuerte sensibilidad de 0,91 y una baja especificidad de 0,27. El área bajo la curva fue 0,66.

En cuanto a las correlaciones clínicas, se encontró una correlación inversa significativa entre la concentración de LPO en LCR y la dosis diaria equivalente de levodopa ($r = -0,668$, $p < 0,0001$), como se muestra en la Figura 2. Al utilizar el punto de corte ROC de la concentración de LPO en el LCR, se encontró que el valor del LED era significativamente más bajo en pacientes con una concentración de LPO en el LCR ≥ 19 ng / ml (LED = 275 ± 256 mg / día, $n = 9$) que en el resto pacientes (LED = 867 ± 710 mg / día, $n = 25$, $t = 2,4248$, $p = .0211$).

Se encontró una correlación inversa significativa entre la concentración de LPO en LCR y la puntuación MDS-UPDRS parte IV ($r = -0.531$, $p < .0001$), como se muestra en la Figura 2. Esta escala de calificación permite evaluar las complicaciones motoras de la terapia (discinesias y fluctuaciones motoras). Se observó una correlación positiva significativa entre el valor de LED y la puntuación de la parte IV de MDS-UPDRS ($r = 0,593$, $p < 0,0001$; Fig. 2), lo que indica que existe una interacción entre la intensidad del régimen de medicación dopaminérgica y las complicaciones motoras. Los pacientes con complicaciones motoras, en otras palabras con puntuaciones MDS-UPDRS parte IV > 0 , estaban bajo dosis diarias equivalentes de levodopa significativamente más altas que el resto de pacientes (pacientes con complicaciones motoras, 1073 ± 456 mg / día LED, $n = 12$; pacientes sin complicaciones motoras, $256,8 \pm 389$ mg / día LED, $n = 22$; $t = 4,52$, $p < 0,0001$), como se ve en la Figura 3. Además, los pacientes con complicaciones motoras presentan menores niveles de LPO en LCR que los pacientes sin complicaciones motoras (pacientes con complicaciones motoras, $7,3 \pm 4,4$ ng/ml; pacientes sin complicaciones motoras, $14,9 \pm 5,5$ ng/ml; $t = 4,1134$, $p = 0,0003$; Figure 3).

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de la lactoperoxidasa como biomarcador para el diagnóstico del parkinsonismo.
- 2.- El uso de la lactoperoxidasa según la reivindicación anterior, donde el parkinsonismo es la EP idiopática.
- 3.- Un método para la obtención de datos útiles para el diagnóstico del parkinsonismo que comprende:
- a) obtener una muestra biológica aislada que comprende células de un individuo, y
- b) detectar los niveles de lactoperoxidasa en la muestra biológica aislada de (a),
- 4.- El método para la obtención de datos útiles según la reivindicación anterior, que comprende los pasos (a)-(b) según la reivindicación 3, y además comprende:
- c) comparar la expresión del paso (b) con una cantidad de referencia.
- 5.- Un método para el diagnóstico del parkinsonismo que comprende los pasos (a)-(c), y además comprende:
- (d) diagnosticar al individuo del paso (a) como un individuo con parkinsonismo, cuando presenta una concentración estadísticamente significativa mayor de LPO en la muestra obtenida en (a), en relación a la cantidad del producto de expresión detectada de LPO en una población de individuos de referencia.
- 6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde la muestra biológica del paso (a) es líquido cefalorraquídeo.
- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde el individuo del paso (a) se diagnostica como un individuo con parkinsonismo la concentración de LPO en LCR es mayor o igual a
- a. 1,35 veces la concentración en una muestra de individuos controles de referencia,
- b. 1,4 veces,
- c. 1,5 veces,
- d. 1,8 veces, o
- e. 2 veces
- la cantidad del producto de expresión detectada de LPO en una muestra de una población de individuos de referencia.

- 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-7, donde el parkinsonismo se selecciona de la lista que consiste en: la enfermedad de Parkinson (EP idiopático), el parkinsonismo secundario, el parkinsonismo hereditario y los síndromes de parkinsonismo plus.
- 5 9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-8, donde el parkinsonismo plus se selecciona de la lista que consiste en: degeneraciones multisistémicas, parálisis supranuclear progresiva o PSP, y demencia con cuerpos de Lewy.
- 10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, donde el parkinsonismo es la EP idiopática.
- 10 11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-10, donde los pasos (b) y/o (c) pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).
- 12.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-11, donde la determinación del producto de expresión de *LPO* se realiza mediante:
- 15 a) un procedimiento de análisis de la expresión génica, como por ejemplo, pero sin limitarnos, qRT-PCR, microarrays de ADN, nCounter, RNA-Seq, FISH y microarrays de tejidos; y/o
- b) transferencia Northern,
- 20 c) un inmunoensayo o inmunohistoquímica.
- 13.- Un kit o dispositivo, comprende los elementos y/o reactivos necesarios para analizar el producto de expresión de *LPO* en una muestra biológica.
- 14.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el
- 25 producto de expresión de *LPO*, y donde:
- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una
 - 30 identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de la secuencia complementaria a la SEQ ID NO: 1,
 - las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de
 - 35 bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más

- preferiblemente de entre 150 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más 25 preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las
- 5 secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1,
- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.
- 15.- Uso de un kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 13-14 para diagnosticar el parkinsonismo en un individuo.
- 10 16.- El uso según la reivindicación anterior, donde el parkinsonismo es la EP idiopática.

FIGURA 1

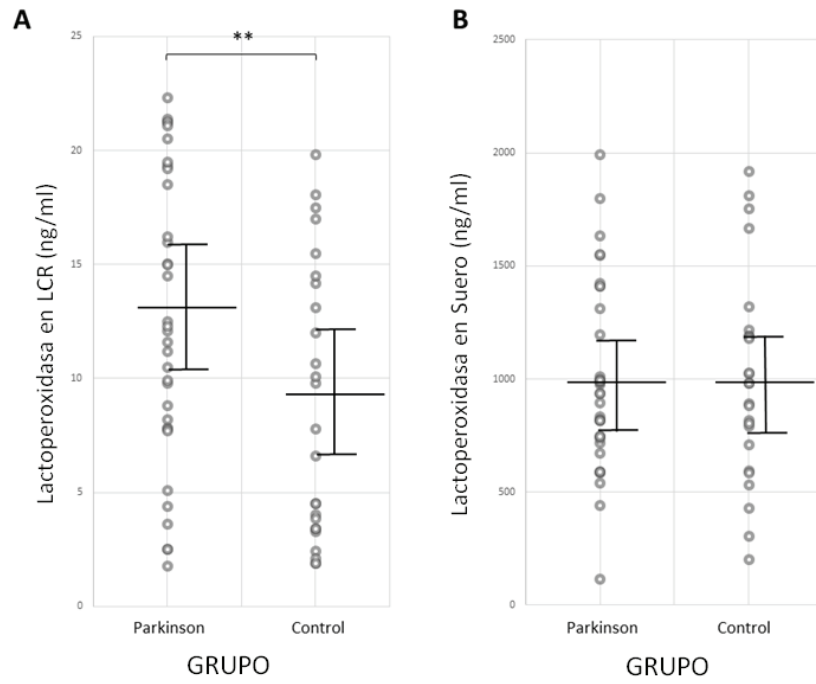


FIG. 1

FIGURA 2

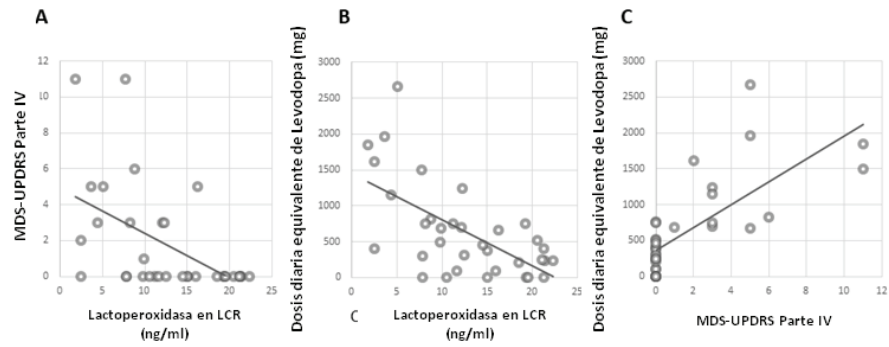


FIG. 2

FIGURA 3

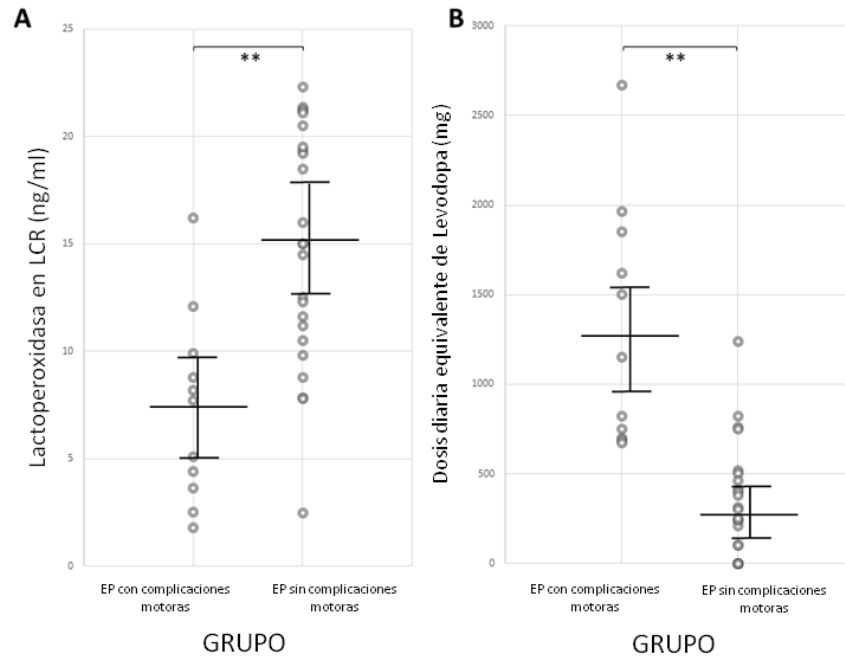


FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 202130213
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.03.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/6876** (2018.01)
G01N33/53 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FERNANDEZ-ESPEJO EMILIO et al., "Cerebrospinal fluid lactoperoxidase level is enhanced in idiopathic Parkinson's disease, and correlates with levodopa equivalent daily dose." Brain research, 05/03/2021, Vol. 1761, Páginas 147411, ISSN 1872-6240 (Electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.brainres.2021.147411 pubmed:33676939>, todo el documento.	1-16
A, D	FERNÁNDEZ-ESPEJO E. Is there a halo-enzymopathy in Parkinson's disease? Neurologia, 02/04/2019, <DOI: doi: 10.1016/j.nrl.2018.12.008>, todo el documento. Citado en la solicitud	1-16
A	GOLDMAN JENNIFER G et al., "Cerebrospinal fluid, plasma, and saliva in the BioFIND study: Relationships among biomarkers and Parkinson's disease Features". Movement disorders, 31/01/2018, Vol. 33, Nº 2, Páginas 282 - 288, ISSN 1531-8257 (Electronic), <DOI: doi:10.1002/mds.27232 pubmed:29205509>, todo el documento.	1-16
A	ANDERSEN A D et al., "Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease - a systematic review." Acta neurologica Scandinavica ,31/12/2016, Vol. 135, Nº 1, Páginas 34 - 56, ISSN 1600-0404 (Electronic), <DOI: doi:10.1111/ane.12590 pubmed:26991855>, todo el documento.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

D: Documento citado por el solicitante en la solicitud.

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
11.01.2022

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/2

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

C12Q, G01N

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

EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE