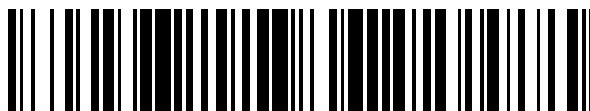


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 665**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2005 E 11155527 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2371396**

54 Título: **Fragmentos Truncados de alfa sinucleína en la demencia de cuerpos de Lewy**

30 Prioridad:

**19.10.2004 US 969335**  
**29.07.2005 US 194115**

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

**14.05.2014**

73 Titular/es:

**ELAN PHARMACEUTICALS, LLC (100.0%)**  
**300 Technology Square, Third Floor**  
**Cambridge, MA, US**

72 Inventor/es:

**CHILCOTE, TAMIE J.;**  
**GOLDSTEIN, JASON;**  
**ANDERSON, JOHN P. y**  
**WALKER, DONALD**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 460 665 T3**

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

**Fragmentos Truncados de alfa sinucleína en la demencia de cuerpos de Lewy****Descripción****5 ANTECEDENTES**

**[0001]** Las demencias con cuerpos de Lewy (DCLs) se caracterizan por la degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deficiencia cognitiva y formación de cuerpos de Lewy (CLs). (McKeith et al., *Clinical and pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the CDLB International Workshop*, Neurology (1996) 47: 1113 – 24). Las DCLs incluyen la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy difusos (DCLD), la variantes con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCL) y PD y enfermedad de Alzheimer (EA) combinada y los síndromes identificados como atrofia multisistémica (AMS). La demencia con cuerpos de Lewy (DCL) es un término acuñado para reconciliar las diferencias en la terminología de las DCLs. Los trastornos con CL continúan siendo una causa común de los trastornos del movimiento y del deterioro cognitivo en la población de edad avanzada (Galasko et al., *Clinical neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias*. Arch. Neurol. (1994) 51: 888 – 95). Aunque su incidencia continua incrementado la creación de un grave problema de salud pública, a día de hoy estos trastornos carecen de tratamientos aprobados (Tanner et al., *Epidemiology of Parkinson's disease and akínetic syndromes*, Curr. Opin. Neurol. (2000) 13: 427 – 30). La causa de la DCL es controvertida y se sugiere que múltiples factores desempeñan un papel en esta, incluyen varias neurotoxinas y factores de susceptibilidad genética.

**[0002]** La EA, la EP y la DCLD son los trastornos neurodegenerativos más comúnmente hallados en las personas de edad avanzada. Estudios epidemiológicos recientes han demostrado una relación clínica cercana entre la EA y la EP, ya que el 30 % de los pacientes con Alzheimer también tiene EP. En comparación al resto de la población de edad avanzada, los pacientes con EA tienen más probabilidad de desarrollar EP concomitante. Además, los pacientes con EP que se convierten en dementes han desarrollado, normalmente, la EA clásica. Aunque cada enfermedad neurodegenerativa parece tener predilección por regiones cerebrales y poblaciones celulares específicas, tienen como resultado diferentes características patológicas, EP, EA y DCLD también comparten distintivos patológicos comunes. Los pacientes con EA familiar, síndrome de Down o EA esporádica desarrollan CLs en la amígdala, que son los distintivos neuropatológicos clásicos de la EP. Además, cada enfermedad se asocia a la degeneración de neuronas, conexiones sinápticas interneuronales y, finalmente, muerte celular, la disminución de neurotransmisores, y la acumulación anormal de proteínas mal plegadas, los precursores de lo que participa en las funciones normales del sistema nervioso central. Estudios bioquímicos han confirmado una relación entre EA, EP y DCL.

**[0003]** En los últimos años, ha surgido una nueva esperanza para comprender la patogénesis de la DCL. Específicamente, diversos estudios han mostrado que la proteína sináptica alfa – sinucleína desempeña un papel central en la patogénesis de la EP ya que: (1) esta proteína se acumula en los CLs (Spillantini et al., Nature (1997) 388: 839 - 40; Takeda et al., J. Pathol. (1998) 152: 367 - 72; Wakabayashi et al., Neurosci. Lett. (1997) 239: 45 - 8), (2) las mutaciones en el gen de la alfa – sinucleína se cosegregan con formas familiares raras de parkinsonismo (Kruger et al., Nature Gen. (1998) 18: 106 - 8; Polymeropoulos, et al., Science (1997) 276: 2045 - 7) y, (3) su sobreexpresión en ratones transgénicos (Masliah et al., Science (2000) 287: 1265 - 9) y *Drosophila* (Feany et al., Nature (2000) 404: 394 – 8) imita varios aspectos patológicos de la EP. Por lo tanto, el hecho de la acumulación de alfa – sinucleína en el cerebro se asocia con alteraciones morfológicas y neurológicas similares en especies tan diversas como humanos, ratones y moscas sugieren que esta molécula contribuye al desarrollo de la EP.

**[0004]** Las placas neuríticas, que son el distintivo patológico clásico de la EA consisten, esencialmente, en péptido beta - amiloide (A $\beta$ ), un aminoácido proteolítico producto de la proteína precursora amiloide (APP), y NAC, un fragmento proteolítico de alfa - sinucleína de 35 aminoácidos. Tanto el A $\beta$  como el NAC se identificaron en primer lugar en placas amiloides como fragmentos proteolíticos de sus respectivas proteínas completas, para las que se identificaron y clonaron ADNcs completos. (Iwai A., Biochim. Biophys. Acta (2000) 1502: 95 - 109); Masliah et al., AM. J. Pathol (1996) 148: 201 - 10; Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 11282 – 6).

**[0005]** La alfa – sinucleína es parte de una gran familia de proteínas, incluyendo la sinucleína beta – y gamma – y la sinoretina. La alfa – sinucleína se expresa en el estado normal asociados a sinapsis y se cree que desempeña un papel en la plasticina neuronal, el aprendizaje y la memoria. Se han identificado mutaciones de alfa – sinucleína en humanos (h) que aumentan la agregación de alfa – sinucleína (Ala30Pro y Ala53Thr) y se asocian con formas raras de formas dominantes autosómicas de la EP. Se desconoce el mecanismo mediante el cual estas mutaciones incrementan la propensión de la alfa – sinucleína para agregarse.

**[0006]** La patente WO – A – 2005013889 identifica nuevos fragmentos de alfa – sinucleína en pacientes con Demencia con Cuerpos de Lewy (DCL) y en modelos animales transgénicos de la misma. Los fragmentos tienen un extremo C – terminal truncado respecto a la alfa – sinucleína completa. Algunos fragmentos se caracterizan por tener un peso molecular de unos 12 kDa como se determinó por la electroforesis en gel SDS en tampón de tricina y una truncación de, al menos, diez aminoácidos contiguos a partir del extremo C – terminal de la alfa – sinucleína natural. El sitio de clivaje preferible tiene lugar tras el residuo (117) y antes del residuo (126) de la alfa – sinucleína

natural. La patente WO – A – 2005013889 establece que la identificación de estos nuevos fragmentos de alfa – sinucleína tiene numerosas aplicaciones en, por ejemplo, el descubrimiento de fármacos, diagnósticos, terapéuticos y animales transgénicos.

## 5 Resumen de la invención

**[0007]** La invención presenta un fragmento de alfa – sinucleína, que es alfa – sinucleína SN1 – 135, con residuos numerados según la SEC ID N° 1.

10 **[0008]** La invención presenta métodos de cribado para un agente con actividad farmacológica útil para el tratamiento de la Demencia con Cuerpos de Lewy (DCL). El método incluye poner en contacto el agente con el fragmento de alfa – sinucleína; y determinar la velocidad o la extensión de la agregación del fragmento de alfa – sinucleína, en la que una reducción de la velocidad o de la extensión de la agregación respecto al control sin el agente indica que el agente tiene la actividad farmacológica.

15 **[0009]** Opcionalmente, el fragmento de alfa – sinucleína soporta una mutación asociada con una DCL hereditaria, como una mutación A53T. Opcionalmente, el método incluye un paso adicional de realizar un ensayo en un modelo animal no humano de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL.

20 **[0010]** La invención presenta, además, métodos de cribado de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento una DCL (por ejemplo la enfermedad de Parkinson o DCLD), comprendiendo poner en contacto una célula que expresa alfa – sinucleína y procesar la alfa – sinucleína en el fragmento con un agente. Se determina entonces un nivel del fragmento en la célula respecto al nivel de referencia en el mismo tipo de célula en ausencia del agente, una reducción en el nivel del fragmento respecto al nivel de referencia indica que el agente tiene actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL. Opcionalmente, el fragmento de alfa – sinucleína contiene una mutación asociada a una DCL hereditaria, como una mutación A53T. La célula puede ser una célula humana, una célula neuronal, una célula dopaminérgica o una célula no dopaminérgica. Opcionalmente, la célula es célula PC12 o Sy5Y. Opcionalmente, el método incluye un paso de realizar un ensayo en un modelo animal no humano de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL.

30 **[0011]** La invención presenta, además, métodos de cribado de un agente con actividad farmacológica útil para tratar una DCL (por ejemplo la enfermedad de Parkinson o DCLD). El método incluye poner en contacto un animal transgénico no humano que expresa el fragmento alfa – sinucleína y determinar un nivel de formas agregadas del fragmento en el cerebro del animal transgénico respecto al nivel de formas agregadas del fragmento de referencia en un animal transgénico comparable en ausencia del agente, una reducción en el nivel del fragmento de formas agregadas respecto a la referencia indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL. Opcionalmente, el fragmento de alfa – sinucleína contiene una mutación asociada a una DCL hereditaria, como una mutación A53T. Opcionalmente, el animal transgénico es un roedor. El animal transgénico puede ser, también, un *Drosophila*. Opcionalmente, el método incluye un paso de realizar un ensayo en un modelo animal no humano de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL.

40 **[0012]** La invención presenta, además, métodos de cribado de un agente con actividad farmacológica útil para tratar una DCL (por ejemplo la enfermedad de Parkinson o DCLD). El método incluye poner en contacto un animal transgénico que expresa el fragmento alfa – sinucleína y procesar la alfa – sinucleína en el fragmento con un agente, y determinar un nivel del fragmento en una célula neuronal respecto a un nivel de referencia en ausencia del agente, una reducción en el nivel de fragmentos respecto a la referencia indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL. Opcionalmente, el fragmento de alfa – sinucleína es 1 – X, donde X es 130 – 139. Opcionalmente, el fragmento de alfa – sinucleína contiene una mutación asociada a una DCL hereditaria, como una mutación A53T. Opcionalmente, el animal transgénico es un roedor, un ratón o *Drosophila*. Opcionalmente, el método incluye un paso de realizar un ensayo en un modelo animal no humano de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL.

50 **[0013]** La invención presenta, además, un animal transgénico no humano con un genoma que comprende un transgén que incluye un promotor unido operablemente a un segmento de ácido nucleico que codifica el fragmento de alfa – sinucleína; donde la expresión del fragmento en el animal transgénico predispone al animal a desarrollar, al menos, una característica de una DCL. Opcionalmente, el promotor es un promotor PDGF. Opcionalmente, al menos una característica es una deficiencia de la función motora. Opcionalmente, al menos una característica del animal transgénico es una deficiencia de la función cognitiva. Opcionalmente, el animal transgénico es un roedor, un ratón o un *Drosophila*.

60 **[0014]** La invención presenta, además, métodos para detectar la presencia de una DCL en un paciente. Los métodos incluyen la detección de un nivel del fragmento de alfa – sinucleína en el líquido cefalorraquídeo, un incremento, respecto al nivel de referencia en individuos sin enfermedad indica la presencia de DCL.

65 **[0015]** La invención presenta, además, un anticuerpo que se une específicamente al fragmento de alfa – sinucleína, sin unirse específicamente a la alfa – sinucleína completa. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo

humano, humanizado y quimérico. Opcionalmente, el anticuerpo es monoclonal. Opcionalmente, el anticuerpo tiene el isotipo humano IgG1.

5 **[0016]** La invención presenta, además, métodos para diagnosticar la presencia de una DCL mediante imagen funcional *in vivo*. Los métodos incluyen determinar un nivel de unión del anticuerpo en pacientes, donde un alto nivel de unión respecto a un nivel de referencia en individuos sin enfermedad indica la presencia de la DCL.

10 **[0017]** La divulgación presenta, además, métodos para efectuar el tratamiento o profilaxis de una DCL, comprendiendo la administración a un paciente que padece o tiene riesgo de padecer una DCL, un régimen efectivo del fragmento de alfa – sinucleína. Opcionalmente, el método comprende, además, la administración de un adyuvante que aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos del fragmento. Opcionalmente, el fragmento se une a un portador formando una proteína de fusión, donde el portador aumenta una respuesta inmune comprendiendo anticuerpos del fragmento.

15 **[0018]** La divulgación presenta, además, métodos para efectuar el tratamiento o la profilaxis de una DCL. El método incluye la administración a un paciente que padece o tiene riesgo de padecer una DCL de un régimen efectivo de un anticuerpo que se une específicamente al fragmento de alfa – sinucleína, sin unirse a la alfa – sinucleína intacta, donde el anticuerpo efectúa la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad.

## 20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

### **[0019]**

25 Las Figs 1A y 1B muestran un Western blot de varios extractos de la corteza y el hipocampo de un ratón transgénico (B) y un control emparejado (A) con un anticuerpo policlonal que se une a un epítipo en SN115 – 122.

La Fig. 2 muestra un Western blot con el mismo anticuerpo de las Figs 1A y 1B para comparar el nivel de la forma troncada de alfa – sinucleína en extractos Tritón – X100 de la corteza y del hipocampo de ratones de 3 y 12 meses de edad.

30 Las Figs 3A y 3B muestran un Western blot con un anticuerpo diferente denominado 12C1 (un monoclonal que se une al epítipo en los aminoácidos 43 – 51 y 58 – 65) de un extracto Tritón del cerebro de un ratón transgénico de tres meses (B) en comparación a un control emparejado (A).

35 La Fig. 4 muestra otro Western blot utilizando el mismo anticuerpo de la Fig. 3 en un extracto Tritón del cerebro de ratones transgénicos de tres y doce meses de edad.

40 Las Figs 5A, 5B, 5C, 5D y 5E muestran Western blot con cuatro anticuerpos diferentes (B, C, D, E) y un mapa de epítipos (A) de los sitios de unión (SECs ID N° 5, 6, 7 y 8) de los anticuerpos a varios extractos de los cerebros de ratones transgénicos.

45 Las Figs 6A, 6B y 6C muestran extractos Tris del cerebro de un paciente con demencia con cuerpos de Lewy hibridadas con tres anticuerpos diferentes (A, B, C), sujeto a electroforesis en gel 2 – D y a Western blot. Todos los geles 2D en este documento se muestran con proteínas ácidas en la izquierda, y proteínas básicas en la derecha.

Las Figs 7A, 7B, 7C y 7D muestran inmunotransferencias de extractos Tris del cerebro de un paciente con demencia con cuerpos de Lewy con cuatro anticuerpos (A, B, C, D) de especificidades adicionales.

50 La Fig. 8 resume los sitios de clivaje respecto a los epítipos (SEC ID N° 9) unidos por anticuerpos empleados en el Western blot.

Las Figs 9A y 9B comparan las proteínas solubles Tris (A) con proteínas extraídas de los cuerpos de Lewy (B) por electroforesis 2D y Western blot.

55 Las Figs 10A, 10B, 10C y 10D muestran las inmunotransferencias de proteínas de los cuerpos de Lewy rehibridadas con varios anticuerpos C – terminal.

60 Las Figs 11A y 11B muestran Western blots de varios extractos de un paciente sin enfermedad y un paciente Contursi con un anticuerpo que reconoce la alfa – sinucleína total (A) o la alfa – sinucleína específica para fosfo – 129 (B).

Fig. 12: Cromatograma de ion extraído de péptido C – terminal de SN1 – 122.

Fig. 13: Cromatograma de ion extraído de péptido C – terminal de SN1 – 119.

65 Figs 14A, 14B, 14C, 14D, 14E y 14F: inmunotransferencia 2D con un anticuerpo que reconoce la sinucleína total.

Las líneas marcan las posiciones de cuatro filas de especies de sinucleína truncada en C. Las Figs 14A, 14B, 14C, 14E y 14F muestran diferentes preparaciones a partir de diferentes pacientes y la Fig. 14D es un control.

5 Figs 15A y 15B: inmunotransferencias 2D comparando ELADW101 (B), que es específico del extremo de SN1 – 119 con un anticuerpo para la alfa – sinucleína total (A). Los asteriscos indican manchas que reaccionan con ambos anticuerpos. Estas manchas se identifican como SN1 – 119.

10 Las Figs 16A y 16B muestran, respectivamente, el marcaje de los cuerpos de Lewy y neuritis con el anticuerpo policlonal ELADW – 101 específico del extremo de SN1 – 119.

Las Figs 17A y 17B son controles de un individuo normal teñido con ELADW – 101.

15 Las Figs 18A y 18B son secciones cerebrales de un paciente con DCLD teñidos con el anticuerpo monoclonal 12C6 específico del extremo de SN1 – 119.

## DEFINICIONES

20 [0020] El término “agente” se utiliza para describir un compuesto que tiene y puede tener actividad farmacológica. Los agentes incluyen compuestos conocidos como fármacos, compuestos para los que se ha identificado una actividad farmacológica pero que están siendo sometidos a otro análisis farmacológico, y compuesto que forman parte de colecciones y bibliotecas que se analizan por una actividad farmacológica.

25 [0021] Una actividad “farmacológica” significa que un agente muestra una actividad en un sistema de análisis que indica que el agente es o puede ser útil en la profilaxis o en el tratamiento de una enfermedad. El sistema de análisis puede ser *in vitro*, celular, animal o humano. Los agentes pueden describirse como que tienen actividad farmacológica a pesar que pueden ser necesarias otras pruebas para establecer la utilidad profiláctica o terapéuticas real en el tratamiento de una enfermedad.

30 [0022] En el contexto de la determinación de peso molecular basado en electroforesis en gel, el término “aproximadamente” indica la derivación estándar del peso molecular esperado debido al error experimental en repeticiones del método en las mismas condiciones. La determinación del peso molecular de 12 kDa para ciertos fragmentos de alfa – sinucleína se aplica a determinaciones utilizando un tampón de tricina.

35 [0023] Las frases “se une específicamente” se refiere a una reacción de unión determinativa de la presencia de la proteína en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros biológicos. Por tanto, en condiciones definidas, un ligando específico se une preferentemente a una proteína particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. Una molécula como un anticuerpo que se une específicamente a una proteína tiene, a menudo, una asociación constante o de, al menos,  $10^6 \text{ M}^{-1}$  a  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , preferiblemente de  $10^8 \text{ M}^{-1}$  a  $10^9 \text{ M}^{-1}$  y, más preferiblemente, de  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  a  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  o más. Pueden emplearse numerosos formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos a una proteína en particular. Por ejemplo, los inmunoensayos en fase sólida ELISA se utilizan de manera rutinaria para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos de inmunoensayos y condiciones que pueden utilizarse para determinar una inmunorreactividad específica.

45 [0024] Para la comparación secuencial, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación secuencial, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias, en caso de que sea necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo secuencial. El algoritmo de comparación secuencial calcula a continuación el porcentaje de identidad de secuencia para la (s) secuencia (s) de prueba respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa designados.

55 [0025] El alineamiento correcto de las secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de homología de alineamiento de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase, normalmente, Ausubel et al., *supra*).

60 [0026] Otro ejemplo de algoritmo útil para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 410 (1990). El software para llevar a cabo los análisis mediante BLAST está disponible al público a través del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo incluye, en primer lugar, la identificación por pares de alta puntuación (HSPs) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia

consultada, que coincide o cumple una puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en la secuencia de la base de datos. T se refiere a la puntuación umbral de la palabra vecina (Altschul et al., supra). Esta coincidencia inicial de palabras vecinas actúa como una semilla para iniciar las búsquedas para encontrar HSPs más largas que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde la puntuación de alineamiento acumulada pueda incrementarse. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos que se corresponde; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos que no se corresponden; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las coincidencias de palabra en cada dirección se paran cuando la puntuación acumulada de alineamiento disminuye en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un valor de corte de 100, M= 5, N= - 4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62. El programa BLASTP (utilizando secuencia de proteína para la secuencia nucleótida) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62. (véase, Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

**[0027]** Además, para calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877 (1993)). Una medición de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en la comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferiblemente menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01, y más preferiblemente aún menor de aproximadamente 0,001.

**[0028]** Para el fin de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan como sigue: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (los restos influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen intercambiar un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase.

**[0029]** Los agentes terapéuticos de la invención típicamente están sustancialmente puros de contaminantes no deseados. Esto significa que un agente es típicamente al menos aproximadamente el 50% p/p (peso/peso) puro, así como está sustancialmente sin proteínas y contaminantes que interfieran. En ocasiones los agentes son al menos aproximadamente 80% p/p y más preferentemente al menos 90 o aproximadamente 95% p/p puros. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, pueden obtenerse péptidos homogéneos de al menos 99% p/p puros.

**[0030]** El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se utiliza para incluir anticuerpos intactos u fragmentos de unión de los mismos. Normalmente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que derivan para la unión específica a un fragmento antígeno incluyendo cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras Fab, Fab' F (ab')<sub>2</sub>, Fabc y Fv. Los fragmentos se producen mediante técnicas de ADN recombinante o mediante separación química o enzimática de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye una o más cadenas de inmunoglobulina que se conjugan químicamente a, o se expresen como, proteínas de fusión con otras proteínas. El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos biespecíficos. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas / ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante numerosos métodos, incluyendo la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos de Fab'. Véanse, por ejemplo, Songvilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315 - 321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547 - 1553 (1992).

**[0031]** El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra junto a un antígeno aumenta la respuesta inmune del antígeno, pero que cuando se administra solo no genera respuesta inmune alguna en el antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmune mediante diversos mecanismos incluyendo el reclutamiento de linfocitos, la estimulación de células B y / o T y la estimulación de macrófagos.

**[0032]** El término "paciente" incluye sujetos humanos u otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

**[0033]** La competición entre anticuerpo se determina mediante un ensayo en el que la inmunoglobulina de ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, como la alfa - sinucleína. Se

conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo de fase sólida directo o indirecto (RIA), ensayo inmunoenzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición en sándwich (véase Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9: 242 – 253 (1983)); EIA directo en fase sólida con biotina – avidina (véase Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)); ensayo directo en fase sólida marcado, ensayo directo en fase sólida en sándwich marcado (véase Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA directo en fase sólida usando un marcaje de 1 – 125 (véase Morel et al., *Molec. Immunol.* 25(1): 7 - 15 (1988)); EIA directo en fase sólida con biotina - avidina (Cheung et al., *Virology* 176: 546 - 552 (1990)); y RIA directo marcado (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32: 77 - 82 (1990)). Normalmente, como un ensayo implica el uso de antígenos purificados unidos a una superficie sólida o células que la tengan, a una inmunoglobulina de ensayo no marcada y a una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide mediante la determinación de la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Habitualmente, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competición (anticuerpo competidor) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo del anticuerpo de referencia y los anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente lo suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia. Habitualmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, este inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en, al menos, el 50 o el 75 %.

**[0034]** Las coordenadas del epítipo son aproximadas ( $\pm 2$  aminoácidos). No es necesaria la presencia de ningún aminoácido en un epítipo para dar lugar a la unión.

**[0035]** Las composiciones o métodos “que comprenden” uno o más de los elementos citados pueden incluir otros elementos que no se citan específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende un péptido alfa – sinucleína incluye tanto el péptido alfa – sinucleína aislado como el péptido alfa – sinucleína y un componente con secuencia polipeptídica mayor.

**[0036]** A menos que el contexto indique lo contrario, cada realización, elemento, paso o característica de la invención puede emplearse junto a cualquier otro.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### I. General

**[0037]** La divulgación se argumenta en parte en la identificación de nuevos fragmentos de alfa – sinucleína en pacientes con Demencia con Cuerpos de Lewy (DCL) y modelos animales transgénicos de la misma. Estas enfermedades se caracterizan por agregaciones de alfa – sinucleína. Los fragmentos tienen un extremo C – terminal truncado respecto a la alfa – sinucleína completa. Algunos fragmentos se caracterizan por tener un peso molecular de aproximadamente 12 kDa (correspondiente a SN1 – 119), 12,5 kDa (correspondiente a SN1 – 122), 13,5 kDa (cuyo fragmento se encuentra exclusivamente en pacientes con DCL) y 15 kDa (probablemente correspondiente a SN1 – 133 o SN1 – 135) tal y como se determinó mediante la electroforesis en gel SDS en tampón de tricina y por la truncación de, al menos, diez aminoácidos contiguos del extremo C – terminal de la alfa – sinucleína natural. El sitio de clivaje tiene lugar, preferiblemente, después del residuo 115 y antes de residuo 136 de la alfa – sinucleína humana natural. Los sitios de clivaje preferentes se encuentran entre los residuos 115 y 116, 119 y 120, entre los residuos 122 y 123, entre los residuos 132 y 133 y entre los residuos 135 y 136. La identificación de estos nuevos fragmentos de alfa – sinucleína tiene numerosas aplicaciones en, por ejemplo, descubrimiento de fármacos, diagnósticos, terapéuticos y animales transgénicos.

**[0038]** La divulgación se basa, además, en parte, en el resultado de que la fosforilación de sinucleína separa más las partículas (fracciones enriquecidas en cuerpos de Lewy) relacionadas con la fracción citosólica soluble en pacientes con una sinucleinopatía que las relacionadas con los controles. La fosforilación tiene lugar en la posición 129 de la alfa – sinucleína. Aunque no se requiere el conocimiento del mecanismo para la práctica de la divulgación, se propone que la fosforilación de alfa – sinucleína conduce al procesamiento subsecuente de formas truncadas (es decir, clivajes entre los residuos 132 y 133 y entre los residuos 135 y 136) y la agregación de alfa – sinucleína. La divulgación muestra, además, que las pequeñas cantidades de alfa – sinucleína en fracciones solubles de pacientes con una sinucleinopatía se ubiquitinan en los residuos de lisina 6, 10, 12, 21, 23, 32 y 34. La ubiquitinación se conoce por desempeñar un papel en la degradación de proteínas (véase, por ejemplo, Ciechanover, *EMBO J.* 17, 7151 - 7160 (1998)). La ubiquitinación también vuelve la alfa – sinucleína propensa a agregarse y cambia su vía intracelular de proteosomas a lisosomas. Por tanto, la ubiquitinación puede tanto incrementar la degradación de alfa – sinucleína como favorecer su agregación. La modulación de la ubiquitinación puede, además, ser útil en el tratamiento de una sinucleinopatía.

**[0039]** La divulgación presenta varios métodos de agentes de cribado por su actividad apropiada en el tratamiento de DCLs. Algunos métodos identifican agentes que inhiben la reacción de clivaje que genera los nuevos fragmentos de la divulgación. Otro método identifica agentes que inhiben la agregación de los productos de reacción de clivaje. Dichos inhibidores son prácticos en el tratamiento de las DCLs. Los inhibidores de la reacción de clivaje también son útiles por la afinidad de purificación de la proteasa responsable de la reacción de clivaje.

**[0040]** La divulgación también presenta modelos y células animales transgénicos que expresan fragmentos de alfa – sinucleína como los descritos anteriormente. Los modelos y células animales transgénicos se disponen para desarrollar características de la demencia con cuerpos de Lewy, incluyendo cuerpos de Lewy que contienen agregaciones de los fragmentos. Los modelos y células animales pueden utilizarse en los métodos de cribado anteriormente descritos.

**[0041]** La divulgación presenta, además, anticuerpos específicos de extremos que se unen específicamente a fragmentos de alfa – sinucleína sin unirse específicamente a la alfa – sinucleína intacta *per se*. Estos anticuerpos son útiles en la imagen funcional *in vivo* de agregaciones de alfa – sinucleína y también en métodos de tratamiento. Los nuevos fragmentos de alfa – sinucleína pueden utilizarse también en métodos de tratamiento, opcionalmente, junto a un adyuvante.

II. Fragmentos de alfa – sinucleína

**[0042]** La alfa – sinucleína humana es un péptido de 140 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia aminoácida:

**MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH**  
**GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL**  
**GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEP**  
**(SEC ID N<sup>o</sup> 1)**

(Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 11282 - 6).; Número de acceso GenBank: P37840). La proteína tiene tres dominios reconocidos, un dominio de repetición KTKE que cubre los aminoácidos 1 – 61, un dominio NAC (componente no amiloide) que tiene lugar en los aminoácidos 60 – 95 y un dominio ácido C – terminal que tiene lugar en los aminoácidos 98 a 140.

**[0043]** Algunos fragmentos nuevos de la divulgación tienen truncaciones C – terminal de, al menos, diez aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos, 15 aminoácidos contiguos y, opcionalmente, de hasta 20, 22, 23 o 25 aminoácidos. Los fragmentos incluyen todos o sustancialmente todos (es decir, al menos 100 residuos contiguos de alfa – sinucleína diferentes de la delección). Algunos fragmentos también tiene truncaciones relativamente cortas en el extremo N – Terminal de hasta 20 aminoácidos, como las delecciones de los residuos 1 – 4, 1 – 6, 1 – 10 y 1 – 12. Algunos fragmentos tiene delecciones en el extremo N – Terminal de los residuos 1 – 23, 1 – 38 o 1 – 45. Los fragmentos preferidos son SN1 - 115, SN1 - 116, 1 - 117, SN1 - 118, SN1 - 119, SN1 - 120, SN1 - 121, SN1 - 122, SN1 - 123, SN1 - 124, SN1 - 125, SN1 – 126, SN1 - 127, SN1 - 128, SN 1 - 129 y SN1 – 130. Son particularmente preferibles los fragmentos SN1 - 115, SN1 - 119, SN1 - 120, SN1 – 121, SN1 - 122, SN1 - 123, SN 1 - 124 y SN 1 – 125. Son especialmente preferibles los fragmentos SN1 - 115, SN1 - 119, SN1 - 122 SN1 – 133 y SN1 – 135. La reacción de clivaje tiene lugar, preferiblemente, en un enlace péptido entre los residuos aminoácidos 115 y 116, o 118 y 136, por ejemplo, particularmente entre el residuo 119 y 120 o entre los residuos 122 y 123 o 133 y 134 o entre los residuos 135 y 136.

**[0044]** Los fragmentos del extremo C – terminal resultados del clivaje también se incluyen en la divulgación y pueden emplearse en los métodos descritos a continuación. Estos fragmentos incluyen SN116 - 140, SN117 - 140, SN118 - 140, SN119 - 140, SN119 – 140, SN120 - 140, SN121 - 140, SN122 - 140, SN123 - 140, SN124 - 140, SN125 - 140, SN126 - 140, SN1 – 127 - 140, SN128 – 140, SN129 - 140, SN 130 - 140 y SN131 – 140. Los fragmentos preferibles son SN116 - 140, SN120 - 140, SN123 - 140, SN 134 – 140 y SN136 – 140.

**[0045]** Otros fragmentos de la divulgación incluyen fragmentos del extremo N – terminal de alfa – sinucleína de 6 a 7 kDa (como los determinados por electroforesis SDS) o de 50 – 80 aminoácidos. Otros fragmentos de la divulgación incluyen fragmentos del extremo N – terminal de alfa – sinucleína que están libres de aminoácidos 1 -10 del extremo C – terminal de alfa – sinucleína intacta, es decir, SN 1 – X, donde X es 130 – 139. Algunos fragmentos se caracterizan porque tienen uniones específicas a anticuerpos ELADW43 (sin extremo N – terminal) y 5C12 (111 – 118) y carecen de unión específica a 8A5 (sin extremo C – terminal). Algunos fragmentos se caracterizan por la unión específica a ELADW43 (sin extremo N – terminal) y 5C12 (111 – 118), LB509 (115 – 122) y ELADW47 (118 – 123) y 8A5 (sin extremo C – terminal) y carece de unión específica a ELADW43 (sin extremo N – terminal).

**[0046]** Algunos fragmentos o la alfa – sinucleína completa se fosforilan en la posición 125 o 129 o se nitrán en el residuo de tirosina que ocupa la posición 125 de la alfa – sinucleína. Los fragmentos que contienen el aminoácido serina 125 o alfa – sinucleína completa también pueden fosforilarse en esta posición. La detección de fosforilación o nitración mejorada en la posición 125 o la fosforilación en la posición 129 en un paciente respecto a la media de una población de individuos sin enfermedad es un indicador de una demencia con cuerpos de Lewy. La detección puede llevarse a cabo utilizando un anticuerpo específico para la alfa – sinucleína fosforilada o nitrada en la posición 125.



Un nivel se considera mejorado si la desviación estándar es superior a la media más uno en una población de individuos sin enfermedad.

5 **[0047]** La divulgación también presenta péptidos aislados de hasta cinco o diez residuos contiguos de alfa – sinucleína con, al menos, uno de los sitios de ubiquitinación anteriormente mencionados. Estos péptidos pueden emplearse para competir con los sitios en la alfa – sinucleína completa para la ubiquitinación o como inmunógenos para generar anticuerpo que bloquean la ubiquitinación de la alfa – sinucleína completa.

10 **[0048]** Los fragmentos de la divulgación son diferentes del componente no amiloide (NAC) de la enfermedad de Alzheimer citados anteriormente. Este fragmento consiste en, al menos, 28 residuos aminoácidos (residuos 60 – 87) y, opcionalmente, 35 residuos aminoácidos (residuos 61 – 95). Véase et al., *Biochemistry*, 34: 10139 - 10145; Jensen et al., *Biochem. J.* 310 (Pt 1): 91 - 94 (1995); Número de acceso GenBank S56746.

15 **[0049]** A menos que el contexto indique lo contrario, la referencia a la alfa – sinucleína o a sus fragmentos incluye la secuencia aminoácida humana natural indicada anteriormente, o fragmentos de la misma, así como análogos que incluyen variantes alélicas, de especies e inducidas (por ejemplo, E83Q, A90V, A76T). A los aminoácidos de análogos se asignan los mismos números que a los aminoácidos correspondientes en la secuencia humana natural cuando la secuencia análoga y humana se alinean al máximo. Los análogos difieren, normalmente, de los péptidos naturales en una, en dos o en pocas posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservativas. Algunas variantes alélicas naturales se asocian genéticamente con la DCL asociada. El término “variante alélica” se emplea para referirse a variaciones entre genes o individuos diferentes de la misma especie y las variaciones correspondientes en las proteínas codificadas por los genes. Las variantes alélicas incluyen E46K, A30P y A53T (la primera letra indica el aminoácido en la SEC ID N° 1, el número es la posición codónica en la SEC ID N° 1 y la segunda letra es el aminoácido en la variante alélica). Los análogos pueden incluir cualquier combinación de variantes alélicas. La variación A53T se asocia con niveles aumentados de fosforilación en la posición 129 de alfa – sinucleína en un individuo con la mutación respecto a la norma de fosforilación en individuos sin enfermedad que carecen de la mutación. Los análogos muestran una identidad de secuencia de, al menos, el 80 o 90 % con péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de los aminoácidos N o C – Terminal en una, en dos o en pocas posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido glutámico puede reemplazarse con ácido iso – aspártico. Algunos ejemplos de aminoácidos no naturales son los aminoácidos D, alfa, alfa – disustituido, aminoácidos N – alquilo, ácido láctico, 4 – hidroxiprolina, gamma – carboxiglutamato, epsilon – N, N, N – trimetilisina, epsilon – N – acetilisina, O – fosfoserina, N – acetil serina, N – formilmetionina, 3 – metilhistidina, 5 – hidroxilisina, omega – N – metilarginina, beta – alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma – amino butírico, homoserina, citrulina y ácido isoaspártico. Los análogos, normalmente, se unen específicamente a una población de anticuerpos policlonales generada contra la alfa – sinucleína humana natural, y cada extremo de un análogo de un fragmento específico de una alfa – sinucleína humana natural también se une específicamente a un anticuerpo monoclonal que es específico del extremo del respectivo extremo del fragmento natural. La divulgación también presenta péptidos – D, cuyos aminoácidos D pueden sustituirse por los correspondientes aminoácidos L naturales de alfa – sinucleína en la mayoría o todas las posiciones. Un fragmento designado en la forma Snx – y se refiere a un fragmento de alfa – sinucleína que comienza en el aminoácido X y termina en el aminoácido Y, y contiene cada aminoácido entre X e Y. Este fragmento puede (pero no necesita) unirse a un polipéptido heterólogo pero no a otros aminoácidos de alfa – sinucleína humana de manera que el fragmento comience antes de X o termine después de Y. Los residuos en un fragmento se enumeran según la SEC ID N° 1, donde el fragmento se alinea al máximo con la SEC ID N° 1 como se describe anteriormente utilizando parámetros por defecto.

50 **[0050]** La alfa – sinucleína, sus fragmentos y análogos pueden sintetizarse mediante síntesis de péptidos en fase sólida o mediante expresión recombinante, o pueden obtenerse de fuentes naturales. Los sintetizadores automáticos de péptidos se encuentran disponibles comercialmente en numerosos proveedores, como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede realizarse en bacterias, como en *E. coli*, levaduras, células de insecto o células de mamíferos. Los procedimientos para la expresión recombinante se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C. S. H. P. Press, NY, 2ª Ed. 1989).

### 55 III. Demencias con cuerpos de Lewy

**[0051]** La demencias con cuerpos de Lewy (DCLs) se caracterizan por la degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deficiencia cognitiva y formación de cuerpos de Lewy (CLs). (McKeith et al., *Clinical and pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the CDLB International Workshop*, *Neurology* (1996) 47: 1113 – 24). Los cuerpos de Lewy son depósitos esféricos de proteína que se encuentran en las células nerviosas. Su presencia en el cerebro afecta a la función normal del mismo, interrumpiendo la acción de los mensajeros químicos, incluyen la acetilcolina y la dopamina. Las demencias con cuerpos de Lewy incluyen la enfermedad de Parkinson (incluyendo la enfermedad de Parkinson (EP) idiopática), la demencia con cuerpos de Lewy difusos (DCLD), también conocida como demencia con cuerpos de Lewy. La enfermedad combinada de Alzheimer (EA) y Parkinson y la atrofia multisistémica (AMS). La DCLD comparte síntomas tanto con la enfermedad de Alzheimer como con la enfermedad de Parkinson. La DCLD se diferencia de la enfermedad de Parkinson, principalmente, por la localización de los cuerpos de Lewy. Otras demencias con cuerpos

de Lewy incluyen fallo autonómico puro, disfagia con cuerpos de Lewy, DCL incidental, DCL heredada (por ejemplo mutaciones del gen de la alfa – sinucleína, PARK3 y PARK4) y atrofia multisistémica (por ejemplo atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome de Shy – Drager).

#### 5 IV. Células y animales transgénicos

[0052] La divulgación presenta animales transgénicos que tienen un genoma que comprende un transgén con un segmento de ácido nucleico que codifica una forma truncada de C – Terminal de alfa – sinucleína descrito anteriormente. El transgén está, preferiblemente, presente en todas, o sustancialmente en todas, las células somáticas y germinales del animal transgénico. El segmento de ácido nucleico que codifica la forma truncada de C – terminal de alfa – sinucleína se une operablemente a uno o más segmentos reguladores que permiten que la forma truncada de alfa – sinucleína se exprese en células neuronales del animal. Pueden utilizarse promotores como el promotor de enolasa específica de la neurona de rata, el promotor de beta – actina humana, el promotor de la cadena del factor de crecimiento B derivado de plaquetas humanas (PDGF – B), el promotor del canal de sodio de rata, el promotor de la proteína básica de mielina de ratón, el promotor de la superóxido dismutasa cobre y zinc humano y el promotor regulador del dominio POU de mamíferos. El promotor PDGF es particularmente apropiado. Opcionalmente, se utiliza un promotor inducible. También es apropiado el promotor de metalotionina de ratón, que puede regularse añadiendo metales pesados como zinc al agua o a la dieta del ratón. Estos animales transgénicos pueden producirse mediante los mismos enfoques generales descritos en (Masliah et al., Am. J. Pathol. (1996) 148: 201 - 10 y Feany et al., Nature (2000) 404: 394 – 8)) para animales transgénicos con alfa – sinucleína completa o en la patente US 5.811.633 (para animales transgénicos con una forma mutante de APP). Opcionalmente, los animales transgénicos que portan un transgén que expresa una proteína truncada de alfa – sinucleína pueden cruzarse con otros modelos transgénicos de enfermedad neurogénica, como modelos con la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, los animales transgénicos que portan un transgén que expresa una proteína truncada de alfa – sinucleína pueden cruzarse con animales transgénicos que portan un transgén APP expresado con una mutación FAD como se describe, por ejemplo, en Games et al., Nature 373, 523 (1995) McConlogue et al., US 5,612,486, Hsiao et al., Science 274, 99 (1996); Staufenberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13287 - 13292 (1997); Sturchler - Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13287 - 13292 (1997); Borchelt et al., Neuron 19, 939 - 945 (1997)). El procedimiento para llevar a cabo este cruce se describe por ejemplo, en Masliah et al., PNAS USA 98: 12245 - 12250 (2001), que describe un cruce entre ratones transgénicos que expresan alfa – sinucleína completa con ratones PDAPP como los descritos por Games et al. Los animales transgénicos son, preferiblemente, roedores, como ratones o ratas, o insectos, como *Drosophila*. Los animales transgénicos pueden producirse mediante la introducción de un transgén en la fase germinal, en cuyo caso todas, o sustancialmente todas (excepto para las pérdidas raras de mutación somática), las células del animal transgénico incluyen el transgén integrado en el genoma. Los transgenes pueden introducirse por microinyección, transferencia nuclear o infección viral en células o animales. Los lentivirus son particularmente adecuados para esta última. De manera alternativa, los transgenes pueden introducirse mediante infección viral en el cerebro del animal. Estos transgenes no forman parte de las células germinales de los animales receptores, pero pueden dirigirse a regiones del cerebro responsables de la enfermedad (por ejemplo, la sustancia negra). Estos modelos animales incorporan un alfa – sinucleína en el genoma de células cerebrales y se disponen para desarrollar al menos una característica de una sinucleinopatía. Los lentivirus son un vehículo apropiado para introducir un transgén de alfa – sinucleína en el cerebro (véase Brain Pathology 13, 364 - 372 (2003); Bjorklund, Trends Neurosci. 26, 386 – 92 (2003), Lotharius et al., J. Biol. Chem. 277, 38884 - 94 (2002), Zhou et al., Brain Research 866, 33 - 43 (2000)).

45 [0053] La expresión de formas truncadas de alfa – sinucleína en modelos animales origina animales dispuestos a desarrollar al menos una característica de una demencia con cuerpos de Lewy. Estas características incluyen el aumento de los niveles de depósitos intracelulares de alfa – sinucleína, aumento de la formación de cuerpos de Lewy, y funciones motoras y cognitivas disminuidas respecto a los animales no transgénicos normales de la misma especie. Estos animales transgénicos son útiles para analizar agentes por su actividad farmacológica en el tratamiento de la demencia con cuerpos de Lewy.

[0054] La divulgación también presenta células transformadas con alfa – sinucleína truncada, que forma cuerpos de inclusión con alfa – sinucleína truncada agregada. Las células transformadas son, preferiblemente, células neuronales, como las células neuronales GT1 – 7 (Hsue et al. Am. J. Pathol. 157:401-410 (2000)), las células PC12 o las células de neuroblastoma SY5Y. También pueden utilizarse células PEAK. Las células son, preferiblemente, células humanas. Se transfecta a las células un vector que comprende un segmento que codifica una forma truncada de alfa – sinucleína unida operablemente a una o más secuencias reguladoras que aseguran la expresión de la expresión truncada. Las células transfectadas pueden emplearse para analizar agentes por su actividad eliminando las inclusiones de alfa – sinucleína.

#### 60 V. Métodos de cribado

[0055] La divulgación presenta varios métodos de cribado para identificar agentes que tienen una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL. Los métodos incluyen análisis que pueden llevarse a cabo *in vitro*, en células o animales transgénicos, y que prueban numerosos parámetros como indicadores de actividad. Los agentes que tienen actividad en estos análisis pueden volverse a probar en análisis secundarios de modelos animales de

DCL o en ensayos clínicos para determinar la actividad contra síntomas conductuales u otros síntomas de estas enfermedades.

### 1. In vitro

**[0056]** Pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* para probar la capacidad de un agente para inhibir la agregación de formas truncadas de alfa – sinucleína, particularmente SN1 – 115, SN1 – 119, SN1 – 122, SN1 – 133 y SN1 – 135. El formato base para analizar la agregación *in vivo* de alfa – sinucleína, aunque únicamente en el contexto de la alfa – sinucleína completa, se describe en (Wood, J. Biol. Chem. 274, 19509 - 19512 (1999)). Los fragmentos truncados pueden fosforilarse para llevar a cabo el ensayo. El ensayo también puede llevarse a cabo con alfa – sinucleína completa fosforilada. La fosforilación es, preferiblemente, en la posición 129. La sinucleína puede fosforilarse *in vitro* utilizando una serina quinasa. En los métodos presentes, el ensayo se lleva a cabo en presencia de un agente que está siendo probando. La velocidad o la extensión de agregación de alfa – sinucleína en presencia de un agente se determina y compara con la velocidad o extensión de alfa – sinucleína en un control contemporáneo o histórico en el que se omitió el agente. Una reducción de la velocidad o la extensión de agregación en presencia del agente respecto al control indica que el agente tiene actividad inhibiendo la agregación de formas truncadas de alfa – sinucleína. Esta actividad es potencialmente útil en el tratamiento o la prevención de las demencias con cuerpos de Lewy.

### 2. Ensayos celulares

**[0057]** Algunos ensayos celulares se llevan a cabo en células transfectadas con ácidos nucleicos que codifican formas truncadas de alfa – sinucleína como se describe anteriormente (particularmente SN1 - 115, SN1 - 119, SN1 - 122, SN1 - 133 y SN1 – 135), opcionalmente, con una variación hereditaria, como Ala30Pro o Ala53Thr. Las células pueden portar también mutaciones en otros genes asociados con la enfermedad de Parkinson, como una quinasa de repetición rica en leucina PARK8. Estas células están en contacto con un agente de ensayo, y se mide la velocidad o la extensión de agregación de la alfa – sinucleína. La velocidad o extensión de agregación de la alfa – sinucleína se compara a continuación a la de las células de control transfectadas de manera similar en ausencia del agente. La agregación puede controlarse mediante análisis inmunohistoquímicos, microscopios óptico, sedimentación o mediante análisis en gel. El análisis en gel puede detectar la formación de dímeros, trímeros u oligómeros más grandes, así como la incapacidad de la sinucleína para entrar en los geles debido a los altos niveles de oligomerización. Una reducción en la velocidad o extensión de agregación en la presencia del agente de ensayo respecto al control indica que el agente tiene actividad farmacológica inhibiendo la agregación de formas truncadas de alfa – sinucleína. Esta actividad es potencialmente útil en el tratamiento o la prevención de demencias con cuerpos Lewy.

**[0058]** Otros ensayos celulares se llevan a cabo en células transfectadas con ácidos nucleicos que codifican alfa – sinucleína completa, opcionalmente con una variación hereditaria, como Ala30Pro o Ala53Thr. Las células también pueden tener mutaciones en otros genes asociados con la enfermedad de Parkinson, como quinasa de repetición rica en leucina, PARK8. Pueden llevarse a cabo también ensayos similares en células que expresan naturalmente alfa – sinucleína. Dichas células se ponen en contacto con un agente en condiciones de ensayo y se miden la velocidad o extensión de formación de formas truncadas de alfa – sinucleína y / o las formas fosforiladas o nitradas de la sinucleína. La presencia de estas formas puede detectarse mediante Western blot utilizando uno o más anticuerpos en alfa – sinucleína. Los anticuerpos específicos de extremos (es decir, anticuerpos que se unen a una forma truncada sin unirse a la alfa – sinucleína completa) son particularmente útiles para este análisis. También pueden utilizarse colecciones de anticuerpos con diferentes especificidades de epítomos. Por ejemplo, puede mostrarse la presencia de formas truncadas de alfa – sinucleína mediante la presencia de bandas cuando se inmunotransfieren con anticuerpos que reconocen un epítomo N – terminal de un segmento aminoácido definido aproximadamente por los aminoácidos 115 – 125 o 118 – 135 (particularmente SN1 - 115, SN1 - 119, SN1 - 122, SN1 - 133 y SN1 – 135) de alfa – sinucleína intacta, y que carece de bandas cuando se inmunotransfieren con un anticuerpo que reconoce un epítomo C – terminal de esta región. La velocidad o extensión de formación de formas truncadas de alfa – sinucleína y / o de formas fosforiladas o nitradas en presencia del agente se compara con las células de control en ausencia del agente. Una reducción en la velocidad o la extensión de formación de formas truncadas de alfa – sinucleína en presencia del agente de ensayo respecto al control indica que el agente tiene una actividad que inhibe el procesamiento de alfa – sinucleína en sus formas truncadas. Esta actividad es útil para tratar o prevenir la DCL.

### 3. Ensayos en animales transgénicos

**[0059]** Los animales transgénicos tienen un transgén que expresa una forma truncada de alfa – sinucleína como la descrita anteriormente (particularmente SN1 - 115, SN1 - 119, SN1 - 122, SN1 - 133 o SN1 – 135), opcionalmente, con una variación hereditaria, como Ala30Pro o Ala53Thr. Los animales transgénicos pueden portar también mutaciones en otros genes asociados con la enfermedad de Parkinson, como una quinasa de repetición rica en leucina PARK8. Este animal se pone en contacto con un agente de ensayo y la velocidad y extensión de agregación de la forma truncada de alfa – sinucleína se mide en comparación a la de un control contemporáneo o histórico. El control es, normalmente, un animal transgénico similar de la misma especie que no ha sido expuesto al agente. La

agregación de alfa – sinucleína en un animal transgénico puede analizarse por Western blot o inmunohistoquímica como se describe en los ejemplos. De manera alternativa o adicional, la actividad del agente en estos animales transgénicos puede determinarse a partir de características conductuales, como características motoras o cognitivas, como se describe en los Ejemplos. En estos ensayos, la actividad del agente se muestra a partir de las características motoras o cognitivas mejoradas (es decir, deficiencia disminuida de tales características) respecto a un animal transgénico de control comparable no expuesto al agente.

**[0060]** Se llevan a cabo otros ensayos en animales transgénicos con un transgén que expresa una forma completa de alfa – sinucleína, opcionalmente con una variación hereditaria, como Ala30Pro o Ala53Thr o mutaciones en otros genes asociados con la enfermedad de Parkinson, como una quinasa de repetición rica en leucina PARK8. Pueden llevarse a cabo ensayos similares en animales no transgénicos que expresan alfa - sinucleína endógena. Estos animales se ponen en contacto con un agente de ensayo, y se detecta la velocidad o extensión de la apariencia de formas truncadas de alfa – sinucleína (particularmente SN1 - 115, SN1 - 119, SN1 - 122, SN1 - 133 y SN1 – 135), opcionalmente, con una variación hereditaria, como Ala30Pro o Ala53Thr. Estas formas pueden detectarse utilizando Western blot o análisis de inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos antialfa – sinucleína apropiados (como se describe para los ensayos celulares). La velocidad o extensión de la apariencia de formas truncadas de alfa – sinucleína y / o de las formas fosforiladas o nitradas se compara con la velocidad o extensión de apariencia de dichas formas en un control contemporáneo o histórico que constituye un animal transgénico que no ha sido expuesto al agente. Una reducción en la velocidad o la extensión de la apariencia de las formas truncadas de alfa – sinucleína en el animal expuesto al agente de ensayo respecto al control indica que el agente tiene actividad inhibiendo el procesamiento de alfa – sinucleína completa en formas truncadas.

#### 4. Agentes que se van a cribar

**[0061]** Los agentes que se van a cribar incluyen anticuerpos de alfa - sinucleína, péptidos de alfa – sinucleína, fármacos conocidos o sospechosos de tener actividad en el tratamiento de la DCL, productos naturales y bibliotecas combinatorias. Los péptidos preferidos de alfa – sinucleína son péptidos relativamente cortos de 30, 25, 20, 10, 5 o menos aminoácidos incluyendo los aminoácidos 114 – 117, 117 – 126, 118 - 125, 117 - 120, 120 - 124, 130 - 136, 132 - 138, 131 - 135, 132 - 134, 133 - 137, 134 – 136 de alfa – sinucleína. Opcionalmente, un aminoácido inmediatamente en el extremo N – terminal del sitio de clivaje que genera formas truncadas de C – terminal de alfa – sinucleína se reemplaza con un aminoácido análogo de estado de transición que forma un enlace no hidrolizable entre los dos aminoácidos que flanquean el sitio de clivaje, por ejemplo, entre los residuos 115 – 116, 119 - 120, 122 - 123, 133 - 134 y 135 – 136 de alfa – sinucleína. Algunos ejemplos de análogos son análogos de estado de transición que son estatina, hidroxieteleno, hidroxietelamina, AHPPA, ACHPA y derivados de los mismos. También pueden sustituirse uno o más aminoácidos de una secuencia de alfa – sinucleína natural con otros aminoácidos naturales.

**[0062]** Los productos naturales que se van a cribar también pueden obtenerse del *National Cancer Institute's Natural Product Repository*, Bethesda, MD. También pueden cribarse bibliotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos para su idoneidad. Las bibliotecas combinatorias pueden producirse para muchos tipos de compuestos que pueden sintetizarse en un diseño paso a paso. Estos compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de giros beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiacepinas, glicinas oligoméricas sustituidas en N y oligocarbamatos. Las bibliotecas combinatorias grandes de los compuestos pueden construirse a partir del método de bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) descrito en Affymax, WO 95/ 12608, Affymax, WO 93/ 06121, Columbia University, WO 94/ 08051, Pharmacopeia, WO 95/ 35503 y Scripps, WO 95/ 30642. Las bibliotecas de péptidos también pueden generarse mediante métodos de expresión en fago. Véase, por ejemplo, Devlin, WO 91/ 18980. Las bibliotecas combinatorias pueden cribarse inicialmente por su idoneidad determinando su capacidad para unirse a la alfa – sinucleína.

#### IV. Ensayos de toxicidad

**[0063]** Pueden utilizarse estrategias análogas a las descritas en los ensayos de cribado para determinar si los fármacos, alimentos, toxinas ambientales y otros compuestos existentes ejercen efectos tóxicos por la promoción del procesamiento, la fosforilación o agregación de alfa – sinucleína. Estos ensayos se llevan a cabo de la misma manera que los ensayos de cribado. La actividad tóxica se indica por el resultado opuesto a la actividad farmacológica en los ensayos de cribado.

#### VII. Aislamiento de proteasa

**[0064]** El procesamiento de alfa – sinucleína completa en las formas truncadas de la divulgación se efectúan por una proteasa. La proteasa puede purificarse utilizando un inhibidor identificado por los métodos de cribado mencionados anteriormente. Un inhibidor preferente es un péptido de alfa – sinucleína de, por ejemplo, hasta 20 aminoácidos contiguos a la SEC ID N°: incluyendo los residuos 114 – 117, 111 – 126, 113 - 126, 113 - 119, 117 - 121 o 120 - 125, o 130 - 136, 132 - 138, 131 - 135, 133 - 134, 133 - 137, o 135 – 136, en los que un residuo N – Terminal del sitio de clivaje (por ejemplo, entre los residuos 115 - 116, 119 - 120, 122 - 123, 133 - 134 y 135 – 136) se han reemplazado por un análogo de estado de transición. Este inhibidor se utiliza como un reactivo de

purificación por afinidad para purificar la proteasa a partir de extractos de células cerebrales. Estas células pueden obtenerse de un cadáver de un individuo normal o de uno que ha padecido una DCL. Los niveles de proteasa puede elevarse en este último. La proteasa puede evaluarse presentándola con un sustrato de alfa – sinucleína y controlando la formación de productos de clivaje. Los anticuerpos específicos de extremos descritos anteriormente son prácticos para la detección de los productos de clivaje. El sustrato puede ser, por ejemplo, la forma humana natural de alfa – sinucleína descrita anteriormente, un fragmento de la misma con residuos que flanquean ambos lados del sitio de clivaje o una forma mutante de esta en la que la mutación se asocia con una forma hereditaria de la DCL. Opcionalmente, el extremo C – Terminal del sustrato puede inmovilizarse en la fase sólida, y el extremo N – terminal en un marcador. El clivaje del sustrato libera el marcaje en la fase líquida. La fase líquida puede separarse fácilmente a partir de la fase sólida, y la cantidad de marcaje cuantificado como medida de la actividad proteolítica.

#### VIII. Anticuerpos específicos de extremos

**[0065]** La invención presenta anticuerpos específicos de extremos. Estos anticuerpos se unen específicamente a la forma truncada de alfa – sinucleína (en el extremo C – terminal), sin unirse específicamente a la alfa – sinucleína completa. Estos anticuerpos son útiles para la imagen funcional *in vivo* de los depósitos de alfa – sinucleína, como agentes terapéuticos (véase a continuación), y para detectar los productos de clivaje resultantes del clivaje proteolítico de alfa – sinucleína en los métodos de cribado descritos anteriormente. Los anticuerpos específicos de extremos también se describen en sus fragmentos C – terminal correspondientes, por ejemplo, 116 - 140, 117 - 140, 118 - 140, 119 - 140, 120 - 140, 121 - 140, 122 - 140, 123 - 140, 124 - 140, 125 - 140, 126 - 140, 134 - 140 y 136 - 140. Los fragmentos preferibles son 116 - 140, 120 - 140, 123 - 140, 134 - 140 y 136 - 140. Los anticuerpos específicos de extremos reconocen los extremos N – terminal de estos fragmentos de que manera que se unen específicamente al fragmento sin unirse específicamente a la alfa – sinucleína completa.

**[0066]** Los anticuerpos específicos de extremos preferibles son ELADW – 101 (policlonal) y 12C6 (monoclonal) específicos para los extremos C – terminal de SN1 – 119 y ELADW – 105 (policlonal) y 7G8 (monoclonal) específicos para los extremos C – terminal de SN1 – 122. Los monoclonales son monoclonales de ratón expresados por los hibridomas producidos mediante métodos convencionales.

**[0067]** Estos anticuerpos pueden generarse inmunizando un animal de laboratorio con alfa – sinucleína o un fragmento del mismo para inducir a los anticuerpos y cribar los anticuerpos resultantes para identificar los que tienen la especificidad de unión deseada. Opcionalmente, la inmunización puede llevarse a cabo con péptidos relativamente cortos de menos de 20 aminoácidos, normalmente 7 u 8 aminoácidos que incluyen el extremo C – terminal de los fragmentos truncados de la divulgación (por ejemplo, SN 99 - 118, SN106 - 115, SN 110 - 119, SN – 113 - 122, SN126 - 133, SN128 – 135). Opcionalmente, estos péptidos cortos se unen a un portador que ayuda a obtener la respuesta inmune. Por ejemplo, el péptido CGGDMPVD (SEC ID N° 10) que corresponde a los aminoácidos SN 115 – 119 con un enlace CGG es útil para generar anticuerpos como ELADW – 101 y 12C6, y el péptido CGGVDPDN (SEC ID N° 10) que corresponde a los aminoácidos 118 – 122 con un enlace CGG es útil para generar anticuerpos ELADW – 105 y 7G8.

**[0068]** Opcionalmente, la unión específica a un fragmento truncado marcado o inmovilizado puede llevarse a cabo junto a alfa – sinucleína completa no marcada. Opcionalmente, las bibliotecas de anticuerpos grandes pueden analizarse simultáneamente utilizando la técnica de expresión en fago.

**[0069]** La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplos de muridos, cobayas, primates, conejos o ratas pueden llevarse a cabo como se describe en Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988). Es preferible el adyuvante de Freund completo seguido de un adyuvante incompleto para la inmunización de animales de laboratorio. Los conejos o cobayas se emplean normalmente para crear anticuerpos policlonales. Los ratones se emplean normalmente para crear anticuerpos monoclonales. La unión puede realizarse, por ejemplo, por Western blot o ELISA. El fragmento más pequeño que muestra unión específica al anticuerpo define el epítipo del anticuerpo. De manera alternativa, la especificidad del epítipo puede determinarse mediante un ensayo de competición en el que un anticuerpo de ensayo y de referencia compitan por la unión a alfa – sinucleína. Si los anticuerpos de ensayo y de referencia compiten, a continuación se unen al mismo epítipo o epítopos lo suficientemente próximos que la unión de un anticuerpo interfiere en la unión del otro.

**[0070]** Los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen especificidad y afinidad similares o iguales a las de ratón o a la de otro anticuerpo no humano que proporciona el material de inicio para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos cuyas cadenas ligeras y pesadas se han construido, normalmente, mediante ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina pertenecientes a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón puede unirse a segmentos constantes (C) humanos, como la IgG1 y IgG4. El isotipo humano IgG1 es preferible. En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana. Los anticuerpos de IgM también pueden emplearse en algunos métodos. Un anticuerpo quimérico típicos es, por tanto, una proteína híbrida consistente en el dominio V o de unión a antígenos del anticuerpo de un ratón y en el dominio C o efector de un anticuerpo humano.

**[0071]** Los anticuerpos humanizados tienen residuos del marco de región variable sustancialmente de un anticuerpo humano (denominado anticuerpo receptor) y complementariedad determinando regiones sustancialmente de un anticuerpo murino, (denominado inmunoglobulina donante). Véanse Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029 - 10033 (1989), WO 90/ 07861, US 5,693,762, US 5,693,761, US 5,585,089, US 5,530,101, y Winter, US 5,225,539. La (s) región (es) constante (s), si se encuentran presentes, también son sustancial o completamente de inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos se eligen, normalmente, de anticuerpos humanos cuyas estructuras de secuencias muestran un alto grado de identidad de secuencia con los dominios de la región variable murina de la que derivan los CDRs. Los residuos de la región marco variable de cadena pesada y ligera pueden derivar de secuencias de anticuerpos humanos iguales o diferentes. La secuencia de anticuerpos humanos pueden ser secuencias de anticuerpos humanos naturales o pueden ser conjuntos de secuencias de diferentes anticuerpos humanos. Véase Carter et al., WO 92/ 22653. Algunos aminoácidos de los residuos de la estructura de la región variable humana se seleccionan para la sustitución en base a su posible influencia en la conformación y / unión de CDR al antígeno. La investigación de estas posibles influencias se lleva a cabo diseñando, examinando las características de los aminoácidos en localizaciones particulares u observando empíricamente los efectos de la sustitución o la mutagénesis de aminoácidos particulares.

**[0072]** Los anticuerpos humanos con la alfa – sinucleína se proporcionan mediante numerosas técnicas descritas a continuación. Algunos anticuerpos humanos se seleccionan de experimentos de unión competitiva o, de otra manera, para tener la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo particular de ratón. Las técnicas para producir anticuerpos humanos incluyen la metodología del trioma de Oestberg et al., Hybridoma 2: 361 - 367 (1983); Oestberg, US Patent No. 4,634,664; y Engleman et al., US Patent 4,634,666 sobre el uso de mamíferos no humanos transgénicos con transgenes que codifican, al menos, un segmento del locus de la inmunoglobulina humana como se describe en, por ejemplo, Lonberg et al., WO93/ 1222, US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, Nature 148, 1547 - 1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/ 10741 y los métodos de expresión en fago del fago, véanse, por ejemplo, Dower et al., WO 91/ 17271 y McCafferty et al., WO 92/ 01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743 y US 5,565,332.

**[0073]** Las regiones variables de la cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos pueden unirse a, al menos, una parte de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea el complemento dependiente del anticuerpo y / o la toxicidad mediada celular. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de complemento y los isotipos IgG2 e IgG4 no. La elección del isotipo también puede afectar el paso del anticuerpo al cerebro. Es preferible el isotipo humano IgG1. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros con dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras como Fab, Fab' F (ab')<sub>2</sub>, y Fv o como anticuerpos monocatenarios en los que los dominios variables de cadena ligera y pesada están unidos mediante un separador.

**[0074]** En otra divulgación, los anticuerpos monoclonales se unen específicamente a un epítipo en los residuos 109 – 120 o 115 – 122 de alfa – sinucleína, o también se proporciona un epítipo discontinuo en los residuos 43 – 51 y 58 – 65 o uno específico del extremo de C – terminal de alfa – sinucleína, incluyendo formas humanizadas quiméricas y humanas de los mismos. Un anticuerpo específico de extremo de C – terminal de alfa – sinucleína puede reconocerse por la capacidad para unirse específicamente a alfa – sinucleína como una proteína libre sin unirse específicamente a alfa – sinucleína como un componente de una proteína de fusión cuando el extremo C – terminal de alfa – sinucleína se une a un segundo péptido. Estos anticuerpos pueden cribarse por su actividad terapéutica, y si se obtienen resultados positivos, pueden emplearse en métodos terapéuticos. Los anticuerpos también pueden emplearse detectando fragmentos de alfa – sinucleína como los descritos anteriormente.

IX. Diagnósticos

**[0075]** La invención presenta métodos de imagen funcional de CLs *in vivo* en un paciente como se define en las reivindicaciones. Estos métodos son útiles para diagnosticar o confirmar un diagnóstico de una demencia con cuerpos de Lewy o EP o la susceptibilidad a estas. Por ejemplo, los métodos pueden emplearse en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene CLs, es probable que el paciente padezca una demencia con cuerpos de Lewy. Los métodos también pueden emplearse en pacientes sin síntomas. La presencia de depósitos amiloides anormales indica susceptibilidad a una enfermedad sintomática futura. Los métodos también son útiles para controlar la progresión de la enfermedad y / o la respuesta al tratamiento en pacientes que han sido anteriormente diagnosticados con una demencia con cuerpos de Lewy.

**[0076]** Los métodos funcionan administrando un anticuerpo específico de extremos como se describe anteriormente que se une a la alfa – sinucleína en el paciente y, a continuación, detectando el anticuerpo tras su unión. Si se desea, puede evitarse una respuesta de eliminación utilizando fragmentos de anticuerpos que carecen de una región constante completa, como Fabs. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir tanto como reactivo de diagnóstico como de tratamiento.

**[0077]** El escaneado de diagnóstico también puede llevarse a cabo utilizando un anticuerpo específico para la alfa

– sinucleína fosforilada, como el monoclonal 11A5 (específico de fósforo) o 5C12 (se une a formas fosforiladas y no fosforiladas de alfa – sinucleína) descritos en la solicitud en trámite 10 / 984, 192. La presencia de alfa – sinucleína fosforilada asociada a depósitos de alfa – sinucleína es un indicador de una sinucleinopatía o de susceptibilidad a esta. La presencia de alfa – sinucleína ubiquitinada también es un indicador de enfermedad. Esto puede detectarse utilizando un ensayo de dos pasos en el que la alfa - sinucleína se precipita con un primer anticuerpo de alfa – sinucleína, y se detecta la cantidad de alfa – sinucleína ubiquitinada utilizando un anticuerpo de ubiquitina.

**[0078]** Los reactivos de diagnóstico pueden administrarse por inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro mediante inyección intracraneal o taladrando el cráneo. La dosis de reactivo debería estar en el mismo rango que los métodos de tratamiento. Normalmente, el reactivo se marca, aunque en algunos métodos, el reactivo primario con afinidad a la alfa – sinucleína no se marca y se utiliza un agente con marcaje secundario para unirse al reactivo primario. La elección del marcador depende de los medios de detección. Por ejemplo, un marcador fluorescente es apropiado para la detección óptica. El uso de marcadores paramagnéticos es apropiado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Los marcadores radioactivos pueden detectarse igualmente utilizando PET o SPECT.

**[0079]** El diagnóstico se lleva a cabo comparando el número, tamaño y / o intensidad de los loci marcados a los valores de referencia correspondientes. Los valores de referencia pueden representar los niveles medios en una población de individuos sin enfermedad. Los valores de referencia pueden representar igualmente niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de referencia pueden determinarse en un paciente antes de comenzar el tratamiento y compararse después con los valores medidos. Una disminución en los valores respecto a la referencia indica una respuesta positiva al tratamiento.

**[0080]** Los anticuerpos específicos de extremos también son útiles para determinar si las formas truncadas de alfa – sinucleína están presentes en el líquido cefalorraquídeo o en otros fluidos o tejidos corporales. La presencia de estas formas en niveles significativamente diferentes, normalmente superiores, (es decir, superior o inferior a la media más uno de la desviación estándar) en un paciente respecto al nivel normal en una población de individuos sin enfermedad es indicativa de la presencia o susceptibilidad de una DCL.

#### X. Métodos de tratamiento

**[0081]** La divulgación presenta diversos métodos para prevenir o tratar la demencia con cuerpos de Lewy en pacientes que padecen o tienen riesgo de padecer dicha enfermedad. Los agentes terapéuticos incluyen la forma truncada de alfa – sinucleína descrita anteriormente, y anticuerpos específicos de extremos como los descritos anteriormente. Opcionalmente, los fragmentos se fosforilan particularmente en la posición 129. Otros agentes descritos incluyen alfa – sinucleína fosforilada completa, preferiblemente en la posición 129, agentes que inhiben la fosforilación de alfa - sinucleína, o que favorecen la eliminación de alfa – sinucleína fosforilada por ubiquitinación o similar, o que favorece o inhibe la ubiquitinación. Los enfoques generales para administrar los agentes a pacientes que padecen o tienen riesgo de padecer DCL se describen en las solicitudes en trámite USSN 60/ 423,012 presentada el 1 de noviembre del 2002, y PCT US00/ 15239 presentada el 1 de junio del 2000, y PCT/ US03/ 34527, presentada el 31 de octubre del 2003.

**[0082]** Los pacientes dispuestos para el tratamiento incluyen individuos en riesgo de padecer una DCL pero que no muestran síntomas, así como pacientes que sí muestran síntomas. Además, los presentes métodos pueden administrarse profilácticamente a individuos que tienen riesgo genético conocido de padecer una DCL. Estos individuos incluyen aquellos con familiares que han sufrido la enfermedad, y aquellos que tienen riesgo de sufrirla según han determinado análisis genéticos o marcadores bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo de la EP incluyen mutaciones en la alfa – sinucleína o en los genes Parkin, UCHLI y CYP2D6; particularmente mutaciones en las posiciones 30 y 53 del gen de la alfa – sinucleína. Los individuos que ya padecían la enfermedad de Parkinson pueden reconocerse por sus manifestaciones clínicas, incluyendo temblor en reposo, rigidez muscular, bradiquinesia e inestabilidad postural.

**[0083]** En algunos métodos, el paciente no tiene síntomas clínicos o factores de riesgos de enfermedad amiloidogénica diferente de la caracterizada por los cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el paciente no tiene síntomas clínicos o factores de riesgo de enfermedad caracterizada por depósitos amiloideos extracelulares. En algunos métodos, el paciente no tiene enfermedad caracterizada por depósitos amiloideos de péptido Aβ. En algunos métodos, el paciente no tiene síntomas clínicos ni factor de riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer. En algunos métodos, el paciente padece enfermedad de Alzheimer concurrente y una enfermedad caracterizada por los cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el paciente tiene las enfermedades de Alzheimer y Parkinson concurrentes.

**[0084]** En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo 10, 20, 30). Normalmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que al paciente alcanza los 40, 50, 60 o 70 años. El tratamiento conlleva, normalmente, múltiples dosis durante un período de tiempo. El tratamiento puede controlarse mediante anticuerpo de ensayo o respuestas de células T o células B activadas a un agente terapéutico (por ejemplo, una forma truncada de un péptido alfa – sinucleína) en el tiempo. Si la respuesta desciende, es recomendable una dosis de refuerzo.

5 **[0085]** En aplicaciones profilácticas, las composiciones o medicamentos farmacéuticos se administran a un paciente susceptible de, o en riesgo de una DCL en un régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición o medicamento suficiente para eliminar o reducir el riesgo, reducir la severidad o retrasar el comienzo de la enfermedad, incluyendo síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y / o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios presentes durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones o tratamientos a un paciente susceptible de padecer, que ya padece dicha enfermedad, en un régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición suficientes para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (fisiológicos, bioquímicos, histológicos y / o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios presentes durante el desarrollo de la enfermedad. Una cantidad adecuada para conseguir un tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis efectiva terapéutica o profilácticamente. Una combinación de cantidad y frecuencia de dosis adecuada para conseguir un tratamiento terapéutico o profiláctico se define como un régimen efectivo terapéutica o profilácticamente. En ambos regímenes profiláctico y terapéutico, los agentes se administran normalmente en varias dosis hasta que se alcanza la respuesta inmune suficiente. Normalmente, la respuesta inmune se controla y se administran dosis repetidas si la respuesta inmune comienza a decaer.

20 **[0086]** En algunos métodos, la administración de un agente da como resultado la reducción de los niveles intracelulares de la alfa – sinucleína agregada. En algunos métodos, la administración de los agentes da como resultado una reducción en los niveles de las formas truncadas en C – terminal de la alfa – sinucleína. En algunos métodos, la administración de un agente da como resultado una mejora de un síntoma clínico de una DCL, tales como la función motora o la función cognitiva en el caso de la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la reducción en los niveles intracelulares de la alfa – sinucleína agregada o la mejora en un síntoma clínico de la enfermedad se controla a intervalos tras la administración de un agente.

30 **[0087]** Las dosis eficaces de las composiciones de la presente divulgación para el tratamiento de las condiciones descritas anteriormente varían dependiendo de diversos factores, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros tratamientos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un ser humano, aunque también pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento deben valorarse para mejorar la seguridad y la eficacia.

35 **[0088]** En algunos métodos, el agente es un fragmento truncado de alfa – sinucleína o un fragmento capaz de inducir anticuerpos en la alfa – sinucleína. La cantidad de dicho fragmento depende de si se administra también adyuvante con elevadas dosificaciones requeridas en ausencia del adyuvante. La cantidad de un fragmento para la administración a veces varía entre 1 – 500 µg por paciente y más habitualmente entre 5 – 500 µg por inyección para la administración en humanos. Ocasionalmente, se utiliza una dosis elevada de 1 – 2 mg por inyección. Se utiliza generalmente para cada inyección en humanos 10, 20, 50 o 100 µg. La masa del fragmento también depende del índice de masa del epítipo inmunogénico en el fragmento para la masa del fragmento como un todo. Se utilizan entre  $10^3$  a  $10^5$  micromoles de epítipo inmunogénico por microgramo de fragmento. El periodo de inyecciones puede variar significativamente desde una vez al día, a una vez al año o a una vez cada diez años. En cualquier día que se proporcione la dosificación del inmunógeno, la dosificación es mayor a 1 µg / paciente y normalmente mayor a 10 µg / paciente si se administra también el adyuvante, y mayor a 10 µg / paciente y generalmente mayor a 100 µg / paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo en intervalos de tiempo, como intervalos de 6 semanas. Otro régimen consiste en una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen implica una inyección cada dos meses de por vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser de base irregular como se indicó en el control de la respuesta inmune.

50 **[0089]** Los fragmentos truncados de alfa – sinucleína pueden asimismo administrarse en forma de ácidos nucleicos que codifican los fragmentos operablemente unidos a uno o más elementos reguladores para asegurar la expresión del fragmento truncado de alfa – sinucleína. Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican los inmunógenos oscilan entre 10 ng y 1 g, 100 ng y 100 mg, 1 µg y 10 mg, o 30 – 300 µg de ADN por paciente. Las dosis para los vectores virales infecciosos oscilan entre 10 – 100, o más, viriones por dosis.

60 **[0090]** Algunos métodos implican la inmunización pasiva con un anticuerpo específico del extremo. En dichos métodos, la dosificación oscila entre 0,0001 y 100 mg / Kg, y más generalmente entre 0,01 y 5 mg / Kg del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg / Kg de peso corporal o 10 mg / Kg de peso corporal u oscilan entre 1 – 10 mg / Kg o, en otras palabras, 70 mg o 700 mg, u oscilan entre 70 – 700 mg, respectivamente, para un paciente de 70 Kg. Un ejemplo del régimen de tratamiento implica la administración una vez cada dos semanas, o una vez al mes, o una vez cada 3 – 6 meses. En algunos métodos, se administran de manera simultánea dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los rangos indicados. El anticuerpo se administra generalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis únicas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos pueden también ser irregulares tal y como se indicó midiendo los niveles de sangre de un



anticuerpo en la alfa – sinucleína en un paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpos plasmáticos de 1 – 1000 µg / ml y en algunos métodos de 25 – 300 µg / ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran una vida media más larga, seguidos por los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja en intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, se requiere a veces una dosificación relativamente elevada en intervalos relativamente cortos hasta que se reduzca o termine la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de ahí, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

**[0091]** Los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal, o intramuscular para el tratamiento profiláctico y / o terapéutico. La vía de administración más común de un agente inmunogénico es la vía subcutánea, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza normalmente en los músculos del brazo o de las piernas. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo la inyección intracraneal. Para la administración de un anticuerpo se prefiere la inyección intramuscular o la infusión intravenosa. En algunos métodos, se inyectan directamente en el cráneo anticuerpos terapéuticos particulares. En algunos métodos, los anticuerpos se administran como composiciones o dispositivos de liberación sostenida, como un dispositivo Medipad™. Las moléculas pequeñas que actúan mediante la inhibición del procesamiento de la proteasa de la alfa – sinucleína pueden administrarse de forma intravenosa si las moléculas pequeñas pasan a través de la barrera hematoencefálica para la eficacia terapéutica o profiláctica, o directamente de otra manera en el cráneo.

**[0092]** Los agentes de la divulgación pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son parcialmente al menos eficaces en el tratamiento de la DCL. Los agentes de la divulgación pueden además administrarse en conjunto con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la divulgación a través de la barrera hematoencefálica.

**[0093]** Los agentes inmunogénicos se administran a veces en combinación con un adyuvante. Pueden utilizarse diversos adyuvantes en combinación con un péptido, como la alfa – sinucleína, para inducir una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca en un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecta a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, 3 monofosforil lípido A Des - O – acilado (MPL™) (véase el documento GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa)). Stimulon™ QS – 21 es un triterpeno glucósido o saponina aislados de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina que se encuentra en América del Sur (véanse Kensil et al., in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); y la Patente U. S. Nº. 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tales como monofosforil lípido A (véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86 - 91 (1997)), polímeros plurónicos, y micobacterias asesinas. Otro adyuvante es CpG (documento WO 98 / 40100).

**[0094]** Alternativamente, la alfa – sinucleína puede acoplarse a un adyuvante. Sin embargo, dicho acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación de la alfa – sinucleína para afectar la naturaleza de la respuesta inmune de la misma. Los adyuvantes pueden ser administrados como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden ser administrados por separado, antes de, concurrentemente con, o después de la administración del agente terapéutico.

**[0095]** Una clase preferida de adyuvantes son sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes pueden utilizarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3 – DMP, QS – 21, aminoácidos poliméricos o monoméricos como el ácido poliglútamico o polilisina. Otra clase de adyuvantes son las formulaciones de emulsión de aceite en agua. Dichos adyuvantes pueden utilizarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (por ejemplo, N – acetilmuramil – L – treonil – D – isoglutamina (thr – MDP), N – acetil – normuramil – L – alanil – D – isoglutamina (nor – MDP), N – acetilmuramil – L – alanil – D – isoglutamil – L – alanina – 2 – (1' - 2' dipalmitoil – sn – glicero – 3 – hidroxil – fosforiloxil) – etilamina (MTP – PE), N – acetilglucosaminil – N – acetilmuramil – L – Al – D – isoglu – L – Ala – dipalmitoxil propilamida (DTP – DPP) teramida TM), u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90 / 14837), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,4 %, Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP – PE) formulados en partículas más pequeñas que una micra utilizando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110 Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, de Tween 80 0,4 %, polímero L121 plurónico bloqueado al 5 %, y thr – MPD, bien microfluidizados en una emulsión submicrométrica o agitados en un vórtex para generar una emulsión de tamaño de

partícula mayor, y (c) sistema coadyuvante Rib<sup>TM</sup> (RAS), (Rib<sup>TM</sup> Inmunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 %, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo formado por monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox<sup>TM</sup>).

**[0096]** Otra clase de adyuvantes preferidos son los adyuvantes de saponina, tales como Stimulon<sup>TM</sup> (Qs – 21, Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas de los mismos tal como ISCOMs (complejos inmunoestimuladores) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen RC – 529, GM – CSF, adyuvante completo de Freund (ACF) y adyuvante incompleto de Freund (AIF). Otros adyuvantes incluyen citoquinas, tales como interleucinas (*por ejemplo*, IL – 1, IL – 2, IL – 4, IL – 6, IL – 12, IL – 13, e IL – 15), factor estimulante de colonia de macrófagos (M – CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM – CSF), y factor de necrosis tumoral (FNT). Otra clase de adyuvantes son los análogos de glicolípidos que incluyen N – glicosilamidas, N – glicosilureas y N – glicosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en un residuo de azúcar por un aminoácido, como inmunomoduladores o adyuvantes (véase la Patente U. S. N° 4.855.283). Las proteínas de choque térmico, *por ejemplo*, HSP70 y HSP90, pueden utilizarse también como adyuvantes.

**[0097]** Puede administrarse un adyuvante con un fragmento de alfa – sinucleína como una única composición, o puede administrarse antes de, simultáneamente con, o después de la administración del fragmento de alfa – sinucleína. El fragmento de alfa – sinucleína y el adyuvante pueden envasarse y suministrarse en el mismo vial o pueden envasarse en viales por separado y mezclarse antes de su utilización. El fragmento y el adyuvante de la alfa – sinucleína se envasan con una etiqueta indicando la aplicación terapéutica prevista. Si el fragmento y el adyuvante de la alfa – sinucleína se envasan por separado, el envase incluye instrucciones para la mezcla antes de su utilización. La elección de un adyuvante y / o portador depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el plan de dosificación, la eficacia del adyuvante para las especies que están siendo vacunadas, y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es aquel que ha sido aprobado o está siendo aprobado para la administración en humanos por los organismos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para la administración en humanos. Se prefiere alumbre, MPL y QS – 21. Opcionalmente, pueden utilizarse de forma simultánea dos o más adyuvantes. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS – 21, MPL o RC – 529 con GM – CSF, y alumbre, QS – 21 y MPL juntos. Asimismo, puede utilizarse adyuvante incompleto de Freund (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173 - 186 (1998)), de manera opcional en combinación con cualquier alumbre, QS – 21, MPL y combinaciones de los mismos.

**[0098]** Los agentes de la divulgación se administran a menudo como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, *es decir*, diversos componentes farmacéuticamente aceptables. Véase *Remington's Pharmaceutical Science* (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). La forma preferida depende del modo de administración y aplicación terapéutica prevista. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, que se definen como vehículos utilizados comúnmente para formular composiciones farmacéuticas para la administración en humanos o animales. El diluyente se selecciona para no afectar la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina tamponada fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o la formulación farmacéutica puede incluir también otros portadores, adyuvantes, estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

**[0099]** Las composiciones farmacéuticas pueden también incluir macromoléculas grandes metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (Sephacosa (TM) funcionalizada con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas). Además, estos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (*es decir*, adyuvantes).

**[0100]** Para la administración por vía parenteral, los agentes de la divulgación pueden administrarse como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril como aceites en agua, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, surfactantes, sustancias tamponadas de pH y similares pueden presentarse en las composiciones. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son aquellas con origen del petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, glicoles tales como el propilenglicol o el polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para las soluciones inyectables. Los anticuerpos pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante, que pueden formularse de tal manera que permita la liberación sostenida del ingrediente activo. Una composición ejemplar comprende un anticuerpo monoclonal de 5 mg / mL, formulada en un tampón acuso que consiste en 50 mM de L – histidina, 150 mM de NaCl, ajustado a un pH 6,0 con HCl. Las composiciones para la administración por vía parenteral son sustancialmente estériles, sustancialmente isotónicas y fabricadas en condiciones GMP de la FDA u organismos similares.

**[0101]** Generalmente, las composiciones son preparadas como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de que se pueda preparar la inyección. La preparación puede además emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como, polilactida, poliglicólido o copolímero para potenciar el efecto del adyuvante, tal y como se ha discutido anteriormente (véanse Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97 - 119 (1997). Los agentes pueden ser administrados en forma de inyección de depósito o preparación de implante que pueden formularse de manera que permita la liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo.

**[0102]** Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen las vías oral, intranasal, las formulaciones pulmonares, supositorios, y las aplicaciones transdérmicas. Para los supositorios, los aglutinantes y los portadores incluyen, por ejemplo, glicoles de polialquileño o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en un intervalo entre 0,5 % y 10 %, preferiblemente 1 % - 2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como los grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estereato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato magnésico. Estas composiciones se presentan en forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen un 10 % - 95 % del ingrediente activo, preferiblemente un 25 % - 70 %.

**[0103]** La aplicación tópica puede dar lugar a la entrega transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse mediante la co - administración del agente con una toxina del cólera o derivados destoxificados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1998)). La coadministración puede lograrse mediante la utilización de los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas por reticulación química o expresión como una proteína de fusión. Alternativamente, la entrega transdérmica puede lograrse utilizando una vía cutánea o utilizando transferosomas (Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25, 3521 - 24 (1995); Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201 - 15 (1998)).

#### Ejemplos

##### 1. Detección de las formas truncadas de la alfa – sinucleína en un animal transgénico

**[0104]** Los ratones transgénicos que tienen un ácido nucleico que codifica la alfa – sinucleína intacta operablemente unida al promotor PDGF se analizaron con 6 semanas, 3 meses y 12 meses. Los animales fueron sacrificados y se agrupó la corteza y el tejido del hipocampo de cuatro ratones (2 machos / 2 hembras). El tejido se homogeneizó en TBS (250 mM de NaCl), y se centrifugó a 150.000 x g durante 15 minutos. El pellet se extrajo después con un 1 % de Tritón – X 100 durante 30 minutos a 4 grados y se centrifugó como antes. El pellet resultante se extrajo a continuación con un 1 % de SDS durante 30 minutos a 25 grados y se centrifugó como antes. Finalmente, el pellet se extrajo con urea 8 M / 1 % de SDS. Este procedimiento dio lugar a cuatro extractos que se referirán a continuación en la descripción como extractos Tris, Tritón, SDS y urea.

**[0105]** Las Figuras 1A y 1B muestran un Western blot de extractos a partir de un ratón transgénico y un control emparejado con un anticuerpo ELADW – 47. Este anticuerpo es un anticuerpo policlonal que se une a un epítipo en SN115 – 122 (aunque no necesariamente requiere cada aminoácido para que se produzca alguna unión). El anticuerpo se une preferentemente a la forma humana de la alfa – sinucleína aunque también se une en menor medida a la forma del ratón. Las Figuras 1A y 1B muestran una banda de alfa – sinucleína de 14 kDa tanto para el ratón de control como para el ratón transgénico. La banda es más potente para el ratón transgénico que para el ratón de control. Para los diferentes extractos, la banda es más intensa en el extracto Tritón. Este extracto solubiliza la membrana unida a la alfa – sinucleína y posiblemente las inclusiones de tipo con cuerpos de Lewy. El Tris y particularmente las extracciones Tritón del ratón transgénico (aunque no el de control) muestran una banda de 12 kDa en un tampón de tricina. Esto es una forma truncada de alfa – sinucleína. El peso molecular de la banda corresponde a una longitud de 115 – 120 aminoácidos.

**[0106]** La Figura 2 muestra un Western blot con el mismo anticuerpo que las Figuras 1A y 1B para comparar el nivel de la forma truncada de la alfa – sinucleína en ratones de 3 y 12 meses. La figura muestra que la forma truncada aparece con más fuerza en ratones de 3 meses. De nuevo, la banda truncada no aparece en los ratones de control. La aparición más intensa de la forma temprana truncada de la alfa – sinucleína en el desarrollo de ratones transgénicos indica que la forma truncada de la alfa – sinucleína desempeña un papel en la patogénesis de la demencia con cuerpos de Lewy.

**[0107]** Las Figuras 3A y B muestran un Western blot con un anticuerpo diferente denominado 12C1 (se une al epítipo en los aminoácidos 43 – 51, 58 – 65, y en el anticuerpo monoclonal IgG1k). Este anticuerpo se une de igual forma a las formas de ratón y humanas de la alfa – sinucleína en un epítipo que incluye los aminoácidos 43 – 51 y 58 – 65. La Figura 3 muestra la banda truncada de 12 kDa en el extracto Tritón de ratones transgénicos. La misma banda aparece más débilmente en el extracto Tritón de los ratones de control. Por lo tanto, el procesamiento de la alfa – sinucleína para una forma truncada se produce tanto en ratones transgénicos como en ratones normales, aunque es más fuerte en este último. El mayor alcance del procesamiento en ratones transgénicos puede deberse al procesamiento directamente de la alfa – sinucleína humana, o puede deberse a la presencia de la alfa – sinucleína que se dirige a la alfa – sinucleína por una vía utilizada en menor medida en ratones no transgénicos.

**[0108]** La Figura 4 muestra además un Western blot que utiliza el mismo anticuerpo que la Figura 3. Este gel muestra dos bandas adicionales de pesos moleculares de 6 o 7 kDa. La banda de 7 kDa aparece más fuertemente en los ratones transgénicos que en los ratones de control. La banda de 6 kDa aparece sólo en el ratón transgénico, y luego sólo en la muestra de 3 meses. Las bandas de 6 o 7 kDa son indicativas de fragmentos N – terminal más cortos de la alfa – sinucleína de 50 – 80 aminoácidos.

**[0109]** Las Figuras 5A, B, C, D, y E muestran Western blots con cuatro anticuerpos diferentes y mapas del epítipo de los sitios de unión de los anticuerpos. ELADW – 44 es un anticuerpo policlonal que se une sólo a la forma humana de la alfa – sinucleína (*es decir*, no en la forma de ratón). Se une al epítipo en los aminoácidos 103 – 105. ELADW – 47 es un anticuerpo policlonal que se une preferentemente a la forma humana aunque también se une a la forma de ratón. Se une a un epítipo en los aminoácidos 115 – 122. ELADW – 48 es un anticuerpo policlonal que se une de igual forma a las formas de ratón y humanas. Se une a un epítipo en los aminoácidos 131 y 140. 8A5 es un anticuerpo monoclonal que se une de igual forma a las formas de ratón y humanas. Se une al C – terminal de la alfa – sinucleína. Las Figuras 5A – E muestran que de estos cuatro anticuerpos, sólo ELADW – 47 generó una banda de 12 kDa indicativa de una forma truncada de la alfa – sinucleína.

El resultado de que ELADW – 48 no originase esta banda es útil en el mapeo del sitio de clivaje. Debido a que ELADW – 47 se unió y ELADW – 48 no se unió, el sitio de clivaje está limitado por el extremo N – Terminal del epítipo ELADW – 47 y el aminoácido de C – Terminal del epítipo ELADW – 48. Además, debido a que algunos aminoácidos del epítipo ELADW – 47 deben estar presentes para permitir la unión, y del epítipo ELADW – 48 deben estar presentes para evitar la unión, el sitio de clivaje está además limitado en una región en los aminoácidos 118 – 135. Cuando estos datos se consideran con el tamaño del fragmento truncado (aproximadamente 115 – 120 aminoácidos), el sitio de clivaje probable está alrededor de los aminoácidos 118 – 121. La falta de unión por el anticuerpo 8A5 en C – terminal es consistente con este sitio de clivaje. La falta de unión del anticuerpo ELADW – 44, sin embargo, requiere más comentarios. La falta de clivaje puede explicarse si una forma truncada de la alfa – sinucleína da como resultado el clivaje que se adapta a una conformación diferente para una alfa – sinucleína intacta evitando la unión de ELADW – 44. Alternativamente, la forma truncada de la alfa – sinucleína se presenta en ratones transgénicos en mayor medida que en los ratones normales que se representan en forma de la alfa – sinucleína de ratón. En este caso, la mayor cantidad de forma truncada en ratones transgénicos se debería a la presencia de la alfa – sinucleína humana que se dirige más a la alfa – sinucleína de ratón por una vía de procesamiento que lleva a una alfa – sinucleína en relación con la situación en un ratón de control.

## 2. Detección de las formas truncadas de la alfa – sinucleína en el cerebro de un paciente con DCLD

**[0110]** Este ejemplo compara las especies de alfa – sinucleína en CL para las fracciones de proteínas de partículas y solubles restantes de un cerebro con DCLD. Los CL y la proteína soluble se prepararon a partir de la corteza de un único paciente con DCLD (véase Jensen et al., J. Biol. Chem. 275 21500 - 21507 (2000)). El tejido se homogeneizó en Tris / sacarosa (0,32 mM) / EDTA (5 mM) y en tampón con inhibidores de proteasa. El homogeneizado se centrifugó a 1.000 x g. El sobrenadante se centrifugó además a 150.000 x g. El sobrenadante de esta centrifugación se utilizó para preparar una fracción de Tris soluble de proteínas. El pellet de 1.000 x g se volvió a suspender y se utilizó para preparar una fracción con cuerpos de Lewy. Los cuerpos de Lewy se purificaron mediante inmunoprecipitación en perlas magnéticas que contienen anticuerpos antisinucleína. El precipitado se extrajo con urea 7 M / tiourea 2 M / 4 % de CHAPS. El material no extraído se volvió a extraer con urea / tiourea / CHAPS. Los extractos de este paso y la extracción anterior se agruparon y se analizaron por 2D PAGE e inmunotransferencia. El residuo no extraído se sometió a una extracción adicional con ácido fórmico al 90%. Este extracto se almacenó diluido en ácido fórmico al 9 %. El extracto se analizó por SDS PAGE y RP – HPLC. Se encontró poca o ninguna sinucleína en este último extracto, y el resultado presente se parecía al material extraído por urea / tiourea / CHAPS, lo que indica que la urea / tiourea / CHAPS proporcionó una extracción completa.

**[0111]** Las especies de sinucleína se resolvieron en geles 2D y se detectaron por Western blots. Todos los Western blots 2D se mostraron con más proteínas ácidas a la izquierda, más básicas a la derecha. Las múltiples especies de la alfa – sinucleína, incluyendo las especies fosforiladas y truncadas, se presentaron tanto en los CL como en la fracción soluble del cerebro. Los truncamientos predominantes estuvieron presentes en la región C – terminal de la alfa – sinucleína en los aminoácidos 118 – 125. Se observó un fragmento clivado adicional más grande próximo al C – terminal. No se detectó una beta o gamma – sinucleína en la preparación de CL a pesar de haberse encontrado en la fracción de proteína soluble. La alfa – sinucleína en la preparación de CL difería en que la fracción soluble tenía clivajes adicionales en C – terminal, y en general las especies de la alfa – sinucleína truncada se enriquecieron en los CL en relación con la fracción de proteína soluble. Además, las múltiples especies de la alfa – sinucleína de mayor masa molecular, de 25 – 35 kDa, se detectaron únicamente en la preparación de CL. Esto incluye especies ubiquitinadas, identificadas por nosotros y otros (Tofaris et al. J. Biol. Chem. 278 (45): 44405 - 44411, 2003). Los fragmentos truncados en C – terminal tienen el mismo tamaño que aquellos observados en el modelo de ratón transgénico del Ejemplo 1 que indica un papel en la patogénesis de la enfermedad.

**[0112]** Las Figuras 6A, B, C muestran extractos Tris hibridados con diferentes anticuerpos, sometidos a electroforesis en gel 2D y sometidos a transferencia Western. Las manchas oscuras se presentan a la izquierda de las gráficas que representan la alfa – sinucleína completa. La característica más notable son las cuatro manchas en

la gráfica Sin – 1 que están ausentes en la gráfica 8A5. Estas cuatro manchas representan formas truncadas de alfa – sinucleína incapaces de unirse al anticuerpo 8A5 debido a la falta del aminoácido de C – terminal. Estos truncamientos corresponden a las formas de SN entre 1 – 118 y 1 – 125. Se han visto en la parte inferior numerosas manchas adicionales y adyacentes a las manchas de la alfa – sinucleína completa. Las manchas en la parte inferior de las manchas completas representan truncamientos menores del C – terminal (es decir; sinucleína 1 – X, donde X es 130 – 139), ya que reaccionan con anticuerpos en S129 fosforilado pero no con 8A5. La mancha adyacente de las manchas completas, excepto la derecha, representan una delección menor del N – terminal (debido a la falta de esta mancha en la inmunotransferencia con ELADW – 43).

**[0113]** Las Figuras 7A, b, C, D muestran inmunotransferencias con anticuerpos adicionales. Las cuatro manchas están presentes con 5C12 (111 – 118). Dos de las manchas están presentes con ELADW – 47 (115 – 122) y las manchas están ausentes con LB509 8115 – 123). Las manchas pueden diferir las unas con las otras tanto en el peso molecular como en la presencia o ausencia de la modificación post – traduccional, tal como la nitración o la fosforilación. El cambio de estos fragmentos hacia un pH básico, con relación a la sinucleína completa, es consistente con la eliminación de una parte de la secuencia ácida C – terminal. Estos resultados fijan los sitios de clivaje en los aminoácidos 120 – 125 de la alfa – sinucleína. También son notables diversas manchas realizadas bajo (peso molecular inferior) o a la izquierda (pH inferior) de las manchas de sinucleína no modificada. Esto puede representar formas de sinucleína que se han sometido a una pequeña extensión del truncamiento N – terminal y / o una modificación post – traduccional diferente con respecto a las principales manchas. Tenga en cuenta que algunas manchas visualizadas por ELADW – 43 y 8A5 en las inmunotransferencias de la proteína soluble son beta – sinucleínas, particularmente la mancha prominente de la izquierda y ligeramente por encima de la alfa completa.

**[0114]** La Figura 8 resume los sitios de clivaje con relación a los epítomos unidos por anticuerpos utilizados en la transferencia Western.

**[0115]** Las Figuras 9A, B comparan las proteínas solubles de Tris con proteínas extraídas de los cuerpos de Lewy por electroforesis 2D y transferencia Western. La inmunotransferencia de Tris a la izquierda muestra cuatro manchas en un peso molecular menor que representa formas truncadas de la alfa – sinucleína (probablemente en el rango de aminoácidos 1 – 120 a 1 – 125). Estos son de intensidad relativamente baja comparados con las manchas representativas de la alfa – sinucleína completa. La inmunotransferencia de proteínas de cuerpos de Lewy muestra más manchas representativas de las formas truncadas de la alfa – sinucleína en el rango de 1 – 120 a 1 – 125. Sin embargo, estas son de mayor intensidad en relación a las manchas representativas de la alfa – sinucleína completa. Asimismo, son evidentes dos manchas que se desplazan más rápido que la alfa – sinucleína completa pero más lentas que la colección de manchas en la parte inferior de la inmunotransferencia. Estas manchas representan probablemente los truncamientos en el intervalo 1 – X, donde X es el aminoácido 130 – 139. Como se ha descrito anteriormente, estas manchas reaccionan con anticuerpos en S129 fosforilado pero no con 8A5.

**[0116]** Las Figuras 10A, B, C, y D muestran las inmunotransferencias de las proteínas de los cuerpos de Lewy hibridadas de nuevo con varios anticuerpos C – terminal. Todas las manchas aparecieron con Sin – 1 (91 – 96) y 5C12 (111 – 118). Con ELADW – 47, la mancha se realiza con una mayor velocidad y en la posición más básica en la que no se encuentran las inmunotransferencias de Sin – 1 y 5C12. En la inmunotransferencia de LB509, las manchas de 12 kDa correspondientes a aquellas de las muestras solubles de Tris desaparecen o apenas son visibles, aunque la fila de manchas justo por encima de ellas (“nivel 3”) aún reacciona. La ausencia o la intensidad reducida de algunas manchas en las inmunotransferencias ELADW – 47 y LB509 indica que estas manchas representan formas truncadas de la alfa – sinucleína y son consistentes con el clivaje que se produce entre los aminoácidos 120 y 125.

### 3. Detección de la alfa – sinucleína agregada en un animal transgénico

**[0117]** Los animales transgénicos son sacrificados y los cerebros son retirados para los análisis neuroquímico y neuropatológicos. De manera breve, el hemiserebro derecho está congelado y homogeneizado durante las determinaciones de la inmunorreactividad de la alfa – sinucleína humana agregada y no agregada por transferencia Western (Masliah et al., *Science* (2000) 287: 1265). El hemiserebro izquierdo se fija en paraformaldehído al 4 %, seccionado en serie en el vibrátomo para la inmunocitoquímica y el análisis ultraestructural.

**[0118]** Las secciones del cerebro se inmunotiñeron con un anticuerpo policlonal de conejo contra la alfa – sinucleína humana (1:500). Tras una incubación durante la noche a 4 °C, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado anticonejo seguido por el complejo de avidina D – peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:200, ABC Elite, Vector).

**[0119]** La reacción se visualizó con un 0,1 % de 3, 3, - diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) en 50 nM de Tris – HCl (pH 7,4) con 0,01 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las secciones se montaron en portaobjetos bajo Entellan. Los niveles de inmunorreactividad son semicuantitativamente evaluados por densitometría óptica utilizando Quantimet 570C. Estas secciones se estudiaron también mediante un análisis de imagen para determinar el número de inclusiones inmunorreactivas de la alfa – sinucleína y esta medida fiable de agregación de alfa – sinucleína actúa como un valioso índice de los efectos de antiagregación (Masliah et al. *Science* (2000) 287: 1265).

**[0120]** Los análisis de los patrones de la neurodegeneración se logran mediante el análisis de las densidades sinápticas y dendríticas en el hipocampo, corteza frontal, corteza temporal y ganglios basales utilizando secciones de vibrátomos de doble inmunomarcado para la sinaptofisina y la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) y se visualizaron con MCBL. Los análisis adicionales de la neurodegeneración se logran determinando la inmunorreactividad de la tirosina hidroxilasa (TH) en el caudoputamen y en la sustancia negra (SN) tal y como se ha descrito anteriormente (Masliah, *et al.* (2000)). Las secciones serán captadas con el MCBL y cada imagen individual está interactivamente evaluadas de manera que los terminales inmunorreactivos de la TH que muestran una intensidad de píxeles se incluyen en un intervalo lineal. Se ajusta una escala para determinar la relación de píxeles a  $\mu\text{m}$ . A continuación, esta información se utiliza para calcular el porcentaje del área del neuropilo cubierto por terminales inmunorreactivos de la TH. Estas mismas secciones se utilizan también para evaluar el número de neuronas TH en la SN.

#### 4. Análisis de la alfa – sinucleína en pacientes con DCL

**[0121]** Para determinar qué especies de la  $\alpha$  – sinucleína se enriquecen en, o únicamente del tejido de la enfermedad, se han examinado muestras del cerebro de los pacientes con atrofia multisistémica (AMS), y una mutación de la enfermedad de Parkinson familiar (A53T; familia Contursi). Las fracciones de partículas del cerebro con AMS y Contursi se prepararon homogeneizando el tejido cerebral en 50 mM de Tris, 140 mM de NaCl y 1 % de Tritón, respectivamente emparejados por edad, los pacientes de control (“normales”) se prepararon de forma idéntica para la enfermedad del cerebro. Las muestras se analizaron por Western blots de geles 1D y mediante ELISA tal y como se describe a continuación, también en geles 2D. Se analizó la parte de la fracción de las partículas. El resto se centrifugó. También se analizó el sobrenadante. El pellet se extrajo en urea 7 M. Se analizó el sobrenadante de esta extracción. El pellet se extrajo adicionalmente en urea 7 M / 1 % de SDS. Se analizó el sobrenadante. Se muestran en las Figuras 11 A y B, Western blots que utilizan un anticuerpo para detectar la alfa – sinucleína total o la alfa – sinucleína específicamente fosforilada en la posición 129.

**[0122]** La sinucleína se fraccionó de manera diferente a partir de la fracción de partículas del cerebro Contursi frente al cerebro de control. La mayor parte de la sinucleína en la fracción de partículas del cerebro normal era soluble tras la homogeneización en el tampón Tris – sacarosa, pero casi toda la sinucleína del cerebro Contursi requirió urea más SDS para la solubilización que sugiere una enorme cantidad de cuerpos de Lewy en este paciente. La sinucleína en el paciente Contursi fue notablemente diferente al del paciente de control en la cantidad de fosforilación de ser 129. Sólo una pequeña parte de la  $\alpha$  – sinucleína fosforilada se detectó en el paciente de control (grupos de la izquierda), mientras que el paciente Contursi (grupos de la derecha) tuvo una cantidad extremadamente grande de fosfo – sinucleína en comparación a los Western blots. Por lo tanto, la insolubilidad de la sinucleína en el cerebro Contursi se asoció a un gran incremento en la fosforilación de la sinucleína en ser 129. La  $\alpha$  – sinucleína en el paciente Contursi también difería del cerebro normal en la distribución de truncamientos de C – terminal. La  $\alpha$  – sinucleína truncada en C – terminal se observó tanto en las fracciones de partículas del cerebro normal como en la Contursi. Sin embargo, todos los truncamientos detectables eran altamente insolubles (urea / extracto de SDS) en el paciente Contursi, mientras que los del cerebro de control eran solubles (extracto tamponado Tris - sacarosa). El enriquecimiento de la sinucleína truncada en C – terminal en la fracción enriquecida con CL de un paciente Contursi obtuvo los mismos resultados que nuestro hallazgo de la sinucleína truncada en C – terminal enriquecida en CL de la DCLD. El cerebro con AMS se enriqueció también en fosfo (ser 129) -  $\alpha$  – sinucleína revelada en el truncamiento de C – terminal y se observó una abundante fosforilación y otras modificaciones ácidas en CL. Los elevados niveles de fosfo (ser 129) se observaron además en el cerebro de un paciente con DCLD en relación al control sin enfermedad.

#### 5. Identificación de las especies de sinucleína truncada del cerebro con DCLD por LC – MS / MS

**[0123]** Para generar un grupo enriquecido de  $\alpha$  – sinucleína, se purificó primero una fracción solubilizada de partículas en urea / tiourea / CHAPS de un cerebro con DCLD mediante cromatografía de intercambio de aniones. Las fracciones resultantes se analizaron por Western Blot y se separaron en grupos de crudo enriquecidos en truncadas, completas o fosfo – sinucleína. El grupo truncado se purificó además por cromatografía de afinidad (anticuerpo 5C12 conjugado en Sepharose). A continuación, las fracciones se concentraron por separado y se separaron por HPLC capilar.

**[0124]** Los tres mayores picos de una fracción (designada C6) se digirieron posteriormente con tripsina y se analizaron por LC – MS / MS para determinar la identidad y composición de la proteína presente en la muestra. El pico 1 se analizó y se identificó la  $\alpha$  – sinucleína con la cobertura de secuencia que abarca los aminoácidos 1 – 97. Puesto que la cobertura de secuencia finaliza en el C – terminal con un residuo de lisina, que es un sitio de clivaje de la tripsina, pueden presentarse péptidos adicionales aguas abajo.

**[0125]** El pico 2 de la fracción C6 se analizó y se descubrió que contenía una secuencia de  $\alpha$  – sinucleína en las posiciones 11 – 97. De nuevo, debido a que los fragmentos tripticos en los terminales N y C están ausentes; no es capaz de determinarse la composición exacta de las especies. Además, la mayoría de la proteína presente en esta

fracción no es sinucleína, sino una forma de proteína básica de la mielina que se copurifica con este grupo de sinucleína.

5 **[0126]** El análisis del pico 3 identificó dos especies diferentes de sinucleína, ambas comenzando en el aminoácido 1, con una finalizando en la posición 119D y la otra en la posición 122N. Estas dos formas truncadas se identificaron utilizando una búsqueda en la base de datos designada para detectar péptidos trípticos truncados en C – terminal. Se muestra a continuación el listado de los resultados de la búsqueda en la base de datos de los fragmentos de péptido truncados en C – terminal (Tabla 1) junto a sus respectivos cromatogramas de iones extraídos (Figuras 12 y 13) que ilustran la intensidad del precursor (no fragmentado) de las señales de iones para estos péptidos cuando se comparan con el nivel de la referencia.

Tabla 1: Resultados de la búsqueda en la base de datos para el pico 3 de la fracción C6

15	Escáner(es) de referencia	Secuencia	MH+	Carga	XCorr
#2	Alfa_sinucleína (C122)				
	2690 - 2694 (SEC ID N° 2)	DQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDN.	2710,22	2	4,53
	2344-2679 (SEC ID N° 3)	KDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDN	2838,31	3	2,38
20	#3 Alfa_sinucleína (C119)				
	2675 (SEC ID N° 4)	KDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVD.	2512,19	2	1,94

25 **[0127]** La búsqueda identificó el truncamiento 122N dos veces, encontrando dos secuencias trípticas diferentes para las especies 122N con un péptido resultado de un clivaje tríptico perdido del residuo de lisina N – terminal. También, el Xcorr, o la función de correlación cruzada, para la primera secuencia listada de la variante 122N es muy elevada. Las tres formas truncadas adicionales de SN1 – 115, SN1 – 133 y SN1 – 35 se encontraron también en los cerebros con DCLD. Los truncamientos se identificaron coincidiendo por MS / MS los espectros de la fragmentación péptida de los péptidos de  $\alpha$  – sinucleína truncada C – terminal contra un espectro teórico generado por el software de análisis de espectros TurboSequest Mass (licencia de ThermoElectron, Inc). Las dos formas se fosforilaron en ser129. Cuanto mayor sea el valor Xcorr, mayor es la seguridad en la coincidencia que presta un mayor apoyo a los datos.

35 **[0128]** Las Figuras 14 A – F muestran inmunotransferencias de geles 2D de extractos de preparaciones de cuerpos de Lewy de pacientes P48 y P52 con DCL y un paciente P2 con AMS (estrictamente hablando, la preparación de AMS contiene inclusiones corticales gliales) preparados como se ha realizado anteriormente en comparación con un control. La sonda es un anticuerpo de la alfa – sinucleína total. Los números de identificación (A / 1, U / 1, etc.) se refieren a diferentes preparaciones de cuerpos de Lewy, realizados en diferentes días y utilizados en diferentes regiones corticales. Las diferentes preparaciones de pacientes enfermos se muestran en las Figuras 14A, B, C, E y F. El control se muestra en la Figura 14D. No hay modificaciones de sinucleína que estuvieron consistentemente presentes o ausentes en la preparación de AMS comparada a aquellas con DCL, de este modo, las dos patologías se analizarán juntas. La mayoría de las preparaciones que tienen los mismos grupos de aductos se desplazan por encima del monómero de sinucleína completa aunque varía la cantidad relativa de cada grupo. La sinucleína truncada en C entre 16 y 12 kDa puede agruparse en cuatro niveles, oscilando entre la longitud completa en el primer nivel hasta el fragmento de 12 kD en el cuarto. Las cantidades relativas de los diferentes truncamientos varían. P52U / 2 y P28U / 1 no tienen nivel 3 específico en DCL detectable. P48 tiene muy poco material truncado en C; las manchas del nivel 3 son apenas visibles (aunque están presentes), y el nivel 4 no es mucho más intenso, en todo caso, que las proteínas solubles. La Figura 15B muestra los resultados de la rehibridación de una inmunotransferencia 2D de la preparación de los cuerpos de Lewy P52U / 2 con ELADW – 101. Una sonda anterior de la misma inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal Sin – 1 se muestra a la izquierda para su comparación (Figura 15A). Tres asteriscos marcan las manchas que se superponen en las dos sondas. La inmunotransferencia P28U / 1 se volvió a hibridar con idénticos resultados. El anticuerpo policlonal ELADW – 101, dirigido contra la terminación de Asp 119, reacciona específicamente con las 3 manchas más destacadas en la cuarta fila de 12 kD de las especies truncadas. Las múltiples manchas sugieren diferentes formas de SN1 – 119 que se difieren por modificaciones de carga, por ejemplo, fosforilación, de la secuencia restante.

55 **[0129]** Las secciones cerebrales corticales no flotantes de un paciente normal y con DCLD se hibridaron con un anticuerpo ELADW – 101 específico de nuevo epítipo. Los resultados se muestran en las figuras 16A y B (cerebro enfermo) y en las Figuras 17A y B (controles). Las regiones en cajas marcadas A y B se muestran aumentadas en los paneles de la derecha. Una LB y LN típicas se marcan con flechas. Se ve sólo una débil tinción sináptica en el cerebro normal. El mismo experimento se realizó con el anticuerpo 12C6 específico de nuevo epítipo. Los resultados se muestran en las Figuras 18A y B. Las regiones en caja marcadas A y B se muestran aumentadas en los paneles de la derecha. LB y LN típicas se marcan con flechas. En el panel B, una flecha indica una tinción citoplasmática granular por 12C6. Esta tinción no se ve en el cerebro normal. Estos resultados muestran que el fragmento de la alfa – sinucleína truncada de SN1 – 119 está enriquecido en pacientes con demencia con cuerpos de Lewy.

6. Análisis conductual en un animal transgénico

5 **[0130]** Para la actividad locomotora, se analizaron los ratones durante 2 días en el rodillo giratorio (San Diego Instruments, San Diego, CA), como se ha descrito previamente (Masliah, *et al.* (2000)). En el primer día, los ratones son entrenados en 5 ensayos: el primero a 10 rpm, el segundo a 20 rpm y del tercero al quinto a 40 rpm. En el segundo día, los ratones son probados en 7 ensayos a 40 rpm cada uno. Los ratones se colocan de forma individual en el cilindro y la velocidad de rotación se incrementa de 0 a 40 rpm durante 240 segundos. La duración de los ratones en el rodillo (caída de latencia) se registra y se utiliza como medida de la función motora.

10 **[0131]** Los ratones ponen a prueba la capacidad cognitiva en el laberinto de agua de Morris (Morris, *Learn Motiv.* 12; 239 - 260 (1981)). En este procedimiento, el animal se coloca en una piscina circular con agua, con una plataforma de escape sumergida bajo la superficie del agua. Se coloca un marcador visible en la plataforma de manera que el animal pueda encontrarlo dirigiéndose hacia una señal visual próxima. Alternativamente, se proporcionará a los animales una forma más compleja de la prueba en la que no hay señales formales para marcar la localización de la plataforma. En esta forma, el animal debe aprender la ubicación de la plataforma con respecto a las señales visuales distales. La duración del animal en el agua está inversamente relacionada con su capacidad cognitiva.

20 7. Análisis de fragmentos de la alfa – sinucleína agregada en una línea celular

25 **[0132]** Las células neuronales GT1 – 7 (Hsue *et al.* *Am. J. Pathol.* 157:401 - 410 (2000)) se transfectan con un vector de expresión pCR3.1 – T (Invitrogen, Carlsbad, CA) que expresa un fragmento truncado de alfa – sinucleína tal y como se ha descrito anteriormente en la alfa – sinucleína de múridos y se comparan con las células transfectadas sólo con el vector de expresión. Las células transfectadas sólo con el vector tienen una apariencia fibroblástica mientras que las células transfectadas con la alfa – sinucleína son redondeadas, con cuerpos de inclusión en la superficie celular visible a través de un microscopio de barrido de luz y confocal. Las células GT1 – 7 transfectadas pueden utilizarse para cribar agentes para la actividad en la eliminación de inclusiones de sinucleína.

30 **[0133]** La divulgación comprende al menos las siguientes realizaciones numeradas:

1. Un método de cribado para un agente que tiene una actividad farmacológica útil para el tratamiento de la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) que comprende:

35 poner en contacto el agente con una alfa – sinucleína fosforilada o un fragmento fosforilado de la misma, en el que el fragmento se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de la alfa – sinucleína intacta y una delección de 1 – 11 aminoácidos contiguos del C – terminal de la alfa – sinucleína intacta;  
determinar la velocidad o extensión de agregación de la alfa – sinucleína o fragmento de alfa – sinucleína, en el que una reducción en la velocidad o extensión de agregación respecto a un control que carece de agente, indica que el agente tiene una actividad farmacológica.

2. El método de la realización 1, en el que el agente se pone en contacto con la alfa – sinucleína intacta o con la SN1 – 133 o SN1 – 135 numeradas según la SEC ID N° 1.

- 45 3. El método de la realización 1, en el que el fragmento de alfa – sinucleína contiene una mutación asociada con la DCL hereditaria.

4. El método de la realización 3, en el que la mutación es una mutación A53T.

- 50 5. El método de la realización 1, que comprende además la realización de un ensayo en un ser humano que tiene una DCL o un modelo animal de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL.

- 55 6. Un método de cribado para un agente que tiene una actividad farmacológica útil para el tratamiento de la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) que comprende:

60 poner en contacto el agente con un fragmento de alfa – sinucleína, que es SN1 – 115, SN1 – 133 o SN1 – 135, con residuos numerados según la SEC ID N° 1;  
determinar la velocidad o extensión de agregación de la alfa – sinucleína o fragmento de alfa – sinucleína, en el que una reducción en la velocidad o extensión de agregación respecto a un control que carece de agente, indica que el agente tiene una actividad farmacológica.

7. El método de la realización 6, en el que el fragmento de alfa – sinucleína contiene una mutación asociada con la DCL hereditaria.

- 65 8. El método de la realización 37, en el que la mutación es una mutación A53T.



- 5
9. El método de la realización 6, que comprende además la realización de un ensayo en un ser humano que tiene una DCL o un modelo animal de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL.
- 10
10. Un método de cribado de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, que comprende poner en contacto un célula que expresa alfa – sinucleína, y procesa la alfa – sinucleína en un fragmento con un agente, en el que el fragmento es SN1 – 115, SN1 – 133 o SN1 – 135 numerados según la SEC ID N° 1;
- 15
11. El método de la realización 10, en el que el fragmento de alfa – sinucleína contiene una mutación asociada con una DCL hereditaria.
- 20
12. El método de la realización 11, en el que la mutación es una mutación A53T.
- 25
13. El método de la realización 10, que comprende además la realización de un ensayo en un ser humano que tiene una DCL o un modelo animal de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL.
- 30
14. El método de la realización 13, en el que la demencia con cuerpos de Lewy es la enfermedad de Parkinson o la demencia con cuerpos de Lewy difusos (DCLD).
- 35
15. Un método de cribado de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, que comprende:
- poner en contacto un animal transgénico que tiene un transgén que expresa un fragmento de alfa – sinucleína, en el que el fragmento es SN1 – 115, SN1 – 133 o SN1 – 135 numerados según la SEC ID N° 1;
- determinar un nivel de formas agregadas del fragmento en el cerebro de un animal transgénico con relación al nivel de referencia de las formas agregadas comparables a un animal transgénico en ausencia del agente, una reducción en el nivel de las formas agregadas del fragmento en relación a la referencia que indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL.
- 40
16. El método de la realización 15, en el que el fragmento de alfa – sinucleína contiene una mutación asociada con una DCL hereditaria.
- 45
17. El método de la realización 16, en el que la mutación es una mutación A53T.
18. El método de la realización 15, en el que el animal transgénico es un ratón.
19. El método de la realización 15, en el que el animal transgénico es una *Drosophila*.
- 50
20. El método de la realización 15, que comprende además la realización de un ensayo en un ser humano que tiene una DCL o un modelo animal de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL.
- 55
21. El método de la realización 20, en el que la DCL es una enfermedad de Parkinson o una DCLD.
- 60
22. Un método de cribado de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, que comprende:
- poner en contacto un animal transgénico que tiene un transgén que expresa alfa – sinucleína y procesa la alfa – sinucleína en un fragmento con un agente, en el que el fragmento es SN1 – 115, SN1 – 133 o SN1 – 135 numerados según la SEC ID N° 1;
- determinar un nivel del fragmento en una célula neuronal con relación al nivel de referencia en ausencia del agente, una reducción en el nivel de los fragmentos en relación a la referencia indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL.
- 65
23. El método de la realización 22, en el que el fragmento de alfa – sinucleína contiene una mutación asociada con una DCL hereditaria.
24. El método de la realización 23, en el que la mutación es una mutación A53T.

25. El método de la realización 22, en el que el animal transgénico es un ratón.
- 5 26. El método de la realización 22, en el que el animal transgénico es una *Drosophila*.
27. El método de la realización 22, que comprende además la realización de un ensayo en un ser humano que tiene una DCL o un modelo animal de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL.
- 10 28. El método de la realización 27, en el que la DCL es una enfermedad de Parkinson o una DCLD.
29. Un animal transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén que comprende un promotor operablemente unido a un segmento de ácido nucleico que codifica un fragmento de alfa – sinucleína, en el que el fragmento es SN1 – 115, SN1 – 133 o SN1 – 135 numerados según la SEC ID N° 1; en el que la expresión del fragmento en el animal transgénico predispone al animal a desarrollar al menos una característica de la DCL.
- 15 30. El animal transgénico de la realización 29, en el que el promotor es un promotor PDGF.
- 20 31. El animal transgénico de la realización 29, en el que al menos una característica es una deficiencia de la función motora.
32. El animal transgénico de la realización 29, en el que al menos una característica es una deficiencia de la función cognitiva.
- 25 33. El animal transgénico de la realización 29 es un ratón.
34. El animal transgénico de la realización 29 es una *Drosophila*.
- 30 35. Un método para detectar la presencia o susceptibilidad de la DCL en un paciente, que comprende detectar un nivel de un fragmento de alfa – sinucleína en un fluido corporal, en el que el fragmento es SN1 – 115, SN1 – 133 o SN1 – 135 numerados según la SEC ID N° 1; un nivel mayor que el nivel de referencia en individuos sin enfermedad que indica la presencia o susceptibilidad en la DCL.
- 35 36. Un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento de alfa – sinucleína, en el que el fragmento es SN1 – 115, SN116 – 140, SN1 – 133, SN1 – 135, SN134 – 140 o SN136 - 140 numerados según la SEC ID N° 1; sin unirse específicamente a la alfa – sinucleína completa.
- 40 37. El anticuerpo de la realización 36 es un anticuerpo humano.
38. El anticuerpo de la realización 36 es un anticuerpo humanizado.
- 45 39. El anticuerpo de la realización 36 es un anticuerpo monoclonal.
40. El anticuerpo de la realización 36 que tiene un isotipo humano IgG1.
41. El anticuerpo de la realización 36 designado 12C6 o 7G8.
- 50 42. Un método para detectar la presencia o susceptibilidad de la DCL en un paciente, que comprende administrar a un paciente un anticuerpo que se une específicamente a SN1 – 115, SN1 – 133 o SN1 – 135 numerados según la SEC ID N° 1; sin unirse específicamente a la alfa – sinucleína completa; determinar un nivel de unión del anticuerpo en los pacientes, en el que un nivel mayor de unión con respecto al nivel de referencia en individuos sin enfermedad, indica la presencia o susceptibilidad en la DCL.
- 55 43. Un método para efectuar el tratamiento o profilaxis de una DCL, que comprende administrar a un paciente que padece de, o en riesgo de una DCL, un régimen eficaz de alfa – sinucleína fosforilada o un fragmento fosforilado de alfa – sinucleína, en el que el fragmento se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa – sinucleína intacta y una delección de 1 – 11 aminoácidos contiguos de C – terminal de la alfa – sinucleína intacta; y de este modo, efectúa el tratamiento o profilaxis de la DCL.
- 60 44. El método de la realización 43, en el que el fragmento es SN1 – 133 o SN1 – 135.
- 65 45. El método de la realización 43, que comprende además la administración de un adyuvante que aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos en el fragmento.

46. El método de la realización 43, en el que el fragmento está unido a un portador que forma una proteína de fusión, en el que el portador aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos en el fragmento.
- 5 47. Un método para efectuar el tratamiento o profilaxis de una DCL, que comprende administrar a un paciente que padece de, o en riesgo de una DCL, un régimen eficaz de un fragmento de alfa – sinucleína, en el que el fragmento es SN1 – 115, SN1 – 133 o SN1 – 135 numerados según la SEC ID N° 1; o un subfragmento de cualquiera de estos que incluye, al menos, cinco residuos contiguos que comienzan en C – terminal de uno de los fragmentos, y de ese modo, efectúa el tratamiento o profilaxis de la DCL.
- 10 48. Un método para efectuar el tratamiento o profilaxis de una DCL, que comprende administrar a un paciente que padece de, o en riesgo de una DCL, un régimen eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento de alfa – sinucleína, en el que el fragmento es SN1 – 115, SN1 – 133 o SN1 – 135; con residuos numerados según la SEC ID N° 1 sin unirse a la alfa – sinucleína intacta, con lo cual el anticuerpo efectúa la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad.
- 15 49. Un método de purificación de una proteasa que cliva la alfa – sinucleína intacta para formar un fragmento, en el que el fragmento es SN1 – 115, SN1 – 133 o SN1 – 135; con residuos numerados según la SEC ID N° 1; que comprende identificar un inhibidor de la proteasa;
- 20 poner en contacto el inhibidor con un extracto celular o tisular que contiene la proteasa, con lo cual la proteasa se une al inhibidor; y liberar la proteasa del inhibidor.
- 25 50. El método de la realización 49, en el que el inhibidor es un péptido de alfa – sinucleína que comprende un segmento contiguo de al menos 5 residuos de alfa – sinucleína intacta entre las posiciones 129 – 139, o 111 – 119.
- 30 51. El método de la realización 49, en el que al menos uno de los residuos es un análogo de estado de transición.
- 35 52. Un anticuerpo monoclonal designado 12C6 o 7G8 o una forma quimérica o humanizada del mismo.
53. Un fragmento de alfa – sinucleína, que es alfa - sinucleína SN1 – 133 o SN1 – 135, con residuos numerados según la SEC ID N° 1.
54. El fragmento de la realización 53, en el que el fragmento de alfa – sinucleína contiene una mutación asociada a la demencia con cuerpos de Lewy hereditaria (DCL), por ejemplo, una mutación A53T.
- 40 55. Un fragmento de alfa – sinucleína, que es alfa - sinucleína SN134 – 140 o SN136 – 140, con residuos numerados según la SEC ID N° 1.
- 45 56. Un método de cribado para un agente que tiene una actividad farmacológica útil para el tratamiento de la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) que comprende:
- poner en contacto el agente con un fragmento de alfa – sinucleína, definido en las reivindicaciones 53 o 54;
- determinar la velocidad o extensión de agregación de la alfa – sinucleína o fragmento de alfa – sinucleína, en el que una reducción en la velocidad o extensión de agregación respecto a un control que carece de agente, indica que el agente tiene una actividad farmacológica.
- 50 57. Un método según la realización 56, en el que el fragmento de alfa – sinucleína está fosforilado.
- 55 58. Un método de cribado para un agente que tiene una actividad farmacológica útil para el tratamiento de la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) que comprende:
- poner en contacto una célula que expresa alfa – sinucleína y procesar la alfa – sinucleína en un fragmento con un agente, en el que el agente se define en la realización 53 o 54;
- determinar un nivel del fragmento en la célula con relación al nivel de referencia en el mismo tipo celular en ausencia del agente, una reducción en el nivel del fragmento con relación a la referencia indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL.
- 60 59. Un método de cribado de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, que comprende:
- 65 poner en contacto un animal transgénico que tiene un transgén que expresa un fragmento de alfa – sinucleína, tal y como se define en las reivindicaciones 53 o 54, con un agente;

- determinar un nivel de formas agregadas del fragmento en el cerebro de un animal transgénico con relación al nivel de referencia de las formas agregadas del fragmento comparables a un animal transgénico en ausencia del agente, una reducción en el nivel de las formas agregadas del fragmento en relación a la referencia indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, en el que el animal transgénico es preferiblemente un ratón o una *Drosophila*.
- 5
60. Un método de cribado de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, que comprende:
- 10 poner en contacto un animal transgénico que tiene un transgén que expresa la alfa – sinucleína y procesa la alfa – sinucleína en un fragmento definido en las realizaciones 53 o 54 con un agente, determinar un nivel del fragmento en una célula neuronal con relación al nivel de referencia en ausencia del agente, una reducción en el nivel de los fragmentos en relación a la referencia indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, en el que el animal transgénico es preferiblemente un ratón o una *Drosophila*.
- 15
61. El método de las realizaciones 56 - 60, que comprende además la realización de un ensayo en un ser humano que tiene una DCL o un modelo animal de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL, en el que la DCL es preferiblemente la enfermedad de Parkinson o una DCLD.
- 20
62. Un animal transgénico, preferiblemente un ratón o una *Drosophila*, que tiene un genoma que comprende un transgén que comprende un promotor operablemente unido a un segmento de ácido nucleico que codifica un fragmento de alfa – sinucleína tal y como se define en la realización 53;
- 25 en el que la expresión del fragmento en el animal transgénico predispone al animal a desarrollar al menos una característica de DCL, en el que el promotor es preferiblemente un promotor PDGF, o en el que al menos una característica es preferiblemente una deficiencia de la función motora o una deficiencia de la función cognitiva.
63. Un método para detectar la presencia o susceptibilidad de DCL en un paciente, que comprende:
- 30 detectar un nivel de un fragmento de alfa – sinucleína tal y como se define en la realización 53 en un fluido corporal;
- un nivel mayor de unión con respecto al nivel de referencia en individuos sin enfermedad que indica la presencia o susceptibilidad en la DCL.
- 35
64. Un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento de alfa – sinucleína, tal y como se define en las reivindicaciones 53 o 55, sin unirse específicamente a una alfa – sinucleína completa, en el que el anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo humano o humanizado, más preferiblemente un isotipo humano IgG1.
- 40
65. Un método para diagnosticar la presencia de o susceptibilidad en la DCL, que comprende:
- determinar un nivel de unión de un anticuerpo según la realización 64 cuando depende de la realización 53 en un paciente, en el que un mayor nivel de unión con relación al nivel de referencia en individuos sin enfermedad indica la presencia o susceptibilidad en la DCL.
- 45
66. Un fragmento de alfa – sinucleína, en el que el fragmento se define en las realizaciones 53 o 54, o un subfragmento que incluye, al menos, cinco residuos contiguos que comienzan en C – terminal de uno de los fragmentos, o un anticuerpo en la alfa – sinucleína tal y como se define en la realización 64 cuando depende de la realización 53, para su utilización en un método de tratamiento o profilaxis de la demencia con cuerpos de Lewy.
- 50
67. Un método para purificar una proteasa que cliva la alfa – sinucleína intacta para formar un fragmento, tal y como se define en la realización 53, que comprende:
- 55 identificar un inhibidor de la proteasa;
- poner en contacto el inhibidor con un extracto celular o tisular que contiene la proteasa, con lo cual la proteasa se une al inhibidor; y;
- 60 liberar la proteasa del inhibidor, en el que el inhibidor es opcionalmente un péptido de alfa – sinucleína que comprende un segmento contiguo de al menos 5 residuos de la alfa – sinucleína intacta entre las posiciones 129 – 139, o 111 – 119, preferiblemente en el que al menos uno de los residuos es un análogo de estado de transición.
- 65

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Elan Pharmaceuticals, Inc.

<120> FRAGMENTOS TRUNCADOS DE ALFA - SINUCLEÍNA EN DEMENCIA CON CUERPOS DE LEWY

5

<130> P056513EP

<140> no conocido aún

10

<141> 2005-10-19

<150> EP 10006457.5

<151> 2005-10-19

15

<150> EP 05814041.9

<151> 2005-10-19

<150> US 10/969,335

20

<151> 2004-10-19

<150> US 11/194115

<151> 2005-07-29

25

<160> 11

<170> Versión de Patente 3.3

30

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 1

40

```

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
1      5      10      15
Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
20      25      30
Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
35      40      45
Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
50      55      60
Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65      70      75      80
Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
85      90      95
Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
100     105     110
Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
115     120     125
Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
130     135     140
    
```

60

<210> 2

<211> 25

65

ES 2 460 665 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 2

Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu

10 1 5 10 15  
 Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn  
 20 25

15 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 3

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile

25 1 5 10 15  
 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn  
 20 25

<210> 4  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 4

35 Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile

1 5 10 15  
 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp

40 20

<210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <400> 5

50 Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln

1 5

<210> 6  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 6

60 Glu Gly Ile Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr

1 5 10 15  
 Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala

20 25 30

65



ES 2 460 665 T3

Cys Gly Gly Val Asp Pro Asp Asn  
1 5

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



**Reivindicaciones**

- 5
1. Un fragmento de alfa – sinucleína, que es alfa sinucleína SN1 – 135, con residuos numerados según la SEC ID N° 1.
  2. Un fragmento de la reivindicación 1, en el que el fragmento de alfa – sinucleína contiene una mutación asociada con la demencia con cuerpos de Lewy hereditaria (DCL), preferiblemente una mutación A53T.
  - 10 3. Un método para cribar un agente que tiene una actividad farmacológica útil para el tratamiento de la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) que comprende:
 

poner en contacto el agente con un fragmento de alfa – sinucleína, tal y como se define en las reivindicaciones 1 o 2;

y

determinar la velocidad o extensión de agregación de alfa – sinucleína o fragmento de alfa – sinucleína, en el que una reducción en la velocidad o extensión de agregación respecto a un control que carece de agente, indica que el agente tiene una actividad farmacológica.
  - 20 4. Un método según la reivindicación 3, en el que el fragmento de alfa – sinucleína está fosforilado.
  5. Un método de cribado de un agente que tiene una actividad farmacológica útil para el tratamiento de la (DCL) que comprende:
 

poner en contacto una célula que expresa alfa – sinucleína y procesar la alfa – sinucleína en un fragmento con un agente, en el que el agente se define en las realizaciones 1 o 2; y

determinar un nivel del fragmento en la célula con relación al nivel de referencia en el mismo tipo celular en ausencia del agente, una reducción en el nivel del fragmento con relación a la referencia indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL.
  - 30 6. Un método de cribado de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, que comprende:
 

poner en contacto un animal transgénico no humano que tiene un transgén que expresa un fragmento de alfa – sinucleína, tal y como se define en las reivindicaciones 1 o 2, con un agente; y

determinar un nivel de formas agregadas del fragmento en el cerebro de un animal transgénico no humano con relación al nivel de referencia de las formas agregadas comparables a un animal transgénico no humano en ausencia del agente, una reducción en el nivel de las formas agregadas del fragmento en relación a la referencia indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, en el que el animal transgénico no humano es preferiblemente un ratón o una *Drosophila*.
  - 40 7. Un método de cribado de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, que comprende:
 

poner en contacto un animal transgénico no humano que tiene un transgén que expresa alfa – sinucleína y procesa alfa – sinucleína en un fragmento, tal y como se define en las reivindicaciones 1 o 2, con un agente; y

determinar un nivel del fragmento en una célula neuronal de un animal transgénico no humano con relación al nivel de línea en ausencia del agente, una reducción en el nivel de los fragmentos en relación a la referencia indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de la DCL, en el que el animal transgénico no humano es preferiblemente un ratón o una *Drosophila*.
  - 50 8. El método de las reivindicaciones 3 – 7, que comprende además la realización de un ensayo en un modelo animal no humano de DCL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la DCL, en el que la DCL es preferiblemente la enfermedad de Parkinson o la DCLD.
  - 55 9. Un animal transgénico no humano, preferiblemente un ratón o una *Drosophila*, que tiene un genoma que comprende un transgén que comprende un promotor operablemente unido a un segmento de ácido nucleico que codifica un fragmento de alfa – sinucleína tal y como se define en las reivindicaciones 1 o 2; en el que la expresión del fragmento en el animal transgénico no humano predispone al animal no humano a desarrollar al menos una característica de DCL, en el que el promotor es preferiblemente un promotor PDGF, o en el que al menos una característica es preferiblemente una deficiencia de la función motora o una deficiencia de la función cognitiva.
  - 60 10. Un método para detectar la presencia de la DCL en un paciente, que comprende:
  - 65

detectar el nivel de un fragmento de alfa – sinucleína tal y como se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2 en el líquido cefalorraquídeo; un mayor nivel que el nivel de la referencia en individuos sin enfermedad que indica presencia de la DCL.

5

**11.** Un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento de alfa – sinucleína, tal y como se define en las reivindicaciones 1 o 2, sin unirse específicamente a una alfa – sinucleína completa, en el que el anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo humano o humanizado, más preferiblemente un isotipo humano IgG1.

10

**12.** Un método de diagnóstico de la presencia de DCL por imagen funcional *in vivo*, que comprende:

determinar un nivel de unión de un anticuerpo según la reivindicación 11 en el cerebro de un paciente, en el que un nivel más elevado de unión con relación al nivel de la referencia en individuos sin enfermedad indica la presencia de DCL.

15

**13.** Un fragmento de alfa – sinucleína, que se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, o un anticuerpo de alfa – sinucleína tal y como se define en la reivindicación 11, para su utilización en un método de tratamiento o profilaxis de la demencia con cuerpos de Lewy.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

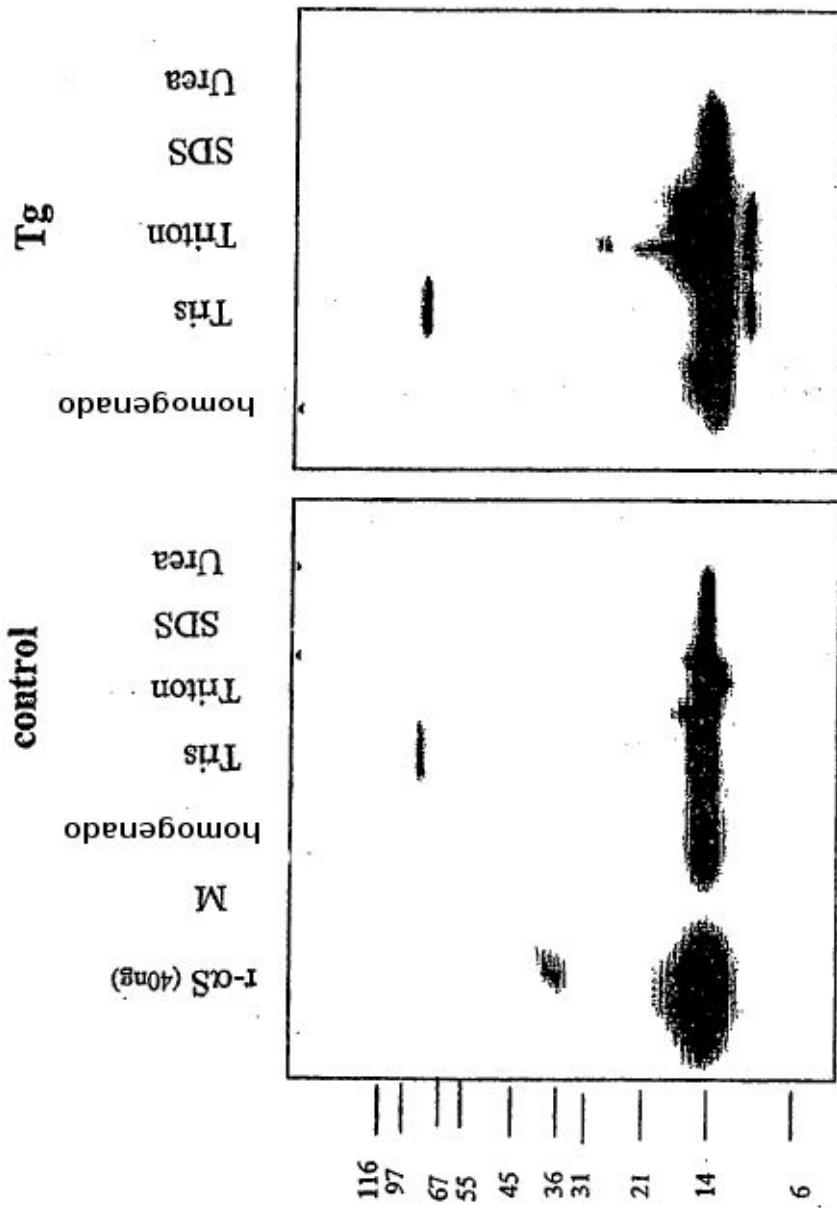


Fig. 1B

Fig. 1A

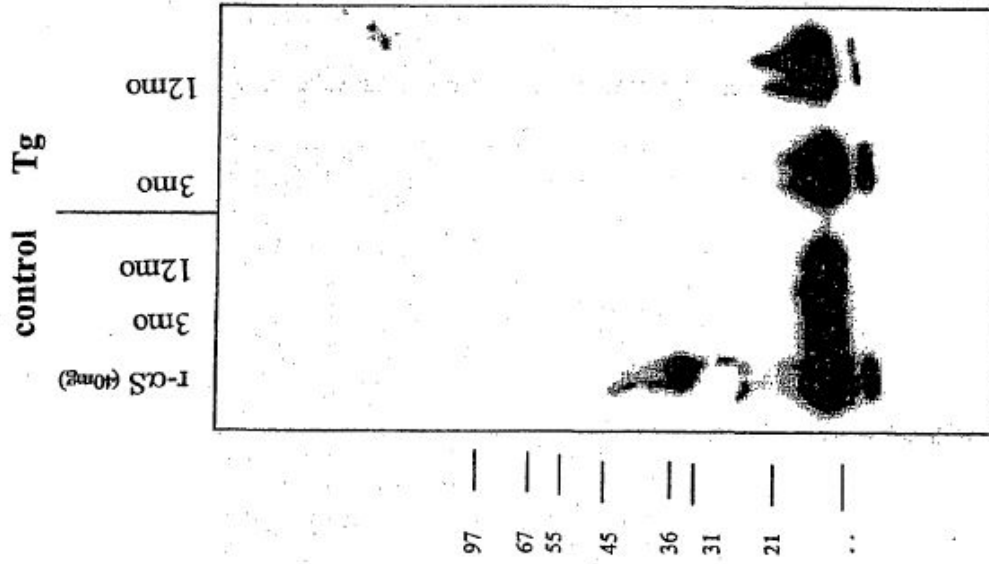


Fig. 2

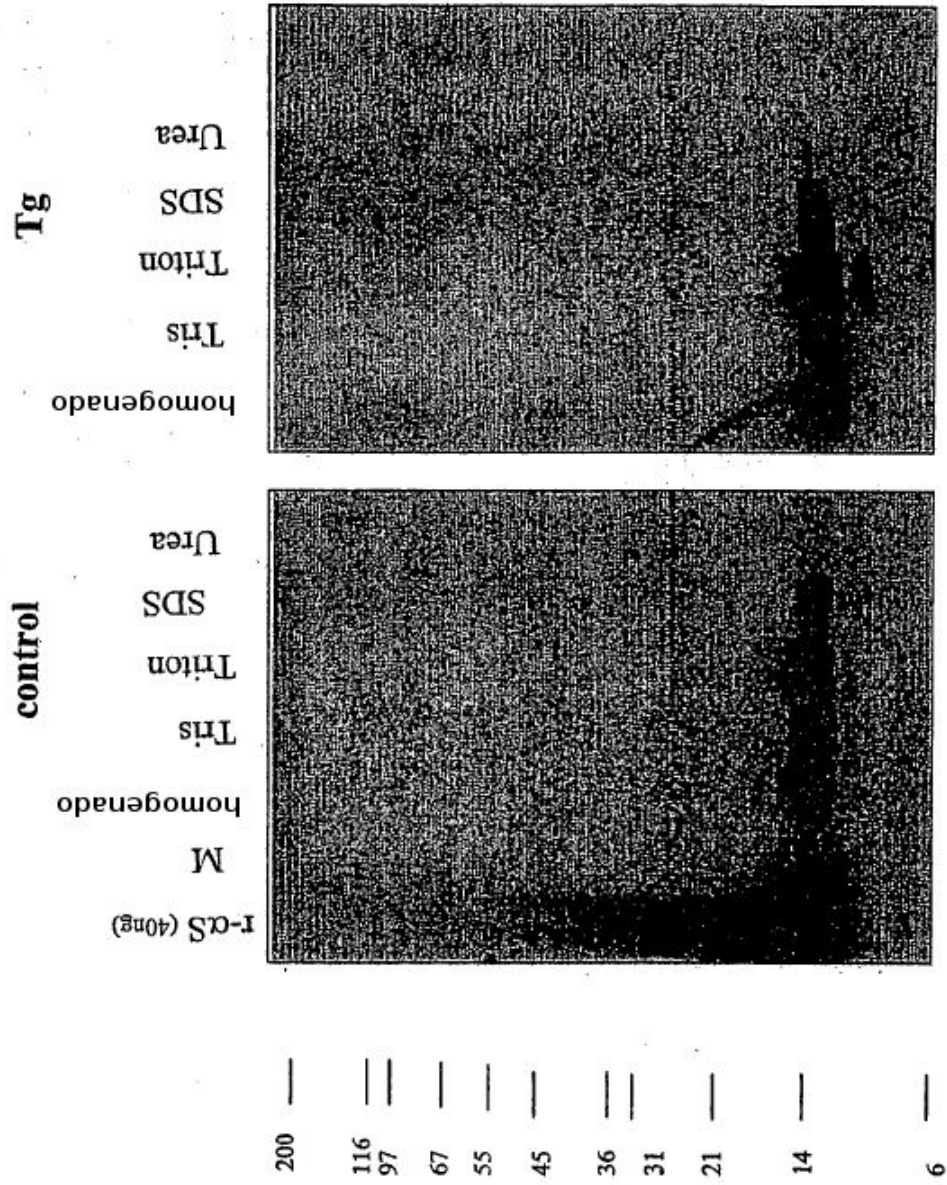


Fig. 3B

Fig. 3A

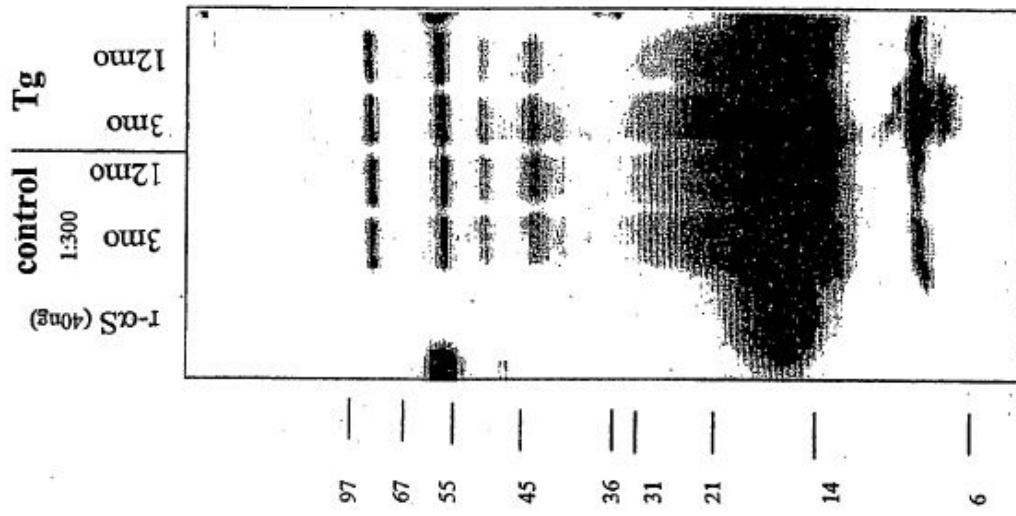


Fig.4

Fig. 5A

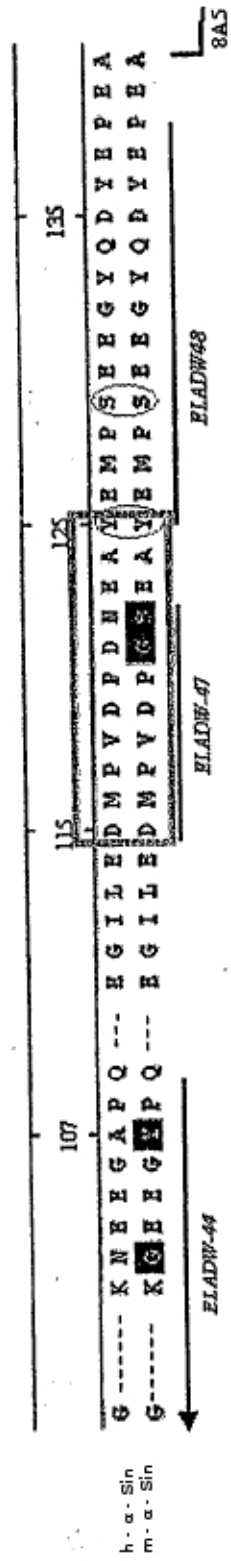


Fig. 5D

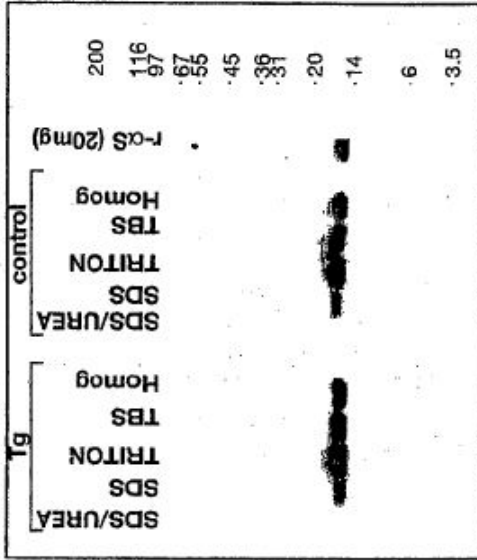


Fig. 5E

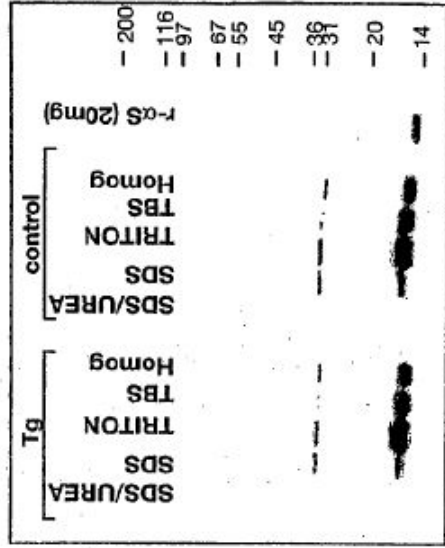


Fig. 5B

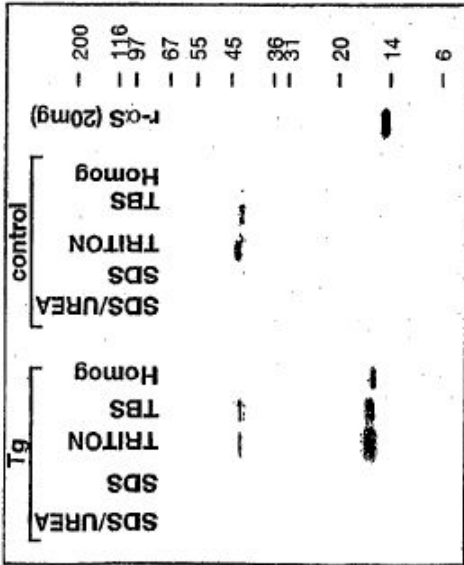
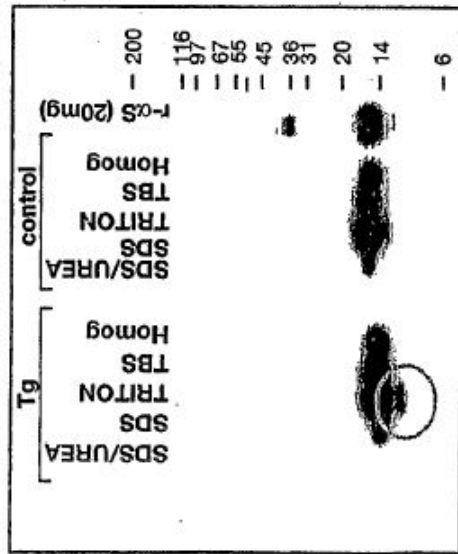
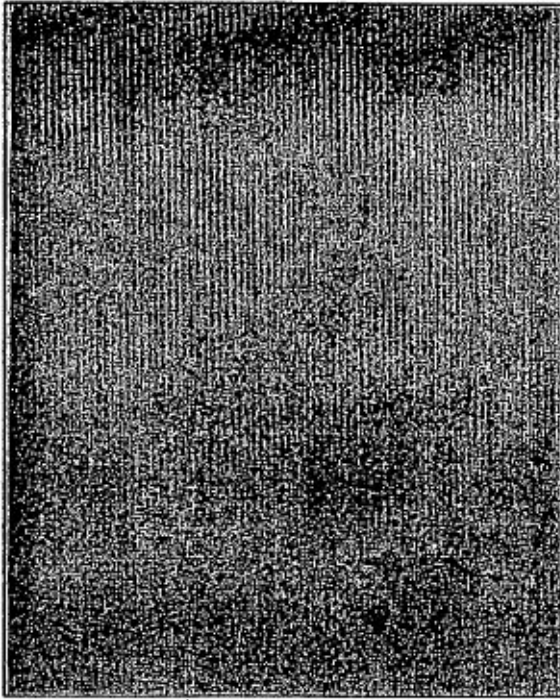


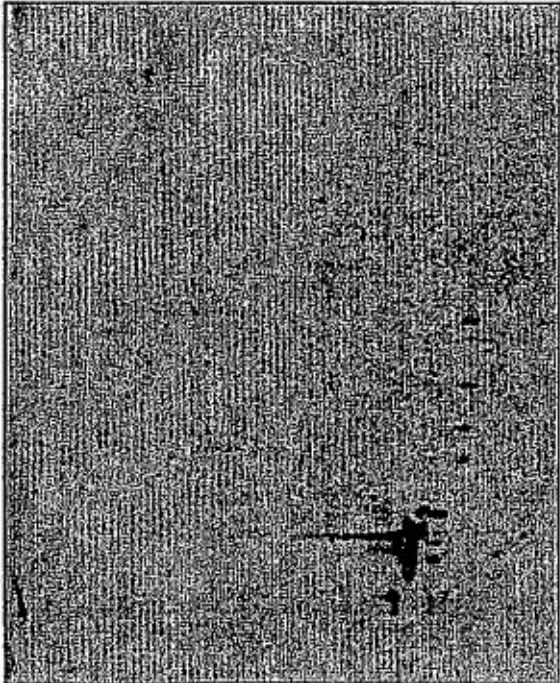
Fig. 5C



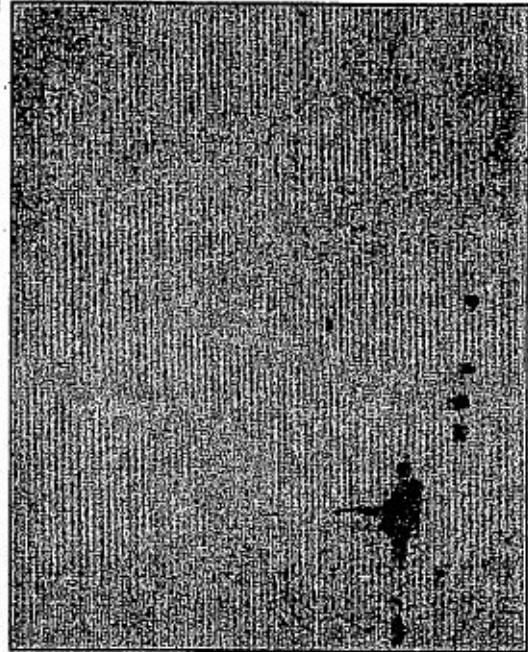




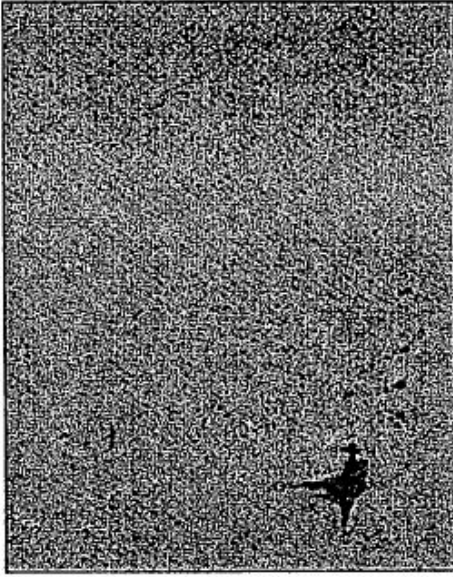
**Fig. 6B**



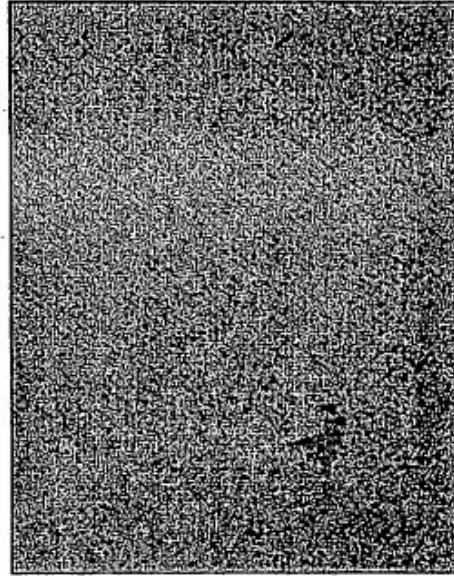
**Fig. 6A**



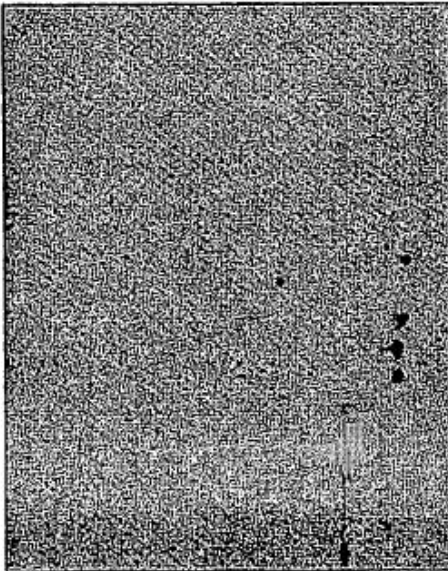
**Fig. 6C**



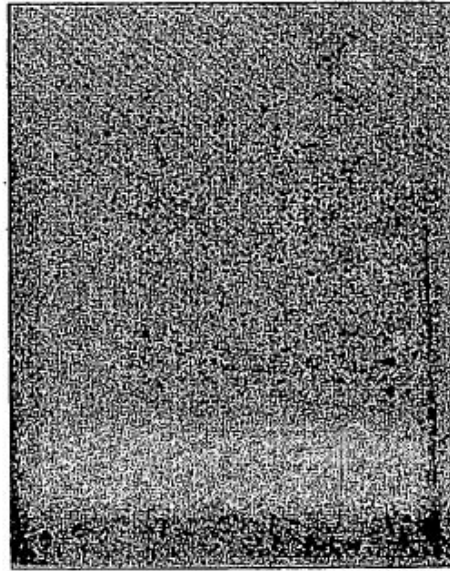
**Fig. 7C**



**Fig. 7D**



**Fig. 7A**



**Fig. 7B**

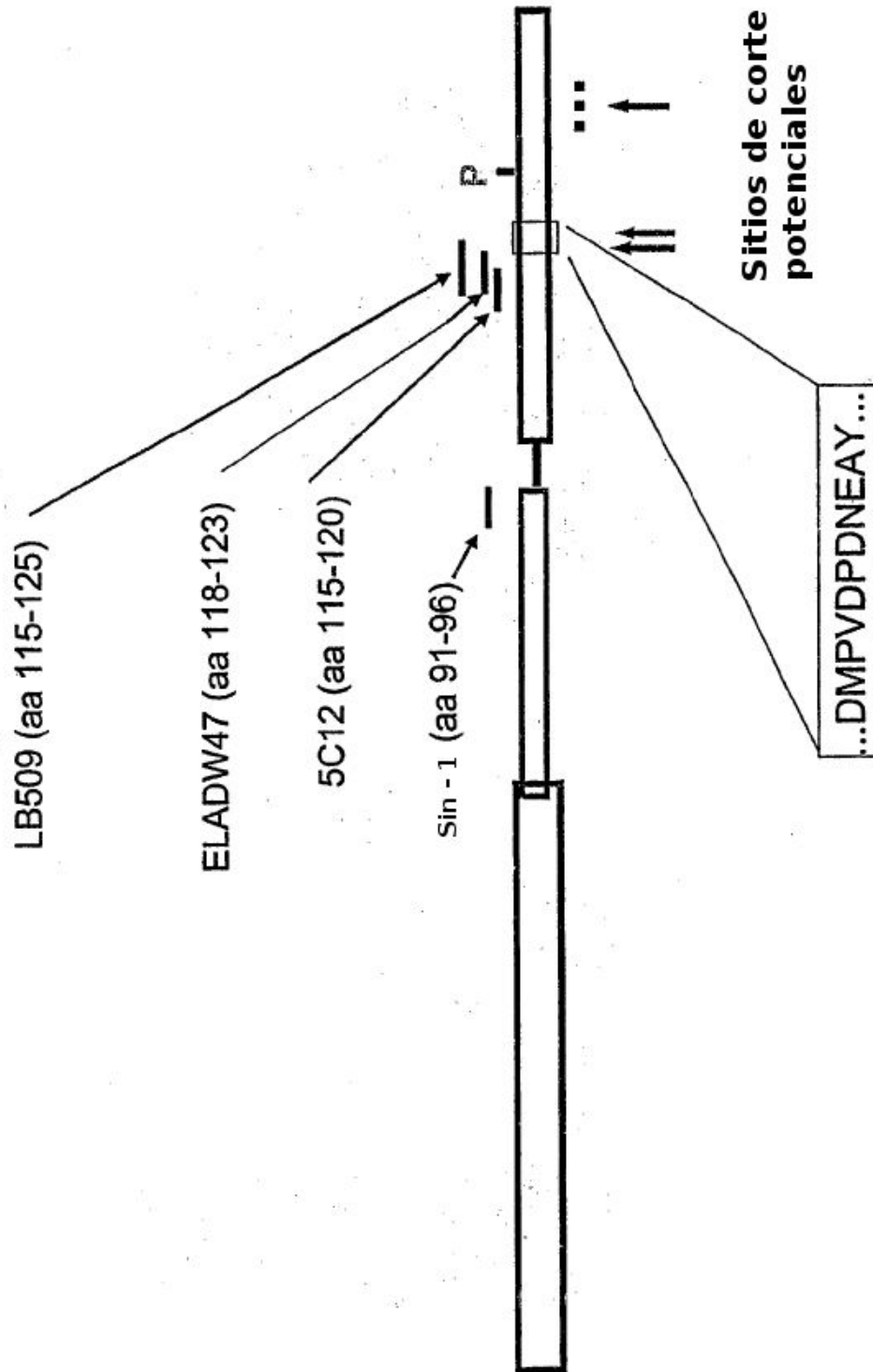


Fig. 8



Fig. 9B



Fig. 9A

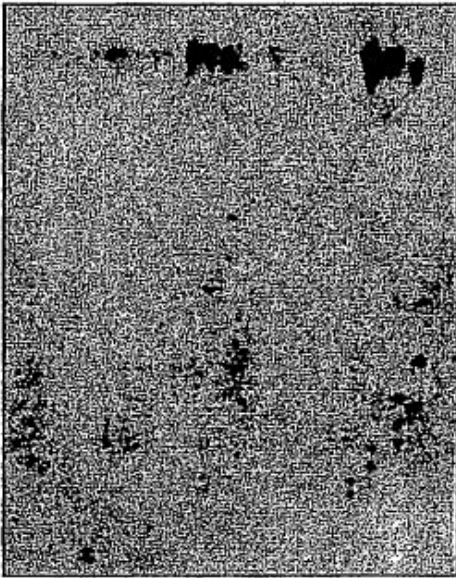


Fig. 10C

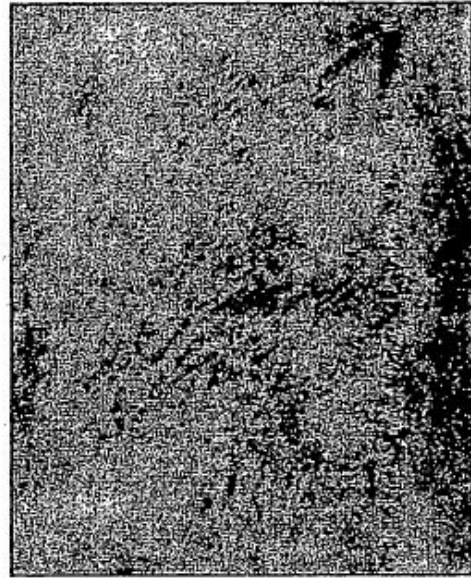


Fig. 10D

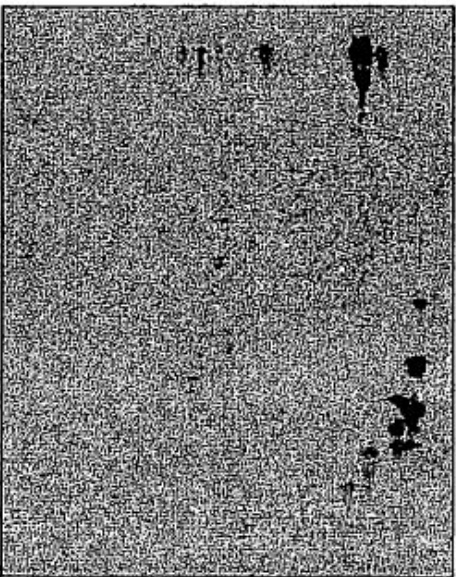


Fig. 10A

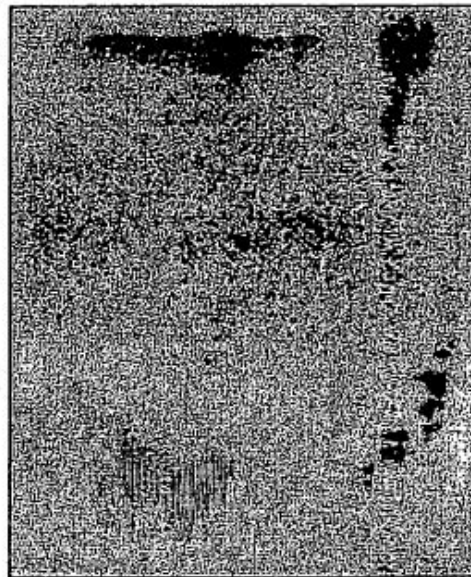
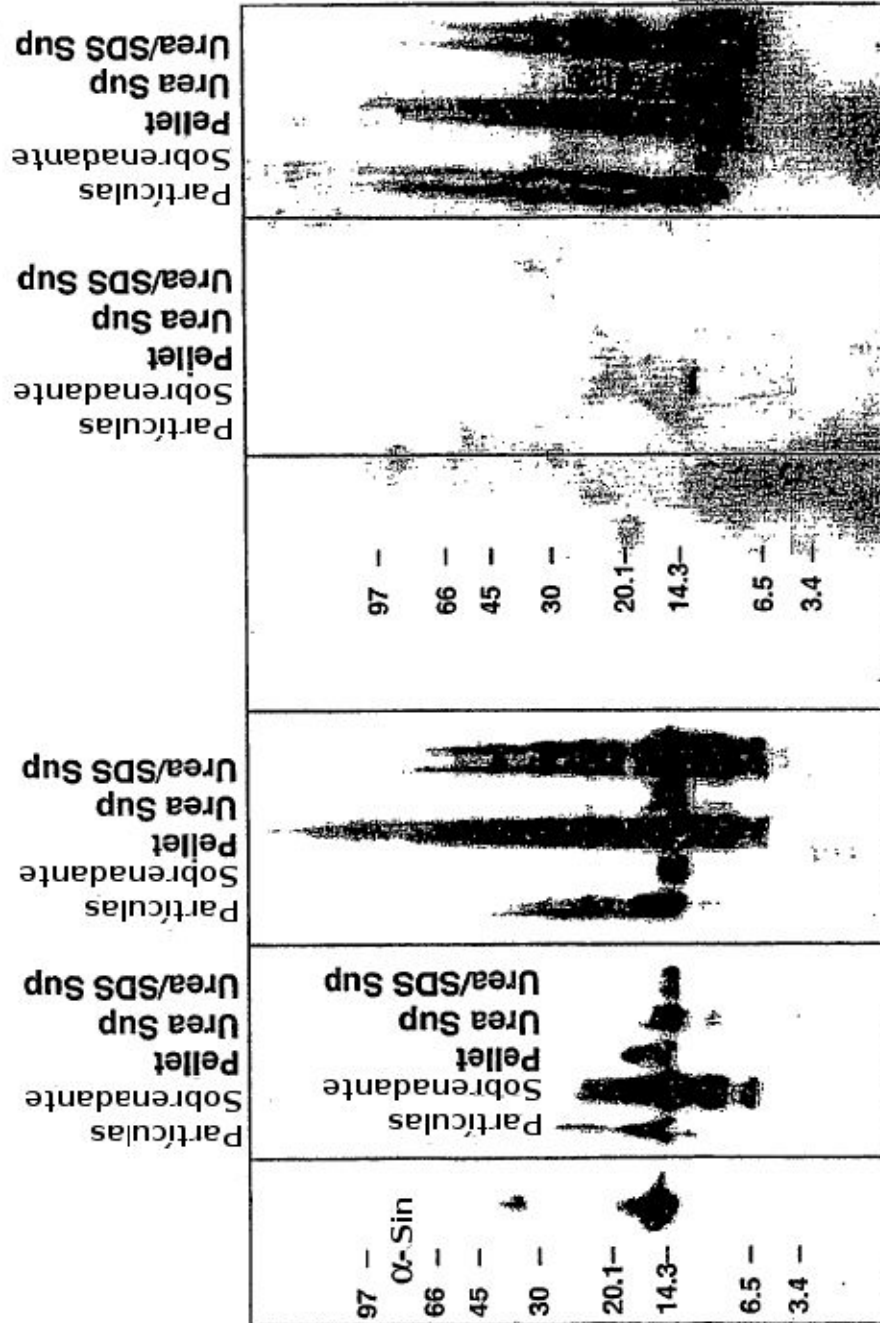


Fig. 10B





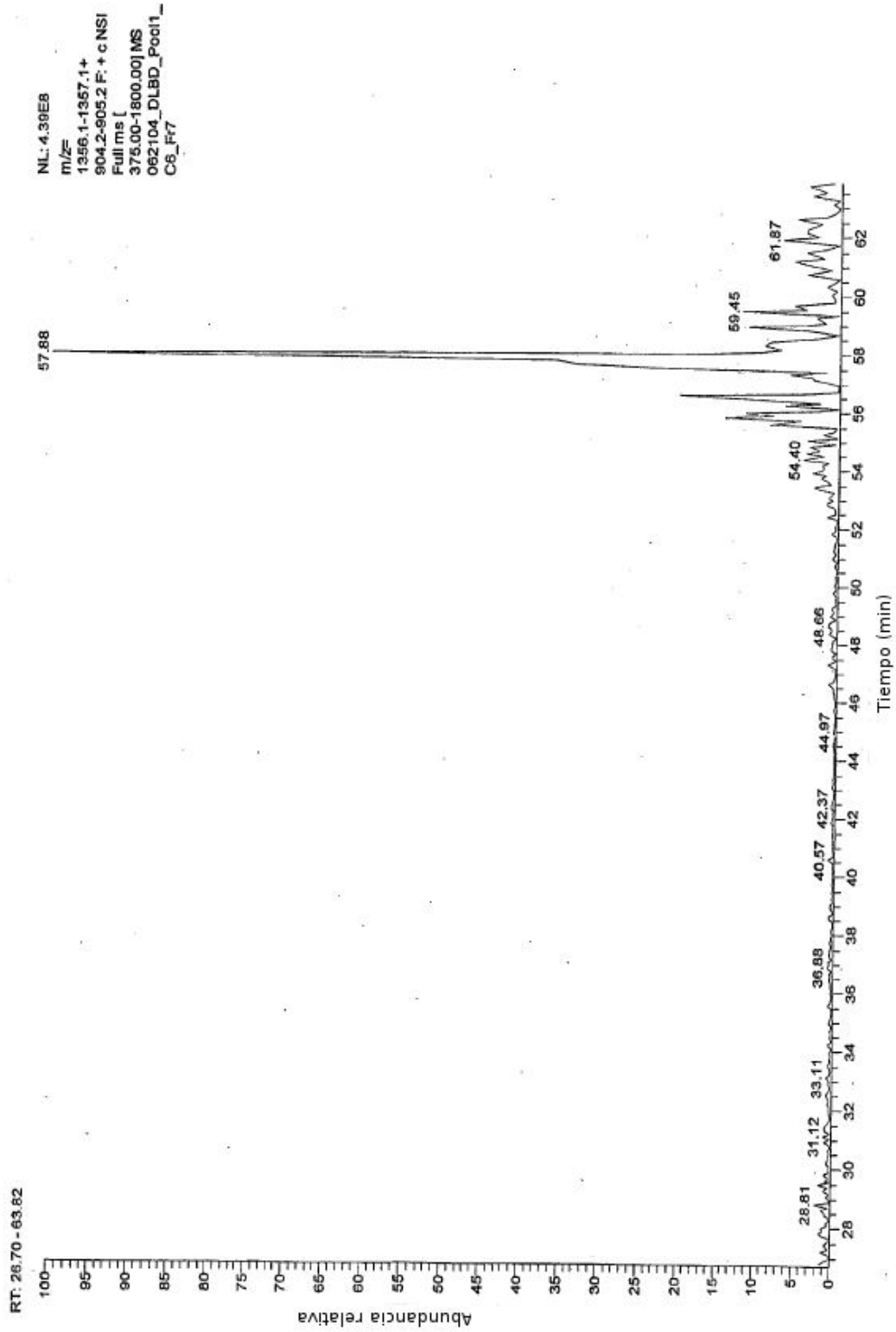


Figura 12

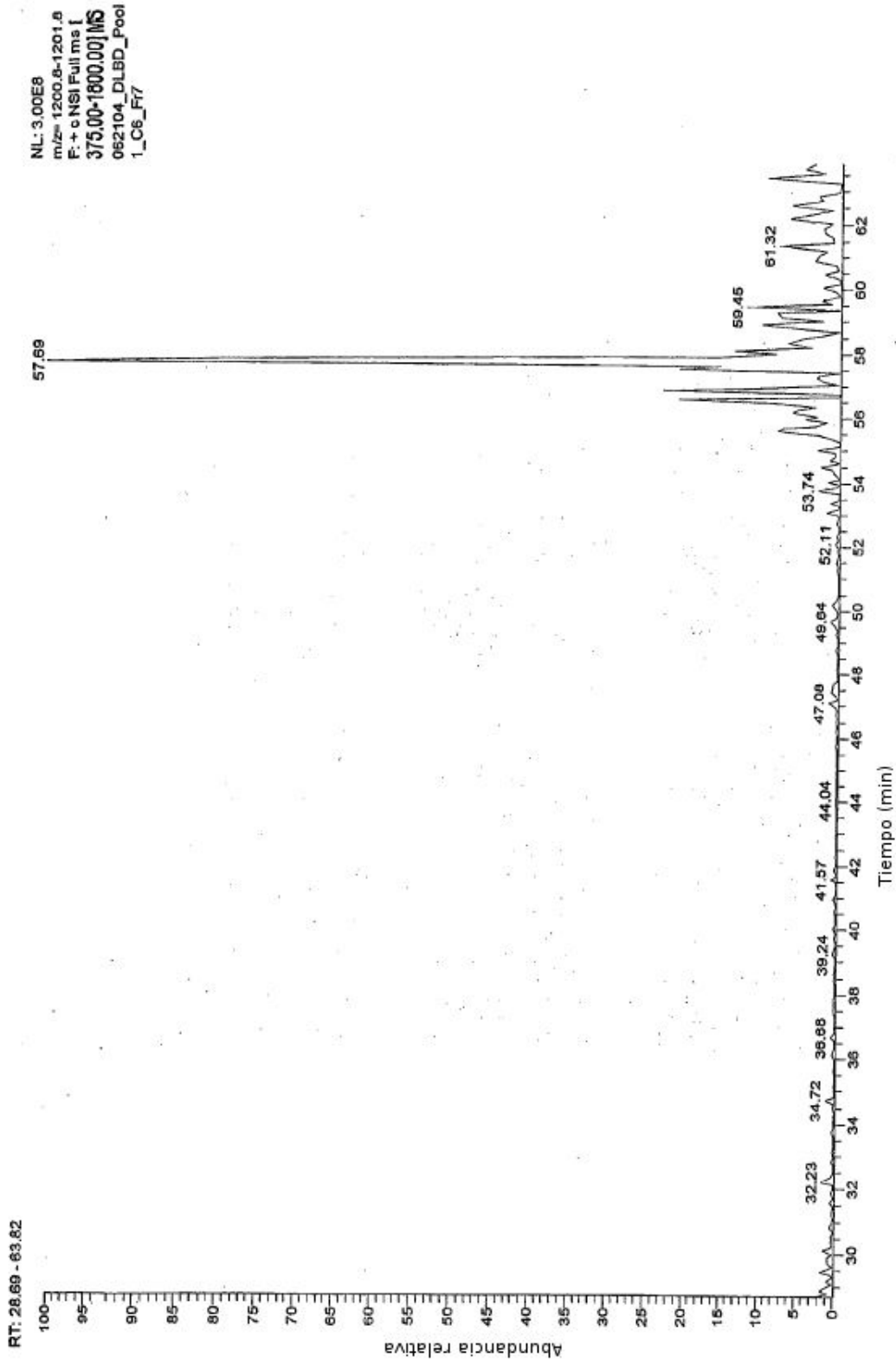


Figura 13



Figura 14A

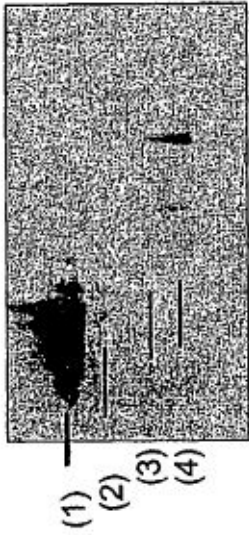


Figura 14D



Figura 14B



Figura 14E



Figura 14C



Figura 14F



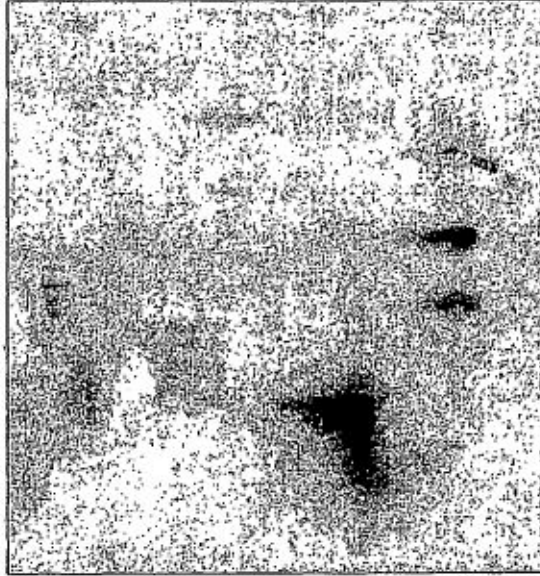
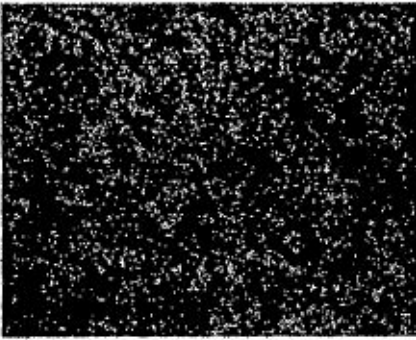


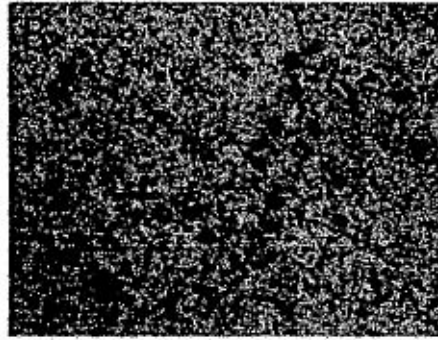
Figura 15B



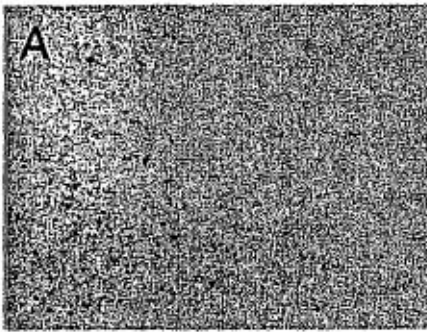
Figura 15A



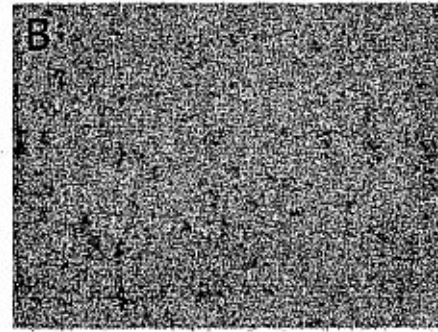
**Fig. 16A**



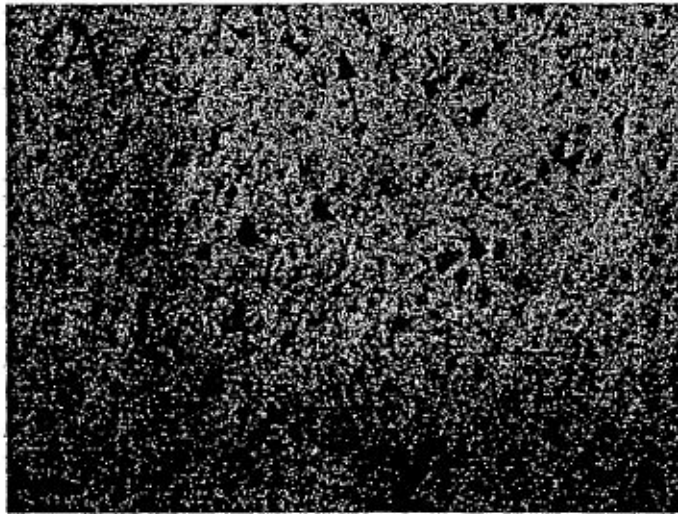
**Fig. 16B**



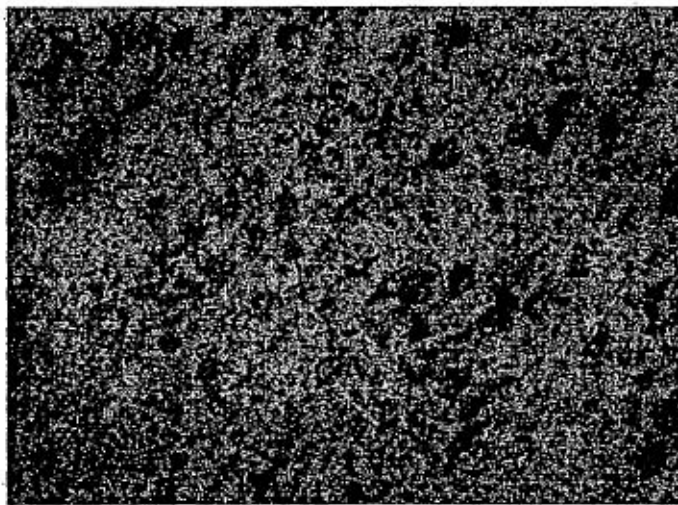
**Fig. 17A**



**Fig. 17B**



**Fig. 18A**



**Fig. 18B**