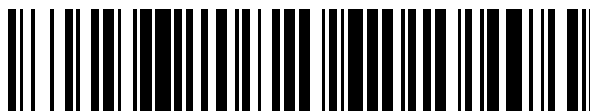


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 569**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2009 E 09795723 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2370466**

54 Título: **Autoanticuerpos humanos anti alfa-sinucleína**

30 Prioridad:

19.12.2008 EP 08022188
19.12.2008 US 139253 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.09.2015

73 Titular/es:

**BIOGEN INTERNATIONAL NEUROSCIENCE
GMBH (50.0%)**
Landis + Gyr-Strasse 3
6300 Zug, CH y
UNIVERSITY OF ZURICH (50.0%)

72 Inventor/es:

WEIHOFEN, ANDREAS;
GRIMM, JAN;
NITSCH, ROGER y
HOCK, CHRISTOPH

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 544 569 T3

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

DESCRIPCIÓN

Autoanticuerpos humanos anti alfa-sinucleína

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere en general a nuevas moléculas de unión específica a α -sinucleína, especialmente anticuerpos humanos así como sus fragmentos, derivados y variantes que reconocen la α -sinucleína y formas agregadas de α -sinucleína, respectivamente. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y diagnósticas que comprenden dichas moléculas de unión, anticuerpos y sus miméticos válidos 10 ambos como herramientas diagnósticas para identificar especies tóxicas de α -sinucleína en plasma y LCE y también en estrategias de vacunación pasiva para tratar trastornos relacionados con agregados de α -sinucleína, como la enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras enfermedades sinucleinopáticas.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El plegamiento erróneo y la agregación de las proteínas son aspectos patológicos de numerosas enfermedades neurodegenerativas. Los agregados de α -sinucleína son los componentes principales de los cuerpos de Lewy y de las neuritas de Lewy asociadas con la enfermedad de Parkinson (EP). La α -sinucleína, una proteína desplegada en su forma nativa, puede adoptar diferentes morfologías agregadas, incluidos oligómeros, protofibrillas y fibrillas. Se ha demostrado que los agregados oligoméricos pequeños son especialmente tóxicos.

[0003] Se han detectado autoanticuerpos naturales frente a α -sinucleína en personas sanas y sus niveles alterados en los pacientes se asociaron con trastornos neurodegenerativos en particular; para revisión véase Neff y col., *Autoimmun. Rev.* 7 (2008), 501-507. Por tanto, la aparición de anticuerpos naturales en pacientes que sufren enfermedad de Parkinson, de forma espontánea o tras la vacunación, especialmente en pacientes sanos puede ofrecer un papel protector con respecto a la agregación de la α -sinucleína, véase. por ejemplo, Woulfe y col., *Neurology* 58 (2002), 1435-1436 y Papachroni y col., *J. Neurochem.* 101 (2007), 749-756. Hasta ahora, el significado terapéutico de los autoanticuerpos ha sido difícil de evaluar. Esto se debe principalmente a la falta de técnicas experimentales directas para su aislamiento y posterior caracterización *in vitro*. Recientemente, se han publicados especies oligoméricas de α -sinucleína que están extracelularmente en plasma y LCE (El-Agnaf y col., *FASEB J.* 20 (2006), 419-425) y estudios de inmunización en modelos murinos de EP muestran que los anticuerpos monoclonales de ratón extracelulares frente a α -sinucleína pueden reducir la acumulación de agregados intracelulares de α -sinucleína (Masliah y col., *Neuron*, 46 (2005), 857-868) lo que apoya la idea de que los anticuerpos que neutralizan los agregados neurotóxicos sin interferir con las funciones beneficiosas de la α -sinucleína monomérica pueden ser agentes terapéuticos útiles. Sin embargo, la utilidad terapéutica de los anticuerpos de base murina en humanos se ve limitada por la respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) debido a su origen no humano.

[0004] Emadi y col. en *J. Mol. Biol.* 368 (2007), 1132-1144, describen el aislamiento de fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) a partir de una librería de anticuerpos de despliegue de fagos a base de secuencias humanas frente a α -sinucleína, que se unen solo a una forma oligomérica de α -sinucleína e inhiben tanto la agregación como la toxicidad de dicha proteína *in vitro*. No obstante, aunque la generación de scFv a partir de despliegue de fagos es más bien sencilla, esta técnica tiene inconvenientes graves ya que los anticuerpos producidos de este modo conllevan el riesgo de reactividad cruzada no deseada frente a autoantígenos y carecen de las características de los anticuerpos humanos naturales optimizados de forma evolutiva producidos por el sistema inmunitario humano. Adicionalmente, estos anticuerpos pueden no ser suficientemente específicos debido a la reactividad cruzada con otras proteínas y/o con la proteína diana en el contexto de un entorno fisiológico y una función normales. En el caso de la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, los anticuerpos que también pueden presentar reacción cruzada con derivados fisiológicos de α -sinucleína conllevan la posibilidad de producir efectos adversos relacionados con las funciones normales de las estructuras fisiológicas diana. A este respecto, una enfermedad autoinmune no deseada podría inducir realmente un riesgo difícil de calcular en el diseño conceptual de experimentos de inmunización activa empleando estructuras proteicas que, en su forma variante, también se producen fisiológicamente.

55

[0005] Más recientemente, Seitz y col. (81. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie Hamburg 10.-13.09.2008) comunicaron el aislamiento de autoanticuerpos policlonales anti- α -sinucleína a partir de diferentes soluciones de inmunoglobulinas y muestras de sangre de donantes individuales mediante cromatografía de afinidad. No obstante, a pesar del hecho de que esta técnica proporciona cantidades

bastante limitadas del anticuerpo deseado, los anticuerpos policlonales tienen solo una aplicación terapéutica limitada debido, por ejemplo, a su heterogeneidad y al riesgo de estar contaminados con otras moléculas asociadas a α -sinucleína que tienen efectos adversos no deseados. De este modo, el valor diagnóstico de los anticuerpos policlonales se reduce ya que la variabilidad de la composición de los anticuerpos influirá sobre la especificidad y reactividad globales. Esto es tanto más cierto para anticuerpos frente a proteínas objeto de agregación y depósito debido a un mal plegamiento.

[0006] Por tanto, existe la necesidad de superar las limitaciones descritas anteriormente y proporcionar un anticuerpo humano terapéutico y diagnóstico frente a la α -sinucleína.

10

RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] El problema técnico que subyace a la presente invención se ha resuelto mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

15

[0008] La presente invención utiliza la respuesta inmune específica frente a α -sinucleína en sujetos control de edad avanzada sanos y en pacientes con enfermedad neurológica para el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos naturales específicos de α -sinucleína. En particular, los experimentos realizados según la presente invención fueron útiles para aislar anticuerpos monoclonales específicos de la α -sinucleína a partir de un colectivo de sujetos de edad avanzada sin signos de Parkinsonismo.

20

[0009] Por tanto, la presente invención está dirigida a anticuerpos humanos, fragmentos de unión al antígeno y moléculas de unión al antígeno similares que son capaces de reconocer específicamente α -sinucleína, donde el anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína comprende en su región variable una región V_H CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 31-35 de la SEC ID N.º 9, una región V_H CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 50-68 de la SEC ID N.º 9, una región V_H CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 101-102 de la SEC ID N.º 9, una región V_L CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 23-33 de la SEC ID N.º 12, una región V_L CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 49-55 de la SEC ID N.º 12, una región V_L CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 88-89 de la SEC ID N.º 12. Por «reconociendo específicamente α -sinucleína», «anticuerpo específico para/de α -sinucleína» y «anticuerpo anti- α -sinucleína» especialmente se entiende, en general, y colectivamente, anticuerpos frente a la forma nativa de α -sinucleína, o frente a α -sinucleína mal plegada, oligomérica, agregada o postransduccionalmente modificada. En este documento se proporcionan anticuerpos humanos selectivos para las formas monoméricas nativas, de longitud completa, truncadas y agregadas.

25

30

35

[0010] En una realización especialmente preferida de la presente invención, el anticuerpo humano o su fragmento de unión al antígeno muestra las características inmunológicas de unión de un anticuerpo caracterizado por las regiones variables V_H y V_L como se establecen en la figura 1B.

40

[0011] El fragmento de unión al antígeno del anticuerpo puede ser un fragmento F_v de cadena sencilla, un fragmento $F(ab')$, un fragmento $F(ab)$ y un fragmento $F(ab')_2$ o cualquier otro fragmento de unión al antígeno. En una realización específica, más abajo, el anticuerpo o su fragmento es un anticuerpo humano de isotipo IgG. Alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico humano-murino o murinizado, siendo este último especialmente útil para los procedimientos diagnósticos y los estudios en animales.

45

[0012] Adicionalmente, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo de la presente invención o sus fragmentos activos, o agonistas y moléculas relacionadas, o alternativamente, antagonistas del mismo y a procedimientos inmunoterapéuticos e inmunodiagnósticos usando dichas composiciones en la prevención, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad sinucleinopática, en la que se administra una cantidad eficaz de la composición a un paciente que la necesita.

50

[0013] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Dicha región variable comprende al menos las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las V_H y V_L de la región variable como se establece en la figura 1B.

55

[0014] Por consiguiente, la presente invención también abarca vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células huésped transformadas con estos, así como su uso en la producción de un anticuerpo y moléculas de unión

equivalentes que son específicas para la α -sinucleína. En la técnica son conocidas medidas y procedimientos para la producción recombinante de anticuerpos y sus miméticos así como procedimientos de selección para moléculas de unión competitivas, que pueden o no ser anticuerpos. No obstante, como se describe en este documento, en particular con respecto a aplicaciones terapéuticas en humanos, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano en el sentido de que la aplicación de dicho anticuerpo está sustancialmente libre de respuesta HAMA observada, por otro lado, para anticuerpos quiméricos e incluso humanizados.

[0015] Adicionalmente, en este documento se describen composiciones y procedimientos que pueden usarse para identificar la α -sinucleína en las muestras. Los anticuerpos anti- α -sinucleína descritos pueden usarse para analizar la presencia de α -sinucleína en muestras de sangre humana, LCE y orina, por ejemplo, usando ensayos tipo ELISA o adaptados a superficie. Los procedimientos y composiciones descritos en este documento pueden ser de ayudar en enfermedades sinucleinopáticas, como en el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson, y pueden usarse para controlar la progresión de la enfermedad y la eficacia terapéutica.

[0016] Como se demuestra en el ejemplo 4, el anticuerpo anti- α -sinucleína de la presente invención es capaz de mejorar el rendimiento motor y el comportamiento en el laberinto en cruz elevado en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Parkinson. Estos resultados confirman el valor terapéutico esperado de los anticuerpos derivados de humanos anti- α -sinucleína de la presente invención.

[0017] Por tanto, es un objeto particular de la presente invención proporcionar el anticuerpo de la presente invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad sinucleinopática como la enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA), atrofia sistemática múltiple (ASM), insuficiencia autonómica pura (IAP), neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo 1 (NACH-1), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, distrofia neuroaxonal generalizada de inicio juvenil (enfermedad de Hallervorden-Spatz), esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática y síndrome de Down. El tratamiento comprende la administración de una concentración eficaz de un anticuerpo humano o un derivado del anticuerpo al sujeto donde el anticuerpo va dirigido hacia la α -sinucleína.

[0018] Realizaciones adicionales de la presente invención serán aparentes a partir de la descripción y de los ejemplos que se recogen a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019]

Figura 1: Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable, es decir, cadena pesada y cadena ligera kappa/lambda de los anticuerpos humanos NI-202.3G12 (A), NI-202.12F4 (B) y NI-202.3D8 (C). Para el anticuerpo humano NI-202.3D8 se han clonado dos secuencias variables de la cadena ligera VKa1 (C) y VKc1 (D), cada una de las cuales puede formar pareja con la secuencia variable de la cadena pesada VHE1 (C). Las regiones estructurales (FR) y determinantes de complementariedad (CDR) se indican con las CDR subrayadas. También se indican las regiones de unión (JH) de la cadena pesada y la región de unión de la cadena ligera (JK). Debido a la estrategia de clonación, la secuencia de aminoácidos en el extremo N-terminal de la cadena pesada y la cadena ligera puede contener alteraciones inducidas por el cebador en FR1, que sin embargo no afectan sustancialmente a la actividad biológica del anticuerpo. Para proporcionar un anticuerpo humano consenso, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del clon original se alinearon y adaptaron según las secuencias de la correspondiente región variable de la línea germinal humana de las bases de datos; véase, por ejemplo Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) alojada por el MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, RU). Se indican en negrita aquellos aminoácidos que se consideran posiblemente desviados de la secuencia de la línea germinal consenso y, por tanto, puedan ser debido al cebador de la PCR.

Figura 2: Los anticuerpos recombinantes humanos frente a α -sinucleína se dirigen a diferentes epítopes. Se recubrieron placas de ELISA con α -sinucleína recombinante de longitud completa y truncada a una concentración de recubrimiento equivalente (20 μ g/ml). (A) El anticuerpo recombinante humano frente a α -sinucleína NI-201.3G12 se une a la α -sinucleína de longitud completa pero no a las formas truncadas de α -sinucleína en un ELISA directo, lo que apunta a un epítipo de reconocimiento estructural de NI-202.3G12. (B) NI-202.12F4 recombinante se une a la α -sinucleína de longitud completa y a las formas truncadas de α -sinucleína que contienen los aminoácidos (aa) 1-60 en un ELISA directo, lo que apunta a un epítipo de NI-202.12F4 dentro de la región N-terminal anfipática repetida de la alfa sinucleína. (C) El anticuerpo LB509 se une a los fragmentos C-terminales de la α -sinucleína lo que confirma el

epítipo previamente determinado (aa 115-122). Los valores son las medias \pm EMT (n = 2-3).

- Figura 3:** Los anticuerpos humanos recombinantes frente a α -sinucleína se unen a la α -sinucleína pero no a β y γ -sinucleína en un ELISA directo. Placas de ELISA recubiertas con α , β y γ -sinucleína recombinantes a 5 concentraciones de recubrimiento equivalentes (2 μ g/ml) se incubaron con anticuerpos humanos recombinantes frente a α -sinucleína o con un anticuerpo pan sinucleína. (A) Este último anticuerpo detecta las tres proteínas sinucleína mientras que los anticuerpos humanos recombinantes frente a α -sinucleína (B) NI-202.3G12 y (C) NI-202.12F4 se unen selectivamente a la α -sinucleína. Los valores son las medias \pm EMT (n = 2-3).
- 10 **Figura 4:** El anticuerpo humano recombinante frente a α -sinucleína NI-202.12F4 se une a la α -sinucleína pero no a β ni a γ -sinucleína en un análisis de inmunotransferencia. Las α , β y γ -sinucleína recombinantes (750 ng de cada una) se sometieron a PAGE-SDS y, posteriormente, a análisis por inmunotransferencia. (A) La tinción con Coomassie muestra una concentración de proteína equivalente en PAGE-SDS. (B) NI-202.12F4 interacciona fuertemente con α -sinucleína pero no con beta ni gamma sinucleína. (C) No se detecta señal sin anticuerpo primario.
- 15 **Figura 5:** (A) El análisis por inmunotransferencia con NI-202.12F4 de extractos de cerebro de ratones no transgénicos y transgénicos para la alfa-sinucleína humana muestra una unión preferente a la α -sinucleína humana. Los extractos de cerebro de ratones de tipo salvaje y transgénicos para α -sinucleína humana se analizaron mediante inmunotransferencia con el anticuerpo LB508 específico de α -sinucleína humana, el anticuerpo del clon 42 reactivo con α -sinucleína humana y de ratón y NI-202.12F4. Mientras que el clon 42 detecta bandas prominentes que se corresponden con las α -sinucleína de ratón y humana, LB509 y NI-202.12F4 mostraban una fuerte preferencia por la α -sinucleína humana. (B) El análisis mediante inmunotransferencia con NI-202.12F4 de los extractos de cerebro muestra una unión preferente a los agregados de α -sinucleína humana. Se analizaron mediante inmunotransferencia extractos del cerebro cortical de un sujeto control sano y un paciente con demencia con cuerpos de Lewy (DCL) así como extractos de cerebro de ratones de tipo salvaje y ratones transgénicos para α -sinucleína A30P humana. NI-202.12F4 detecta las formas oligoméricas y fibrilares de los agregados de α -sinucleína en extractos de cerebro con DCL y de animales transgénicos para α -sinucleína A30P con alta sensibilidad. La unión mínima se observó a formas monoméricas de α -sinucleína en tejidos humanos o de ratón de tipo salvaje y una unión moderada en los extractos de cerebro de ratones transgénicos para α -sinucleína A30P que sobreexpresaban en gran medida α -sinucleína. Por 25 el contrario, el anticuerpo del clon 42 detecta formas monoméricas y fragmentos de α -sinucleína con una alta sensibilidad y se une muy mal a las especies agregadas de α -sinucleína.
- 30 **Figura 6:** NI-202.12F4 recombinante muestra alta afinidad de unión a la α -sinucleína humana de tipo natural y a mutantes causantes de enfermedad. Placas de ELISA se recubrieron con α -sinucleína humana de tipo natural (\bullet), 35 A53T (\blacksquare), A30P (*) and E64K (\diamond) (2 μ g/ml) y se incubaron con varias concentraciones de NI202.12F4. Las concentraciones eficaces máximas medias (ED₅₀) fueron de 321 pM para la α -sinucleína de tipo natural, 293 pM para A53T, 228 pM para A30P y 483 pM para el mutante E64K de la α -sinucleína humana.
- Figura 7:** Análisis inmunohistoquímico de unión de NI-202.12F4. NI-202.12F4 muestra una tinción prominente de la patología de α -sinucleína incluyendo inclusiones como cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy así como pequeñas 40 acumulaciones somatodendríticas y sinápticas de α -sinucleína en cortes flotantes de ratones transgénicos que expresan α -sinucleína humana A53T (A) o A30P (B) así como en tejidos de cerebro humano de enfermedad de Parkinson (C) y demencia con cuerpos de Lewy (D). El anticuerpo Syn211 detecta α -sinucleína sináptica fisiológica con una alta sensibilidad en ratones transgénicos para α -sinucleína A30P humana (E) mientras que NI-202.12F4 se une preferentemente a agregados patológicos de α -sinucleína (B). La unión de NI-202.12F4 está prácticamente ausente en los cortes de cerebro de los ratones de tipo salvaje (F) en comparación con la tinción control solo con anticuerpo secundario (G) mientras que el anticuerpo del clon 42 muestra una tinción sináptica prominente de la 45 proteína α -sinucleína de ratón (H).
- 50 **Figura 8:** El anticuerpo recombinante NI-202.12F4 muestra una unión preferente a placas recubiertas con α -sinucleína a alta densidad. Las placas de ELISA se recubrieron con α -sinucleína recombinante de longitud completa o truncada a las concentraciones indicadas y se incubaron con varias concentraciones de anticuerpos NI-202.12F4 o Syn211 mediante ELISA directo (concentraciones de recubrimiento de α -sinucleína recombinante de longitud completa o 1-60: 20 μ g/ml; \blacktriangle 2 μ g/ml; \blacktriangledown 1 μ g/ml; \blacklozenge 250 ng/ml; \square 100 ng/ml). Se determinó la concentración eficaz 55 máxima media (EC₅₀) que indicaba la potencia de los anticuerpos. (A) La alta afinidad de unión de NI-202.12F4 recombinante a α -sinucleína requiere altas densidades de recubrimiento de la proteína α -sinucleína. Mientras que se observa una EC₅₀ de 111 pM para la concentración de recubrimiento con α -sinucleína a 20 μ g/ml, los valores de EC₅₀ aumentan rápidamente con la disminución de las concentraciones de recubrimiento lo que muestra una pérdida drástica de afinidad a concentraciones más bajas de recubrimiento con α -sinucleína. Estas características apuntan a

un epítipo conformacional de NI-202.12F4 que se forma preferentemente a concentraciones altas de recubrimiento con α -sinucleína. (B) La unión de Sun211 no se ve afectada por la concentración de recubrimiento. No se observa disminución de la afinidad del anticuerpo comercial Sny211 a las densidades de recubrimiento más bajas con EC_{50} que oscilan de 335 pM para una densidad de recubrimiento con α -sinucleína de 20 μ g/ml a 99 pM para 100 ng/ml, lo que sugiera la unión a un epítipo no conformacional lineal. (C) La unión de alta afinidad de NI-202.12F4 recombinante al fragmento N-terminal de α -sinucleína que comprende los aminoácidos 1-60 requiere de densidades altas de recubrimiento. NI-202.F4 muestra una unión equivalente y dependiente de la concentración de recubrimiento a la α -sinucleína de longitud completa, así como a la molécula truncada lo que apunta a un epítipo conformacional de NI-202.12F4 que está contenido en los aminoácidos 1-60 de la proteína α -sinucleína. (D) Se recubrieron placas de avidina con péptidos biotinilados que comprendían fragmentos de 20 aminoácidos solapantes que cubrían los 60 aminoácidos N-terminales de la α -sinucleína y se incubaron con NI-202.12F4 o un anticuerpo control pan sinucleína que detectaba un epítipo en los aa 21-40. Por consiguiente, el anticuerpo control se une con fuerza al péptido 21-40 y en menor grado a los péptidos 11-30 y 31-50. Por el contrario, no se observa unión de NI-202-12F4 a ninguno de los péptidos probados, lo que sugiere que ninguno de los fragmentos N-terminales es suficiente como epítipo de NI-202.12.F4 y puede ser necesario un fragmento más largo para una unión óptima y para la formación del epítipo estructural de NI-202.12F4.

Figura 9: El tratamiento crónico con NI-202.12F4 mejora el rendimiento motor en ratones transgénicos para α -sinucleína A53T. Se trató a ratones transgénicos para α -sinucleína A53T de 10,5 meses de edad semanalmente con NI-202.12F4 o PBS (5 mg/kg; aplicación intraperitoneal). El rendimiento motor se evaluó después de dos meses de tratamiento en la prueba de la barra. (A) Los animales tratados con NI-202.12F4 necesitaron significativamente menos tiempo para girarse hacia abajo (t-giro: $1,7 \pm 0,3$ frente a $4,6 \pm 0,6$ s, $p = 0,0002$, prueba de la t de Student bilateral). (B) Los animales tratados con NI-202.12F4 también utilizaron significativamente menos tiempo para descender a la jaula ($7,3 \pm 0,9$ frente a $10,4 \pm 0,7$ s, $p = 0,012$, prueba de la t de Student bilateral).

Figura 10: El tratamiento crónico de ratones transgénicos para α -sinucleína A53T con NI-202.12F4 induce la recuperación del comportamiento en el laberinto en cruz elevado. Se trató a ratones transgénicos para A53T α -sinucleína de 10,5 meses de edad semanalmente i.p. con NI-202.12F4 o PBS a 5 mg/kg. Después de dos meses de tratamiento, se comprobó en los animales el comportamiento en el laberinto en cruz elevado. Los animales tratados con NI-202.12F4 tardaban significativamente menos tiempo y recorrían distancias significativamente más cortas en los brazos abiertos en comparación con los animales control tratados con el vehículo lo que indica una recuperación del comportamiento normal.

Figura 11: El tratamiento crónico de los ratones transgénicos para α -sinucleína A53T con NI-202.12F4 tiene como resultado la elevación de los niveles plasmáticos de la α -sinucleína A53T humana. Las muestras de plasma se prepararon a partir de ratones transgénicos para α -sinucleína A53T de 12,5 meses de edad que habían sido tratados semanalmente i.p durante 2 meses con NI-202.12F4 a 5 mg/kg o con PBS. Se extrajo sangre 24 horas después de la última aplicación. (A) Los niveles de NI-202.12F4 en plasma se determinaron usando un ELISA directo para α -sinucleína. (B) Los niveles de α -sinucleína A53T humano en plasma se determinaron usando un ELISA tipo sandwich para la α -sinucleína específica humana. Los animales tratados con NI-202.12F4 presentaban niveles significativamente elevados de α -sinucleína humana en plasma en comparación con los animales control ($24,9 \pm 4,1$ frente a $1,9 \pm 1,2$ ng/ml, $p = 0,0002$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

[0020] Las enfermedades sinucleinopáticas o sinucleinopatías son un grupo diverso de enfermedades neurodegenerativas que comparten una lesión patológica común compuesta de agregados de proteína α -sinucleína insoluble en poblaciones selectivamente vulnerables de neuronas y glía. Entre estas enfermedades se incluyen la enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), distrofia neuroanoxal generalizada de inicio juvenil (enfermedad de Hallervorden-Spatz), insuficiencia autonómica pura (IAP), atrofia sistémica múltiple (ASM) y neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo a (NACH-1). Clínicamente, se caracterizan por una disminución crónica y progresiva de las funciones motora, cognitiva, del comportamiento y autonómica, dependiendo de la distribución de las lesiones.

[0021] La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa dependiente de la edad de etiología desconocida. Se considera que la enfermedad de Parkinson esporádica es el resultado de una combinación de vulnerabilidad genética y ataques ambientales. Adicionalmente se considera que la enfermedad de Parkinson (EP)

aunque puede desencadenarse mediante mecanismos dispares, estos van seguidos de una ruta fisiopatológica compartida. Un nodo compartido es la implicación de la α -sinucleína. La relación de esta proteína con la patogénesis de la enfermedad de Parkinson ha sido establecido mediante la identificación tanto de mutaciones puntuales como de triplicación del gen en casos familiares, la localización de la α -sinucleína en los cuerpos de Lewy, una de las características patológicas principales de la enfermedad de Parkinson y la correlación de la expresión de α -sinucleína con la patología de la enfermedad en modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson. Evidencias adicionales indican que formas particulares de α -sinucleína (p .ej., mal plegada y α -sinucleína unida a dopamina) están implicadas en la enfermedad esporádica.

10 **[0022]** Las sinucleínas son proteínas pequeñas y solubles expresadas principalmente en el tejido nervioso y en determinados tumores. La familia incluye tres proteínas conocidas: α -sinucleína, β -sinucleína y γ -sinucleína. Todas las sinucleínas tienen en común un motivo de unión a lípidos α -helicoidal altamente conservado con similitud con los dominios de unión a lípidos de clase A2 de las apolipoproteínas intercambiables. Los miembros de la familia de las sinucleínas no se encuentran fuera de los vertebrados, aunque tienen cierta similitud estructural conservada con
15 proteínas vegetales «abundantes en embrión tardío». Las proteínas α y β -sinucleína se encuentran principalmente en tejido cerebral, donde se observan principalmente en las terminales presinápticas. La proteína γ -sinucleína se encuentra principalmente en el sistema nervioso periférico y en la retina, pero su expresión en tumores de mama es un marcador de la progresión tumoral. No se han determinado las funciones celulares normales de ninguna de las proteínas sinucleínas, aunque algunos datos sugieren su función en la regulación de la estabilidad y/o recambio de la membrana. Las mutaciones en la α -sinucleína se asocian con casos familiares raros de enfermedad de Parkinson de aparición temprana, y la proteína se acumula de forma anómala en la enfermedad de Parkinson, en la enfermedad de Alzheimer y en otras diversas enfermedades neurodegenerativas. Para revisión véase, por ejemplo, George, *Genome Biol.* 3 (2002), revisiones 3002.1-revisiones 3002.6 publicado online el 20 de diciembre de 2001, en cuya tabla 1 se catalogan los miembros exclusivos de la familia de las sinucleínas que actualmente se enumeran
25 en GenBank.

[0023] La α -sinucleína se identificó originalmente en cerebros humanos como la proteína precursora del componente no P-amiloide (NAC, por sus siglas en inglés) de las placas de la enfermedad de Alzheimer (EA); véase, por ejemplo, Ueda y col, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993), 1281-1286. La α -sinucleína, también denominada
30 precursor del componente no A β del amiloide de la EA (NACP, por sus siglas en inglés), es una proteína de 140 aminoácidos. La α -sinucleína aparece en su forma nativa como un ovillo aleatorio; sin embargo, los cambios en el pH, la aglomeración molecular, el contenido en metales pesados y los niveles de dopamina afectan todos a la conformación de la proteína. Se piensa que los cambios en su conformación a oligomérica, protofibrilar, fibrilar y restos agregados regulan la toxicidad de la proteína. Evidencias crecientes indican que la α -sinucleína adicionada con dopamina tiene una evolución temporal más rápida hacia la formación de fibrillas en comparación con la proteína no adicionada. Adicionalmente, la dopamina en el trasfondo de la sobreexpresión de α -sinucleína es tóxica.

[0024] En esta especificación, los términos « α -sinucleína», «alfa-sinucleína», «a-sinucleína» y «Sin» se usan indistintamente para referirse específicamente a la forma monomérica nativa de la α -sinucleína. El término « α -sinucleína» también se usa generalmente para identificar otros confómeros de α -sinucleína, por ejemplo, α -sinucleína unida a dopamina-quinona (DAQ) y oligómeros o agregados de α -sinucleína. El término « α -sinucleína» también se usa para referirse colectivamente a todos los tipos y formas de α -sinucleína. La secuencia proteica de la α -sinucleína humana es MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVAT
45 VAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQ
EGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (SEC ID N.º 1). La secuencia de aminoácidos de la α -sinucleína puede obtenerse de la bibliografía y de las bases de datos pertinentes; véase, por ejemplo, Ueda y col., *ibid.*; GenBank de swissprot: locus SYUA_HUMAN, número de acceso P37840. El componente no A β del amiloide de EA (NAC) deriva de la α -sinucleína. NAC, un dominio altamente hidrófobo dentro de la α -sinucleína, es un péptido compuesto de al menos 28 restos de aminoácidos (restos 60-87) y, opcionalmente, 35 restos de aminoácidos (restos
50 61-95). NAC muestra tendencia a formar una estructura beta laminar (Iwai y col., *Biochemistry*, 34 (1995) 10138-10145). Las secuencias de aminoácidos de NAC se describen en Jensen y col., *Biochem. J.* 310 (1995), 91-94; número de acceso a GenBank S56746 y Ueda y col., *PNAS USA* 90 (1993), 1282-11286.

[0025] α -Sinucleína desagregada o sus fragmentos, incluido NAC, significa unidades peptídicas monoméricas. La α -sinucleína desagregada o sus fragmentos son generalmente solubles y son capaces de autoagregarse para formar oligómeros solubles. Los oligómeros de α -sinucleína y sus fragmentos normalmente son solubles y están predominantemente como hélices α . La α -sinucleína monomérica puede prepararse *in vitro* disolviendo el péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La solución resultante se centrifuga para eliminar cualquier partícula insoluble. α -Sinucleína agregada o sus fragmentos, incluido NAC, significa oligómeros de α -sinucleína o sus

fragmentos que están asociados en láminas β ensambladas insolubles. α -Sinucleína desagregada o sus fragmentos, incluido NAC, significa también polímeros fibrilares. Las fibrillas normalmente son insolubles. Algunos anticuerpos se unen a la α -sinucleína soluble o a sus fragmentos o a la α -sinucleína agregada o a sus fragmentos. Algunos anticuerpos se unen a los oligómeros de α -sinucleína más fuertemente que a las formas monoméricas o a formas fibrilares. Otros anticuerpos se unen tanto a la α -sinucleína soluble como agregada o a sus fragmentos y, opcionalmente a las formas oligoméricas también.

[0026] Los anticuerpos anti- α -sinucleína humanos descritos en este documento se unen específicamente a la α -sinucleína y a sus epítopes y a diversas conformaciones de α -sinucleína y sus epítopes. Por ejemplo, en este documento se describen anticuerpos que se unen específicamente a α -sinucleína, a α -sinucleína en su forma monomérica nativa, a α -sinucleína de longitud completa y truncada y a agregados de α -sinucleína. Según se usa en este documento, la referencia a un anticuerpo que «se une específicamente», «se une selectivamente» o «se une preferentemente» a α -sinucleína se refiere a un anticuerpo que no se une a otras proteínas no relacionadas. En un ejemplo, un anticuerpo frente a α -sinucleína descrito en este documento puede unirse a la α -sinucleína o a un epítope de la misma y no muestra unión por encima de aproximadamente 1,5 veces el fondo para otras proteínas. Un anticuerpo que «se une específicamente» o «se une selectivamente» a conformeros de α -sinucleína se refiere a un anticuerpo que no se une a todas las conformaciones de α -sinucleína, es decir, no se une al menos a uno de los otros conformeros de α -sinucleína. Por ejemplo, en este documento se describen anticuerpos que pueden distinguir entre formas monoméricas y agregadas de α -sinucleína, entre α -sinucleína humana y de ratón entre α -sinucleína de longitud completa y formas truncadas así como entre α -sinucleína humana y β y γ -sinucleínas. Puesto que los anticuerpos anti- α -sinucleína humanos de la presente invención se han aislado a partir de un grupo de sujetos de edad avanzada sin signos de Parkinsonismo y que muestran una respuesta inmunitaria específica de α -sinucleína, los anticuerpos frente a α -sinucleína de la presente invención también pueden denominarse «autoanticuerpos humanos» para hacer hincapié en que dichos anticuerpos fueron expresados de hecho por sujetos y no se han aislado de, por ejemplo, una biblioteca de fagos que expresan inmunoglobulinas humanas, lo que hasta ahora representaba un procedimiento común para intentar obtener anticuerpos similares a humanos.

[0027] El término «polinucleótido» pretende abarcar un ácido nucleico singular así como ácidos nucleicos plurales y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (p. ej., un enlace amida como el que se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El término «ácido nucleico» se refiere a uno o más segmentos de cualquier ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido «aislado» se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha extraído de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un anticuerpo contenido en un vector se considera aislado a los fines de la presente invención. Entre otros ejemplos de polinucleótido aislado se incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de polinucleótidos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente invención además incluyen aquellas moléculas producidas sintéticamente. Además, el polinucleótido o ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador como un promotor, un sitio de unión a los ribosomas o un terminador de transcripción.

[0028] Según se usa en este documento, una «región codificadora» es una porción de ácido nucleico que consta de codones traducidos en aminoácidos. Aunque un «codón de parada» (TAG, TGA o TAA) no se traduce en aminoácido, puede considerarse parte de la región codificadora, aunque todas las secuencias flanqueantes, por ejemplo promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores de transcripción, intrones y similares, no son parte de la región codificadora. Dos o más regiones codificadoras de la presente invención pueden estar presentes en una única construcción polinucleotídica, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones polinucleotídicas independientes, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Adicionalmente, cualquier vector puede contener una única región codificadora, o puede comprender dos o más regiones codificadoras, por ejemplo, un único vector puede codificar independientemente una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina y una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificadoras heterólogas, fusionadas o no con un ácido nucleico que codifica una molécula de unión, un anticuerpo, o su fragmento, variante o derivado. Entre las regiones codificadoras heterólogas se incluyen sin limitaciones, elementos o motivos especializados, como un péptido señal secretor o un domino funcional heterólogo.

[0029] En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente puede incluir un promotor

y/u otros elementos de transcripción o traducción asociado de forma operativa con una o más regiones codificadoras. Una asociación operativa es cuando una región codificadora de un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de modo que se coloca la expresión del producto génico bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (como una región 5 codificadora de un polipéptido y un promotor asociado a esta) están «asociados de forma operativa» o «unidos de forma operativa» si la inducción de la función promotora tiene como resultado la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico ni interfiere con la capacidad del molde de ADN que se va a transcribir. Por tanto, una región promotora podría estar asociada 10 de forma operativa con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor era capaz de llevar a cabo la transcripción de dicho ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirija la transcripción sustancial del ADN sólo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción además del promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden estar unidos de forma operativa con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de 15 célula. En este documento se describen promotores y otras regiones de control de la transcripción adecuadas.

[0030] Los términos «anticuerpo» e «inmunoglobulina» se usan indistintamente en este documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula que se une a α -sinucleína que comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena 20 ligera. Las estructuras de la inmunoglobulina básicas en sistemas de vertebrados se conocen relativamente bien; véase, por ejemplo, Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1988).

[0031] Como se describirá con más detalle a continuación, el término «inmunoglobulina» comprende diversas 25 clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse desde un punto de vista bioquímico: Los expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (p. ej., γ 1- γ 4). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la «clase» del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización 30 funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles por los expertos en la materia a la vista de la descripción actual y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del alcance de la presente invención, la siguiente descripción estará generalmente dirigida a la clase de IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos de peso 35 molecular de aproximadamente 23.000 Daltons y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos de peso molecular 53.000-70.000. Típicamente, las cuatro cadenas se unen mediante puentes disulfuro en una configuración en forma de «Y» donde las cadenas ligeras abrazan a las cadenas pesadas desde la boca de la «Y» y continúan a través de la región variable.

40 **[0032]** Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas covalentemente entre sí y las porciones de la «cola» de las dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante puentes disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan en los hibridomas, las células B o células huésped genéticamente modificadas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde un extremo N terminal 45 en los extremos forzados de la configuración en Y hacia el extremo C-terminal de la parte inferior de cada cadena.

[0033] Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos «constante» y «variable» se usan a nivel funcional. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de ambas porciones de las cadenas ligera (V_L) y pesada (V_H) determinan el reconocimiento y especificidad 50 del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (C_L) y la cadena pesada (CH_1 , CH_2 o CH_3) confieren propiedades biológicas importantes como secreción, movilidad transplacental, unión al receptor Fc, unión a complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumentan conforme se alejan del sitio de unión al antígeno o al extremo amino terminal del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y la porción C-terminal es una región constante; los dominios CH_3 y C_L comprenden 55 realmente el extremo carboxilo terminal de las cadenas pesada y ligera, respectivamente.

[0034] Como se indica a continuación, la región variable permite al anticuerpo reconocer de forma selectiva y específica epítopes de unión en los antígenos. Es decir, el dominio V_L y el dominio V_H , o el subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo se mezclan para formar la región variable

que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria del anticuerpo forma el sitio de unión al antígeno que aparece al final de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno queda definido mediante las tres CDR de las cadenas V_H y V_L. Cualquier anticuerpo o fragmento de inmunoglobulina que contiene estructura suficiente para unirse específicamente a la α -sinucleína se indica en este documento 5 indistintamente como «fragmento de unión» o un «fragmento inmunoespecífico».

[0035] En los anticuerpos naturales, un anticuerpo comprende seis regiones hipervariables, en ocasiones denominadas «regiones determinantes de complementariedad» o «CDR» presentes en cada dominio de unión al antígeno, que son secuencias cortas de aminoácidos no contiguas que se colocan específicamente para formar el 10 dominio de unión al antígeno cuando el anticuerpo adquiere su configuración tridimensional en un entorno acuoso. Las «CDR» están flanqueadas por cuatro regiones «estructurales» o «FR» relativamente conservadas que muestran menor variabilidad intermolecular. Las regiones estructurales adoptan en gran medida una conformación β -laminar y las CDR forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura β -laminar. Por tanto, las regiones estructurales actúan formando un andamiaje que permite que las CDR se coloquen en la orientación 15 correcta mediante interacciones intercatenarias no covalentes. El dominio de unión al antígeno formado mediante la colocación de las CDR define una superficie complementaria con el epítipo del antígeno inmunoreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo relacionado. Un experto en la materia puede identificar fácilmente los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones estructurales, respectivamente, para cada región variable de cualquier cadena pesada o ligera en concreto ya que estas han sido 20 definidas con precisión; véase «Sequences of Proteins of Immunological Interest», Kabat, E., y col., U.S. Department of Health and Human Services, (1983) y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917.

[0036] En el caso en que haya dos o más definiciones de un término utilizado y/o aceptado en la técnica, se pretende que la definición del término utilizada en este documento incluya todos los significados, siempre que no se 25 establezca explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término «región determinante de complementariedad» («CDR») para describir los sitios de combinación con el antígeno no contiguos que se encuentran en la región variable de ambos polipéptidos de las cadenas pesada y ligera. Esta región en particular ha sido descrita por Kabat y col., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequences of Proteins of Immunological Interest» (1983) y por Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, donde las definiciones incluyen 30 solapamientos o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de cualquier definición para denominar a una CDR de un anticuerpo o sus variantes se pretende que esté dentro del alcance del término según se define y usa en este documento. Los restos de aminoácidos apropiados que abarcan las CDR según se definen en cada una de las referencias citadas anteriormente se establecen a continuación en la tabla 1 de forma comparativa. El número exacto de restos que abarca una CDR en particular variará dependiendo de 35 la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de forma rutinaria qué restos contiene una región hipervariable o CDR en concreto del subtipo IgG humano de un anticuerpo dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Tabla 1: Definiciones de CDR1

40

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96
¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la tabla 1 coinciden con las convenciones de numeración establecidas por Kabat y col. (véase más adelante).		

[0037] Kabat y col. también definen un sistema de numeración para las secuencias de los dominios variables que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar sin ambigüedad este sistema de 45 «numeración de Kabat» a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Según se usa en este documento, la «numeración de Kabat» hace referencia al sistema de numeración establecido por Kabat y col., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequence of Proteins of Immunological Interest» (1983). Siempre que no se especifique otra cosa, las referencias a la numeración de las posiciones específicas de los restos de aminoácidos en un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de la presente invención se hacen según el sistema de numeración de Kabat.

50

[0038] Entre los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno, fragmentos inmunospecíficos, variantes o derivados de la invención se incluyen, pero sin limitaciones, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados, murinizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de unión al epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' o F(ab')₂, Fd, Fv, Fs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos mediante puentes disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden dominios V_L o V_H, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y anticuerpos antiidiotipo (anti-Id) (incluidos, p. ej., anticuerpos anti-Id frente a los anticuerpos descritos en este documento). Las moléculas de ScFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo en la patente de EE. UU. 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, 5 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

[0039] En una realización, el anticuerpo de la presente invención no es IgM ni un derivado de misma con estructura pentavalente. En especial, en aplicaciones específicas de la presente invención, especialmente durante el uso terapéutico, las IgM son menos útiles que las IgG y otros anticuerpos bivalentes o las correspondientes 15 moléculas de unión ya que las IgM, debido a su estructura pentavalente y a la falta de maduración de la afinidad, a menudo muestran reactividades cruzadas inespecíficas y de muy baja afinidad.

[0040] En una realización especialmente preferida, el anticuerpo de la presente invención no es un anticuerpo policlonal, es decir, consiste sustancialmente en una especie de anticuerpo en particular en vez de ser una mezcla 20 obtenida a partir de una muestra de inmunoglobulinas plasmáticas.

[0041] Los fragmentos de anticuerpo, incluidos los anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender las regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una porción de las siguientes regiones: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención los fragmentos de unión a α -sinucleína que también 25 comprenden cualquier combinación de regiones variables con una región bisagra y dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos o sus fragmentos inmunospecíficos de la presente invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo pájaros y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, conejo, cabra, cobaya, camello, llama, caballo o pollo. En otra realización, la región variable puede ser de origen condrictoide (p. ej., de tiburones).

[0042] En otro aspecto, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano aislado a partir de un humano. Opcionalmente, la región variable del anticuerpo humano se alinea y adopten según las secuencias de la correspondiente región variable de la línea germinal humana en la base de datos; véase, por ejemplo Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) alojada por el MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, 35 RU). Por ejemplo, los aminoácidos considerados como posiblemente desviados con respecto a la secuencia de la línea germinal verdadera podrían deberse a las secuencias del cebador de PCR incorporadas durante el proceso de clonación. En comparación con los anticuerpos similares a humanos obtenidos artificialmente como fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFV) a partir de una biblioteca de anticuerpos de despliegue de fagos o de ratones xenogénicos, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención se caracteriza porque (i) se obtiene usando 40 la respuesta inmunitaria humana en lugar de a partir de sustitutos animales, es decir, el anticuerpo se ha generado en respuesta a una α -sinucleína natural en su conformación relevante en el organismo humano; (ii) protege al individuo o, al menos, es significativo para la presencia de α -sinucleína y (iii) puesto que el anticuerpo es de origen humano, se minimizan los riesgos de reactividad cruzada frente a autoantígenos. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, los términos «anticuerpo monoclonal humano», «autoanticuerpo monoclonal humano», 45 «anticuerpo humano» y similares se usan para indicar una molécula que se une a α -sinucleína que es de origen humano, es decir, que se ha aislado de una célula humana, tal como una célula B o un hibridoma de la misma, o cuyo ADNc se ha clonado directamente a partir del ARNm de una célula humana, por ejemplo una célula B de memoria humana. Un anticuerpo humano sigue siendo «humano» incluso si se han hecho sustituciones en dicho anticuerpo, por ejemplo, para mejorar sus características de unión.

[0043] Los anticuerpos derivados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más abajo, y, por ejemplo, en la patente de EE. UU N. ° 5.939.589 de Kucherlapati y col., se denominan anticuerpos 55 similares a humanos para distinguirlos de los anticuerpos realmente humanos de la presente invención.

[0044] Según se usa en este documento, el término «anticuerpo murinizado» o «inmunoglobulina murinizada» se refiere a un anticuerpo que comprende una o más CDR de un anticuerpo humano de la presente invención, y una región estructural humana que contiene sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos basados en una secuencia de un anticuerpo murino. La inmunoglobulina humana que proporciona las CDR se denomina la «original»

o «aceptora» y el anticuerpo monoclonal de ratón que proporciona los cambios estructurales se denomina el «donante». No es necesario que presente regiones constantes, aunque si las tiene, normalmente son sustancialmente idénticas a las regiones constantes del anticuerpo de ratón, es decir, al menos aproximadamente el 85-90%, preferiblemente aproximadamente el 95% o más idénticas. Por tanto, en algunas realizaciones, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina humana murinizada de longitud completa contiene una región constante de ratón, CDR humanas y una región estructural sustancialmente humana que tiene varias sustituciones de aminoácidos «murinizados». Típicamente, un «anticuerpo murinizado» es un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable murinizada y/o una cadena pesada variable murinizada. Por ejemplo, un anticuerpo murinizado podría no abarcar un anticuerpo quimérico típico, por ejemplo, debido a que la región variable completa de un anticuerpo quimérico no es de ratón. Un anticuerpo modificado que ha sido «murinizado» mediante el proceso de «murinización» se une al mismo antígeno que el anticuerpo original que proporciona las CDR y normalmente es menos inmunogénico en ratones, en comparación con el anticuerpo original.

[0045] Según se usa en este documento, el término «porción de cadena pesada» incluye secuencias de aminoácidos derivados de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de los siguientes dominios: un dominio CH1, un dominio bisagra (p. ej., región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de unión utilizado en la invención puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH3, o una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3. Adicionalmente, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede carecer al menos una porción de un dominio CH2 (p. ej., todo o parte de un dominio CH2). Como se estableció anteriormente, un experto en la materia entenderá que estos dominios (p. ej., las porciones de la cadena pesada) pueden modificarse de modo que varíen en secuencia de aminoácidos con respecto a la molécula de inmunoglobulina natural.

[0046] En determinados anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en este documento, las porciones de la cadena pesada de una cadena polipeptídica de un multímero son idénticas a las de una segunda cadena polipeptídica del multímero. Alternativamente, los monómeros que contienen porciones de la cadena pesada de la invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo o dianticuerpo biespecífico.

[0047] En otra realización, los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en este documento están compuestos por una cadena polipeptídica sencilla, como un scFv, y tienen que expresarse intracelularmente (intraanticuerpos) para obtener sus posibles aplicaciones terapéuticas y diagnósticas *in vivo*.

[0048] Las porciones de la cadena pesada de un polipéptido de unión para su uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de la cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de la cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

[0049] Según se usa en este documento, el término «porción de cadena ligera» incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferiblemente, la porción de cadena ligera comprende al menos un dominio VL o CL. Se piensa que el tamaño mínimo de un péptido o epítipo polipeptídico para un anticuerpo es de aproximadamente de cuatro a cinco aminoácidos. Los péptidos o epítopos polipeptídicos preferiblemente contienen al menos siete, más preferiblemente al menos nueve y, lo más preferible, entre de al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. Puesto que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, no es necesario que los aminoácidos que comprende un epítipo estén contiguos y, en algunos casos, puede incluso que no estén en la misma cadena peptídica. En la presente invención, un péptido o epítipo polipeptídico reconocido por los anticuerpos de la presente invención contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferiblemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos

contiguos o no contiguos de α -sinucleína.

[0050] Por «unido específicamente» o «reconocido específicamente», usados indistintamente en este documento, generalmente se entiende que una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo se une a un epítotope a través de su dominio de unión al antígeno y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítotope. Según esta definición, se dice que un anticuerpo se «une específicamente» a un epítotope cuando se une a dicho epítotope a través de su dominio de unión al antígeno más fácilmente que si se uniera a un epítotope aleatorio no relacionado. El término «especificidad» se usa en este documento para calificar la afinidad relativa a la que un determinado anticuerpo se une a un determinado epítotope. Por ejemplo, puede considerarse que el anticuerpo «A» tiene una especificidad mayor por un epítotope determinado que el anticuerpo «B» o puede decirse que un anticuerpo «A» se une a un epítotope «C» con una especificidad más alta que la que tiene para el epítotope relacionado «D».

[0051] Cuando se presenta, el término «características inmunológicas de unión» u otras características de unión de un anticuerpo con un antígeno, en todas sus formas gramaticales, se refiere a la especificidad, afinidad, reactividad cruzada y otras características de unión de un anticuerpo.

[0052] Por «unido preferentemente», se entiende que la molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une específicamente a un epítotope más fácilmente de lo que podría unirse a un epítotope relacionado, similar, homólogo o análogo. Por tanto, un anticuerpo que se «une preferentemente» a un determinado epítotope podría unirse más probablemente a dicho epítotope que a otro epítotope relacionado, incluso si este anticuerpo puede presentar reacción cruzada con el epítotope relacionado.

[0053] A modo de ejemplo no limitante, una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, puede considerarse que se une a un primer epítotope preferentemente si se une a dicho epítotope con una constante de disociación (K_D) que es menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítotope. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une al primer epítotope con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítotope. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítotope preferentemente si se une al primer epítotope con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítotope.

[0054] En otro ejemplo no limitante, una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, puede considerarse que se une a un primer epítotope preferentemente si se une al primer epítotope con una velocidad de disociación (k_{off}) que es menor que la k_{off} del anticuerpo para el segundo epítotope. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítotope preferentemente si se une al primer epítotope con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la k_{off} del anticuerpo para el segundo epítotope. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítotope preferentemente si se une al primer epítotope con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la k_{off} del anticuerpo para el segundo epítotope.

[0055] Puede decirse que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado descrito en este documento se une a α -sinucleína o a un fragmento o variante de la misma, con una velocidad de disociación (k_{off}) igual o menor a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-3} s^{-1} . Más preferiblemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a α -sinucleína o a un fragmento o variante de la misma con una velocidad de disociación (k_{off}) menor o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-7} s^{-1} .

[0056] Se dice que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado descrito en este documento se une a α -sinucleína o a un fragmento o variante de la misma, con una velocidad de disociación (k_{off}) mayor o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Más preferiblemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a α -sinucleína o a un fragmento o variante de la misma, con una velocidad de disociación (k_{off}) mayor o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[0057] Se dice que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia a un epítotope determinado si se une preferentemente a dicho epítotope hasta el punto de bloquear, en algún grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítotope. La inhibición competitiva puede determinarse mediante cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, ensayos de tipo ELISA competitivos. Puede decirse que un anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión del anticuerpo de referencia a un epítotope determinado en al menos el 90%, al menos el 80%, al menos el 70%, al menos el 60% o al menos el 50%.

[0058] Según se usa en este documento, el término «afinidad» se refiere a una medida de la fuerza de unión de un epítoto individual con la CDR de una molécula de unión, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina; véase, por ejemplo., Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, (1988) 5 páginas 27-28. Según se usa en este documento, el término «avidez» se refiere a la estabilidad en conjunto del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la fuerza funcional de combinación de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno; véanse, por ejemplo, las páginas 29-34 de Harlow. La avidez se relaciona tanto con la afinidad de moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopes específicos como con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un 10 anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítoto altamente repetitiva, como un polímero, sería de alta avidez. La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse experimentalmente usando cualquier método adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky y col., «Antibody-Antigen Interactions» en *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992) y los procedimientos descritos en este 15 documento. Entre las técnicas generales para determinar la afinidad de un anticuerpo por un antígeno se incluyen ELISA, RIA y resonancia de plasmones superficiales. La afinidad determinada de una interacción entre anticuerpo y antígeno en particular puede variar si se mide en condiciones diferentes de, por ejemplo, concentración salina, pH, etc. Por tanto, las determinaciones de la afinidad y de otros parámetros de unión al antígeno, por ejemplo, K_D o IC_{50} , se hacen preferiblemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno y con un tampón estandarizado.

20 **[0059]** Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Según se describe en este documento, el término «reactividad cruzada» hace referencia a la capacidad de un anticuerpo, específico de un antígeno, para reacciona con un segundo antígeno; una medida de la relación entre dos 25 sustancias antigénicas diferentes. Por tanto, un anticuerpo presenta reacción cruzada si se une a un epítoto que no es el que indujo su formación. El epítoto de reacción cruzada contiene, generalmente, muchas de las características estructurales complementarias semejantes a las del epítoto inductor y, en algunos casos, puede encajar realmente mejor que el original.

30 **[0060]** Por ejemplo, determinados anticuerpos tienen cierto grado de reactividad cruzada, de modo que se unen a epítopes relacionados, aunque no idénticos, por ejemplo, epítopes con una identidad de al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 65%, al menos el 60%, al menos el 55% y al menos el 50% (según se calcula usando procedimientos conocidos en la materia y descritos en este documento) con un epítoto de referencia. Puede decirse que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad 35 cruzada si no se une a epítopes con una identidad de menos del 95%, menos del 90%, menos del 85%, menos del 80%, menos del 75%, menos del 70%, menos del 65%, menos del 60%, menos del 55% y menos del 50% (según se calcula usando procedimientos conocidos en la materia y descritos en este documento) con respecto a un epítoto de referencia. Un anticuerpo puede considerarse «altamente específico» por un determinado epítoto si no se una a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de dicho epítoto.

40 **[0061]** Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a α -sinucleína. Entre las afinidades de unión preferidas se incluyen aquellas con una constante de disociación o K_D de 45 menos de 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M.

[0062] Como se indicó previamente, las estructuras de subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Según se usa en este 50 documento, el término «dominio V_H » incluye el dominio variable amino terminal de una cadena pesada de la inmunoglobulina y el término «domino $CH1$ » incluye la primera región constante (la más amino terminal) de una cadena pesada de la inmunoglobulina. El dominio $CH1$ se encuentra adyacente al dominio V_H y es aminoterminal con respecto a la región bisagra de una molécula de cadena ligera de la inmunoglobulina.

55 **[0063]** Según se usa en este documento, el término «dominio $CH2$ » incluye la porción de una molécula de cadena pesada que abarca, por ejemplo, desde aproximadamente el resto 244 al resto 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (restos 244 a 260, según el sistema de numeración de Kabat, y residuos 231 a 340 según el sistema de numeración de la UE; véase Kabat EA y col. *op. cit.*). El dominio $CH2$ es exclusivo porque no se empareja estrechamente con ningún otro dominio. Más bien, se interponen dos cadenas de hidratos de

carbono ramificados con sitios N de glucosilación entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 hasta el extremo C terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 restos.

5 **[0064]** Según se usa en este documento, el término «región bisagra» incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 restos y es flexible lo que permite que las dos regiones N terminales de unión al antígeno se muevan independientemente. Las regiones bisagra pueden subdividirse en tres dominios diferentes: dominios bisagra superior, medio e inferior; véase Roux y col., J. Immunol 161 (1998), 4083.

10

[0065] Según se usa en este documento, el término «enlace disulfuro» incluye en enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína contiene un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas de IgG naturales, las regiones CH1 y CL están unidas mediante enlaces disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en las posiciones correspondientes con 239 y 242 según el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229 según el sistema de numeración de la UE).

[0066] Según se usa en este documento, los términos «unido», «fusionado» o «fusión» se usan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes, por cualquier método incluyendo conjugación química o métodos recombinantes. Una «fusión en marco» se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abierta (ORF) de polinucleótidos para formar un ORF continuo más largo, de manera que se mantiene el marco de lectura traduccional correcto del OFR original. Por tanto, una proteína de fusión recombinante es una proteína única que contiene dos o más segmentos que se corresponden con los polipéptidos codificados por los ORF originales (cuyos segmentos no están unidos de este modo en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace continuo de este modo a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden separarse física o espacialmente mediante, por ejemplo, una secuencia enlazadora en marco. Por ejemplo, pueden fusionarse en marco polinucleótidos que codifican las CDR de una región variable de inmunoglobulina, pero estar separados por un polinucleótido que codifica al menos una región estructura de la inmunoglobulina o regiones CDR adicionales siempre que las CDR «fusionadas» se traduzcan conjuntamente como parte de un polipéptido continuo.

30

[0067] Según se usa en este documento, el término «muestra» se refiere a cualquier material biológico obtenido a partir de un sujeto o paciente. En un aspecto, una muestra puede comprender sangre, líquido cerebroespinal («LCE») u orina. En otros aspectos, una muestra puede comprender sangre completa, plasma, estar enriquecida en células B de muestras de sangre y células cultivadas (p. ej., células B de un sujeto). Una muestra también puede incluir una biopsia o muestra de tejido, como tejido nervioso. Aún en otros aspectos, una muestra puede comprender células completas y/o un lisado de las células. Las muestras de sangre pueden extraerse mediante procedimientos bien conocidos en la materia. En un aspecto, el sedimento puede resuspenderse mediante agitación a 4°C en 200 µl de tampón (Tris 20 mM, pH 7,5, Nonidet al 0,5%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, NaCl 0,1 M, inhibidor de proteasas IX de Sigma e inhibidores de fosfatadas IX de Sigma 1 y 2). La suspensión puede mantenerse en hielo durante 20 minutos con agitación intermitente. Tras centrifugar a 15 000 g durante 5 minutos a aproximadamente 4°C, pueden conservarse alícuotas del sobrenadante a aproximadamente -70°C.

[0068] Según se usa en este documento, los términos «tratar» o «tratamiento» se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio fisiológico o trastorno no deseado, como el desarrollo de Parkinsonismo. Entre los resultados clínicos beneficiosos o deseados se incluyen, pero sin limitaciones, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (es decir, sin empeoramiento) del estado de la enfermedad, retraso o reducción de la progresión de la enfermedad, mejoría o paliación del estado de la enfermedad y remisión (total o parcial) tanto detectable como indetectable. «Tratamiento» también puede incluir prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Entre aquellos que necesitan tratamiento se incluye tanto a los que ya presentan la afección o trastorno como a los que son propensos a dicha afección o trastorno o aquellos en los que la manifestación de la afección o trastorno se va a prevenir.

[0069] Por «sujeto», «individuo», «animal» «paciente» o «mamífero» se entiende todo sujeto, especialmente un sujeto mamífero, por ejemplo, un paciente humano para el cual se desea un diagnóstico, pronóstico, prevención o terapia.

II. Anticuerpos

5 [0070] La presente invención generalmente se refiere a anticuerpos humanos anti- α -sinucleína y a sus fragmentos de unión al antígeno según se caracteriza en las reivindicaciones, que preferiblemente muestran las características inmunológicas de unión y/o las propiedades biológicas que se destacan para el anticuerpo NI-202-12F4 ilustradas en los ejemplos. Según la presente invención los anticuerpos monoclonales humanos específicos de α -sinucleína se clonaron a partir de un grupo de sujetos de edad avanzada.

10 [0071] En el transcurso de los experimentos realizados según la presente invención los intentos iniciales de clonar anticuerpos específicos de α -sinucleína fallaron ya que prácticamente en todas las ocasiones se obtuvieron clones falsos positivos. El estudio adicional de estos clones mostró que se producían anticuerpos que reconocían proteínas de *E. coli*. Para superar este problema, se cribaron los anticuerpos en paralelo en medios condicionados de cultivos de células B de memoria humanas por su capacidad de unión a placas recubiertas de monómeros de alfa sinucleína de longitud completa y ausencia de unión a proteínas de *E. coli* y a albúmina sérica bovina (BSA). En particular, el medio condicionado de células B se preabsorbió con proteínas de *E. coli* antes de someterlo a un ensayo de tipo ELISA para el cribado de anticuerpos humanos que se unen a α -sinucleína.

15 [0072] Los intentos iniciales de aislar anticuerpos específicos se centraron en un grupo de sujetos humanos con alta actividad plasmática de unión a α -sinucleína, que sugería niveles elevados en plasma de anticuerpos anti α -sinucleína en circulación. De forma inesperada, en estos intentos no se consiguió obtener células B de memoria humanas específicas de α -sinucleína y los anticuerpos descritos en la invención actual se aislaron a partir de
20 conjuntos de sujetos con baja reactividad plasmática a la α -sinucleína.

[0073] Gracias a esta medida pudieron aislarse varios anticuerpos. Los anticuerpos seleccionados se analizaron adicionalmente para la determinación de la clase y la subclase de la cadena ligera. A continuación, se transcribieron los mensajeros de anticuerpos relevantes seleccionados a partir de cultivos de células B mediante RT-PCR, se
25 clonaron y combinaron en vectores de expresión para su producción recombinante; véanse los ejemplos adjuntos. La expresión recombinante de los anticuerpos humanos en células HEK293 o CHO y la posterior caracterización de sus especificidades de unión a α -sinucleína de longitud completa y a sus formas truncadas (figura 2) mediante inmunotransferencia (figura 4) así como a β y γ -sinucleína (figura 3), confirmaron que por primera vez se habían clonado anticuerpos humanos que eran altamente específicos para α -sinucleína y reconocían epítopes diferentes
30 dentro de la proteína α -sinucleína.

[0074] Por tanto, la presente invención se refiere en general a un anticuerpo monoclonal humano natural anti- α -sinucleína aislado y a sus fragmentos de unión, derivados y variantes según se caracteriza en las reivindicaciones. Como se demuestra en los ejemplos y se muestra en la figura 3, el anticuerpo monoclonal humano anti- α -sinucleína
35 de la presente invención se caracteriza preferiblemente porque se une específicamente a la α -sinucleína en comparación con β -sinucleína y γ -sinucleína. De forma ventajosa, el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a α -sinucleína en la forma monomérica nativa y/o en la forma oligomérica o agregada. Además, el anticuerpo humano anti- α -sinucleína de la presente invención puede caracterizarse adicionalmente por su capacidad para reconocer la α -sinucleína en inmunotransferencia; véase la figura 4.

40 [0075] En una realización, la presente invención está dirigida a un anticuerpo anti- α -sinucleína, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivados, donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítope de la α -sinucleína que el anticuerpo de referencia NI-202.12F4. Como se muestra en los ejemplos, el anticuerpo NI-202.3G12 se une a la α -sinucleína de tipo natural (*wilde type*, wt) pero no a las formas truncadas de α -sinucleína en un ELISA directo, lo que apunta a un epítope estructural de NI-202.3G12, véase la figura 2^a. Por el contrario, el anticuerpo NI-202.12F4 se une a formas truncadas de α -sinucleína que contienen la región repetida anfipática N-terminal (aminoácidos 1-60) en un ELISA directo, lo que apunta a un epítope N-terminal de NI-202.12F4; véase la figura 2B. Además, los resultados preliminares de los ensayos ELISA directos realizados con el anticuerpo NI-202.3D8 mostraron que NI-202.3D8 reconoce específicamente el extremo C-terminal de α -sinucleína,
45 50 preferiblemente los aminoácidos 96-140.

[0076] Adicionalmente, sin pretender estar condicionados por las observaciones experimentales iniciales experimentos preliminares adicionales han permitido asumir que el anticuerpo NI-202.3D8 preferentemente se une a monómeros de α -sinucleína en lugar de a las fibrillas en un ensayo ELISA directo con el anticuerpo mientras que los
55 anticuerpos NI-202.12F4 y NI-202.3G12 preferentemente se unen a agregados o fibrillas de α -sinucleína sobre la forma monomérica de α -sinucleína. Por tanto, la presente invención proporciona un conjunto de anticuerpos humanos anti- α -sinucleína con especificidades diferentes, que son especialmente útiles para fines diagnósticos y terapéuticos.

[0077] En una realización, el anticuerpo de la presente invención muestra las propiedades de unión del anticuerpo ejemplo NI-202.12F4 como se describe en cualquiera de los ejemplos 1 a 5. Por ejemplo, en una realización el anticuerpo anti- α -sinucleína de la presente invención reconoce preferentemente a la α -sinucleína humana en lugar de a la de ratón, en particular cuando se analiza según el ejemplo 3. Además, o alternativamente, el anticuerpo anti- α -sinucleína de la presente invención reconoce preferentemente formas agregadas o mal plegadas de α -sinucleína en lugar de formas monoméricas fisiológicas, en particular cuando se analiza según el ejemplo 3. Además, o alternativamente, el anticuerpo anti- α -sinucleína de la presente invención se une a mutantes de la α -sinucleína humana causantes de enfermedad, en particular los descritos en el ejemplo 3. En este contexto, las especificidades de unión pueden estar en el intervalo mostrado para el anticuerpo ejemplo NI-202.12F4 en la figura 5, es decir, 10 teniendo concentraciones eficaz máxima medias (EC_{50}) de aproximadamente 100 a 1000 pM, preferiblemente una EC_{50} de aproximadamente 100 a 500 pM para la α -sinucleína wt o un mutante de la misma causante la enfermedad.

[0078] Por tanto, el anticuerpo anti- α -sinucleína de la presente invención preferiblemente se une de forma preferente a formas patológicas de α -sinucleína en el cerebro, por ejemplo, agregados patológicos de α -sinucleína 15 como se ejemplifica mediante la inmunotransferencia y la tinción inmunohistoquímica descritas en el ejemplo 3. Por consiguiente, en otra realización adicional o alternativa el anticuerpo anti- α -sinucleína de la presente invención preferiblemente se une a un epítoto conformacional de la α -sinucleína humana y no se une significativamente a fragmentos derivados del extremo N-terminal de α -sinucleína que conste de los aminoácidos 1-20, 21-40, 41-60, 11-30 o 31-50.

[0079] La presente invención también se refiere a un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivados, donde el anticuerpo comprende un dominio de unión al antígeno idéntico al del anticuerpo NI-202.12F4.

[0080] En la presente invención además se ponen varios ejemplos de moléculas de unión, por ejemplo, 25 anticuerpos y sus fragmentos de unión, que se caracterizan por comprender en su región variable, por ejemplo, en el dominio de unión, al menos las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la región variable V_H y V_L que comprenden cualquier de las secuencias de aminoácidos mostradas en la figura 1B. Las secuencias de nucleótidos correspondientes que codifican las regiones variables identificadas anteriormente se establecen en la lista de secuencias adjunta. También se indican en el listado de secuencias adjuntas un conjunto de ejemplos de 30 CDR de las secuencias de aminoácidos anteriores de la región V_H y V_L como se muestran en la figura 1B. Sin embargo, como se describe a continuación, el experto en la materia es conocedor de hecho de que además, o alternativamente, pueden usarse CDR que difieren en sus secuencias de aminoácidos de las establecidas en la figura 1B en uno, dos o tres o incluso más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3.

[0081] En una realización, el anticuerpo de la presente invención es cualquiera de los anticuerpos que comprenden 35 una secuencia de aminoácidos de las regiones V_H y V_L como se muestra en la figura 1B. Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, derivado o variante, que compite por la unión a α -sinucleína con al menos uno de los anticuerpos que tienen las regiones V_H y V_L como se muestra en la figura 1B. Estos anticuerpos pueden también ser humanos, en particular para aplicaciones 40 terapéuticas. Alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo murino, murinizado y anticuerpo quimérico murino-humano, que son especialmente útiles para los procedimientos diagnósticos y los estudios en animales.

[0082] Como se mencionó anteriormente, debido a su generación tras una respuesta inmunitaria humana, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención reconocerá epítopes que son de especial importancia 45 fisiológica y que podrían no estar accesibles o ser menos inmunogénicos en caso de procesos de inmunización para la generación de, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón y en el cribado *in vitro* de bibliotecas de despliegue de fagos, respectivamente. Por consiguiente, es prudente estipular que el epítoto del anticuerpo humano anti- α -sinucleína de la presente invención es exclusivo y no existe ningún otro anticuerpo que sea capaz de unirse al epítoto reconocido por el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. Por tanto, la presente invención 50 está dirigida a un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivados, donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítoto de la α -sinucleína que el anticuerpo de referencia NI-202.12F4.

[0083] La competición entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que la inmunoglobulina a prueba 55 inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, como la α -sinucleína. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitivos: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competición tipo sandwich; véase Stahlí y col., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; EIA con biotina-avidina directo en fase sólida; véase Kirkland y col., *J. Immunol* 137 (1986), 3614-3619 y Cheung y col., *Virology* 176 (1990), 546-552; ensayo directo marcado en fase sólida, ensayo tipo sandwich marcado directo en fase sólida; véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory*

Manual, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA marcado directo en fase sólida usando marcaje con I¹²⁵; véase Morel y col, Molec. Immunol. 25 (1988), 7-15 y Moldenhauer y col., Scand. J. Immunol. 32 (1990), 77-82. Típicamente, este ensayo supone el uso de α -sinucleína purificada o sus agregados unidos a una superficie sólida o a células portadoras de cualquiera de estos, una inmunoglobulina de ensayo sin marcar y una inmunoglobulina de referencia
5 marcada, es decir, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcaje unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Normalmente la inmunoglobulina de ensayo se expresa en exceso. Preferiblemente, el ensayo de unión competitivo se realiza en las condiciones descritas para el ensayo de tipo ELISA en los ejemplos adjuntos. Los anticuerpos identificados mediante el ensayo de competición (anticuerpos en competición) incluyen anticuerpos que
10 se unen al mismo epítoto que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítoto adyacente suficientemente próximo al epítoto al que se une el anticuerpo de referencia para que se produzca un impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo en competición está presente en exceso, inhibirá la unión de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos el 50% o el 75%. Por tanto, la presente invención está además dirigida a un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivados, donde el anticuerpo
15 inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia NI-202.12F4 a la α -sinucleína.

[0084] En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consta esencialmente o consta de una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (V_H) en la que las regiones V_H-CDR1, V_H-CDR2 y V_H-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos V_H-CDR1,
20 V_H-CDR2 y V_H-CDR3 mostrados en la figura 1B.

[0085] En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consta esencialmente o consta de una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina (V_L) en la que las regiones V_L-CDR1, V_L-CDR2 y V_L-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos V_L-CDR1, V_L-CDR2
25 y V_L-CDR3 mostrados en la figura 1B.

[0086] Una inmunoglobulina o sus ADNc codificadores pueden modificarse adicionalmente. Por tanto, en una realización adicional, el procedimiento de la presente descripción comprende cualquiera de las otras etapas de producción de un anticuerpo quimérico, anticuerpo murinizado, anticuerpo de cadena sencilla, fragmento Fab,
30 anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo marcado o un análogo de cualquiera de ellos. Los procedimientos correspondientes son conocidos para el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane «Antibodies, A Laboratory Manual», CSH Press, Cold Spring Harbor (1998). Cuando se obtienen derivados de dichos anticuerpos mediante técnicas de despliegue de fagos, puede usarse resonancia de plasmones superficiales como la empleada en el sistema BIAcore para aumentar la eficiencia de los anticuerpos de fagos que se unen al mismo epítoto que el de cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento (Schier, Human
35 Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe por ejemplo, en la solicitud internacional WO89/09622. Los procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en la solicitud europea EP-A1 0 239 400 y en la solicitud internacional WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos que se utilizarán según la presente
40 invención son los denominados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos como anticuerpos similares a humanos en ratones se describe en, por ejemplo, las solicitudes internacionales W091/10741, W094/02602, W096/34096 y W096/33735. Como se describe anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en diversas formas además de anticuerpos completos; que incluyen, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como en cadenas sencillas; véase, por ejemplo, la solicitud internacional
45 WO88/09344.

[0087] Los anticuerpos de la presente invención o sus correspondientes cadenas de inmunoglobulina pueden modificarse adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la materia, por ejemplo, usando deleciones, inserciones, sustituciones, adiciones y/o recombinaciones de aminoácidos y/o cualesquiera otra
50 modificación conocida en la materia sola o en combinación. Los procedimientos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN que subyace a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos para el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención
55 incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más de los aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de la cadena lateral, modificaciones de la estructura molecular y modificaciones de los extremos N y C-terminales incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación y la unión de restos de hidratos de carbono o lípidos, cofactores y similares. Asimismo, la presente invención abarca la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo amino terminal fusionado a una

molécula heteróloga como un ligando inmunoestimulador en el término carboxilo; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO00/30680 para obtener la información técnica correspondiente.

- [0088]** Según lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica el anticuerpo o la molécula de unión equivalente de la presente invención, en caso del anticuerpo preferiblemente al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. Típicamente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) del V_H y/o V_L de la región variable de dicho anticuerpo.
- 10 **[0089]** El experto en la materia apreciará con facilidad que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable descrito anteriormente puede usarse para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad y función biológica deseadas. Por tanto, la presente invención también abarca polipéptidos y anticuerpos que comprenden al menos una región CDR del dominio variable descrito anteriormente y que de forma ventajosa tienen sustancialmente las mismas, o similares, propiedades de unión que el anticuerpo descrito en los ejemplos adjuntos. El experto en la materia sabe que la afinidad de unión puede potenciarse haciendo sustituciones de aminoácidos dentro de las CDR y dentro de los bucles hipervariables (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) que parcialmente solapan con los CDR como se define en Kabat; véase, por ejemplo, Riechmann, y col, Nature 332 (1988), 323-327. Por tanto, la presente descripción también se refiere a anticuerpos en los que una o más de las CDR mencionadas comprenden uno o más, preferiblemente no más de dos sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, el anticuerpo de la invención comprende una o ambas de estas cadenas de inmunoglobulina o las tres CDR de las regiones variables como se establece en la figura 1.

- [0090]** Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención, según es sabido para los expertos en la materia, pueden comprender una región constante que media en una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante del anticuerpo puede activar el sistema de complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a los receptores en diversas células a través de la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) de una célula. Existen varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc de las superficies celulares desencadena varias respuestas biológicas diversas e importantes que incluyen la agregación y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpo, aclaramiento de complejos inmunes, lisis de células diana recubiertas de anticuerpos mediante células citotóxicas (denominado citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentar y control de la producción de inmunoglobulinas.

- [0091]** Por consiguiente, determinadas realizaciones de la presente invención incluyen un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado, en el que se ha delecionado o alterado de alguna otra forma al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante de modo que se proporcionen las características bioquímicas deseadas como reducción de las funciones efectoras, la capacidad de dimerización no covalente, aumento de la capacidad para localizar el sitio de agregación y depósito de α -sinucleína, reducción de la semivida en suero o aumento de la semivida en suero cuando se compara con un anticuerpo completo no alterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, determinados anticuerpos para su uso en los procedimientos diagnóstico y de tratamiento descritos en este documento son anticuerpos con dominios delecionados que comprenden una cadena polipeptídica similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de la cadena pesada. Por ejemplo, en determinados anticuerpos, se delecionará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se delecionará todo o parte del dominio CH2. En otras realizaciones, determinados anticuerpos para su uso en los procedimientos diagnósticos y de tratamiento descritos en este documento tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada de la IgG, que está alterada para eliminar la glucosilación, referidos en otro punto de este documento como anticuerpos aglucosilados o «aglu». Dichos anticuerpos «aglu» pueden prepararse enzimáticamente así como mediante ingeniería genética aplicada a los sitios de glucosilación consenso en la región constante. Sin ceñirse a la teoría, se considera que los anticuerpos «aglu» pueden tener perfiles de seguridad y estabilidad mejorados *in vivo*. Los procedimientos para la producción de anticuerpos aglucosilados, con la función efectora deseada se encuentran por ejemplo en la solicitud internacional WO2005/018572.

- [0092]** En determinados anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos

descritos en este documento, la porción Fc puede haber sido mutada para disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la delección o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado en circulación aumentando de este modo la localización de la α -sinucleína. En otros casos puede ser que las 5 modificaciones de la región constante consistentes con la invención actual moderen la unión al complemento y reduzcan, de este modo, la semivida en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Aún pueden usarse otras modificaciones de la región constante para modificar los puentes disulfuro o los restos de oligosacáridos que permitan potenciar la localización debido a un aumento de la especificidad por el antígeno o de la flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las 10 modificaciones, como la localización de α -sinucleína, su biodistribución y semivida en suero, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin necesidad de experimentación.

[0093] En determinados anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en este documento, la porción Fc puede estar mutada o haberse cambiado por secuencias proteicas 15 alternativas para aumentar la captación celular de anticuerpos, a modo de ejemplo, mediante la potenciación, por ejemplo, de la endocitosis de anticuerpos mediada por receptor a través de receptores Fc γ , LRP o receptores Thy1 o mediante «tecnología de superanticuerpos» que según se afirma potencia la transferencia de los anticuerpos dentro de células vivas sin efectos nocivos para ellas (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Por ejemplo, la generación de proteínas de fusión de la región de unión al anticuerpo y los ligandos proteicos relacionados de receptores de la 20 superficie celular o anticuerpos bi o multiespecíficos con secuencias específicas de unión a α -sinucleína así como a la superficie celular puede realizarse mediante ingeniería genética usando técnicas conocidas en la materia.

[0094] En determinados anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en este documento, la porción Fc puede estar mutada o haberse intercambiado por secuencias proteicas 25 alternativas o el anticuerpo puede haberse modificado químicamente para aumentar su capacidad de penetración en la barrera hematoencefálica.

[0095] Las formas modificadas de anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden obtenerse a partir de anticuerpos precursores u originales completos usando 30 técnicas conocidas en la materia. A continuación, en este documento se describen ejemplos de técnicas con más detalle. Los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden obtenerse o producirse usando técnicas conocidas en la materia. En determinadas realizaciones, las moléculas de anticuerpo o sus fragmentos se «producen recombinantemente», es decir, se producen usando tecnología de ARN recombinante. En otro punto de este documento se describen con más detalles ejemplos de 35 técnicas para la obtención de moléculas de anticuerpos o fragmentos de los mismos.

[0096] Los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también incluyen derivados que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente al anticuerpo de cualquier 40 tipo de molécula de modo que la unión covalente no impide que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo correspondiente. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación pegilación, amidación, derivación mediante grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular o a otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede realizarse mediante técnicas conocidas, 45 incluyendo, pero sin limitaciones, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

[0097] En realizaciones concretas preferidas, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención no mostrarán una respuesta inmune nociva en el animal que se va a tratar, 50 por ejemplo, en un humano. En determinadas realizaciones, las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o sus fragmentos de unión al antígeno de la invención derivan de un paciente, por ejemplo, un paciente humano y, posteriormente, se usan en la misma especie de la que derivan, es decir, en humanos, para aliviar o minimizar la aparición de respuestas inmunes nocivas.

[0098] También puede usarse la desinmunización para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Según se 55 usa en este documento, el término «desinmunización» incluye alteración de un anticuerpo para modificar los epítopos de las células T; véase, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO98/52976 y WO00/34317. Por ejemplo, se analizan las secuencias V_H y V_L del anticuerpo inicial y se realiza un «mapa» de epítopos de las células T humanas a partir de cada región V en el que se muestra la localización de epítopos en relación con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Se analizan los epítopos

de células T individuales del mapa de epítopes de células T para identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con bajo riesgo de alteración de la actividad del anticuerpo final. Se diseñan una variedad de secuencias de V_H y V_L alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente a una variedad de polipéptidos de unión, por ejemplo, anticuerpos específicos de α -sinucleína o sus fragmentos inmunoespecíficos para su uso en los procedimientos diagnósticos y de tratamiento descritos en este documento, cuya función se comprueba a continuación. Típicamente, se generan entre 12 y 24 variantes de anticuerpo que se prueban. A continuación se clonan los genes completos de las cadenas pesada y ligera, que comprenden regiones V modificadas y C humanas en vectores de expresión y los plásmidos subsecuentes se introducen en líneas celulares para la producción de un anticuerpo completo. Después, los anticuerpos se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos adecuados y se identifica la variante óptima.

[0099] Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinante y de despliegue de fagos o una combinación de estas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando las técnicas de hibridoma incluyendo las conocidas en la materia y mostradas, por ejemplo, en Harlow y col. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling, y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). La expresión «anticuerpo monoclonal» como se usa en este documento no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión «anticuerpo monoclonal» se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procarariota o fago y no el método por el cual se produce. Por tanto, el término «anticuerpo monoclonal» no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención derivan de células B humanas que se han inmortalizado mediante transformación con el virus de Epstein-Bar, como se describe en este documento.

[0100] En el proceso bien conocido de obtención de hibridomas (Köhler y col., *Nature* 256 (1975) 495) los linfocitos de vida relativamente corta, o mortales, de un mamífero, por ejemplo, células B derivadas de un humano según se describe en este documento, se fusionan con una línea de células tumorales inmortal (p. ej., una línea celular de mieloma), produciéndose de este modo células híbridas o «hibridomas» que son a la vez inmortales y capaces de producir el anticuerpo genéticamente codificado de la célula B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas únicas mediante selección, dilución y recultivo con cada cepa individual que contiene el gen específico para la formación de un único anticuerpo. Estos producen anticuerpos, que son homogéneos frente a un antígeno deseado y, en referencia a su origen genético puro, se denominan «monoclonales».

[0101] Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que, preferiblemente, contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células parentales del mieloma no fusionadas. Los expertos en la materia apreciarán que los reactivos, líneas celulares y medios para la formación, selección y crecimiento de hibridomas están disponibles en el mercado a partir de varias fuentes y los protocolos estandarizados están bien establecidos. En general, se comprueba la producción de anticuerpos monoclonales frente al antígeno deseado en el medio de cultivo en el que se crecen las células de hibridoma. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante ensayos *in vitro* como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), como se describe en este documento. Tras identificar las células de hibridoma que producen los anticuerpos de especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecerse mediante procedimientos estándar, véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies Principles and Practice*, Academic Press, pág. 59-103 (1986). Adicionalmente se apreciará que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, el líquido ascítico o el suero mediante procedimientos de purificación convencionales como, por ejemplo, proteína A, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

[0102] En otra realización, pueden seleccionarse linfocitos mediante micromanipulación y aislarse los genes variables. Por ejemplo, pueden aislarse células mononucleares de sangre periférica a partir de un mamífero inmunizado o naturalmente inmune, por ejemplo, un humano, y cultivarlas durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Pueden cribarse los cultivos en busca de IgG específicas que cumplan los criterios de selección. Pueden aislarse células de los pocillos positivos. Las células B productoras de Ig individuales pueden aislarse mediante FACS o identificarse en un ensayo hemolítico en placa mediante amplificado por complemento. Las células B productoras de Ig pueden micromanipularse dentro de un tubo y pueden amplificarse los genes de V_H y V_L usando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes de V_H y V_L pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpos y transfectarse a células (p. ej., células eucariotas o procarariotas) para su expresión.

[0103] Alternativamente, las líneas celulares productoras de anticuerpos pueden seleccionarse y cultivarse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estas técnicas se describen en diversos manuales de laboratorio y en publicaciones principales. A este respecto, las técnicas adecuadas por su uso en la invención según se describe a continuación, se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan y col., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley e hijos, Nueva York (1991).

[0104] Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopes específicos por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ pueden producirse recombinantemente o mediante escisión proteolítica de las moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas como la papaína (para producir los fragmentos Fab) o la pepsina (para producir los fragmentos $F(ab')_2$). Los fragmentos $F(ab')_2$ contiene la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Estos fragmentos son suficientes para su uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que suponen conjugar las porciones inmunoespecíficas de las inmunoglobulinas con reactivos de detección como radioisótopos.

[0105] Los anticuerpos completamente humanos, como se describe en este documento, son especialmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos de la presente invención se aíslan, por ejemplo, a partir de sujetos ancianos que debido a su edad se sospecha que pueden estar en riesgo de desarrollar una enfermedad, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson, o de un paciente con el trastorno pero con una evolución de la enfermedad inusualmente estable. No obstante, aunque es prudente esperar que los sujetos ancianos sanos y libres de síntomas, respectivamente, desarrollan de forma más regular anticuerpos protectores anti- α -sinucleína que los sujetos más jóvenes, estos últimos también pueden usarse como fuente para obtener un anticuerpo humano de la presente invención. Esto es especialmente cierto en los pacientes más jóvenes con predisposición a desarrollar una forma familiar de una enfermedad sinucleinopática pero que siguen sin síntomas debido a que su sistema inmunitario y las respuestas del mismo funcionan de forma más eficaz que en los adultos de mayor edad.

[0106] Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse por cualquier procedimiento de síntesis de anticuerpos conocido en la materia, en particular, mediante síntesis química o, preferiblemente, mediante técnicas de expresión recombinante como se describe en este documento.

[0107] En una realización, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de mismo de la invención comprende una región constante sintética en la que se han delecionado parcial o completamente uno o más dominios («anticuerpos de dominios delecionados»). En determinadas realizaciones los anticuerpos modificados compatibles comprenderán construcciones o variantes de deleción de dominio donde se haya eliminado el dominio CH2 completo (construcciones Δ CH2). En otras realizaciones, puede sustituirse un péptido de conexión corto por el dominio delecionado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento a la región variable. Los expertos en la materia apreciarán que estas construcciones son especialmente preferidas debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 sobre la velocidad catabólica del anticuerpo. Las construcciones con deleción de dominio pueden derivarse usando un vector que codifica un dominio constante humano de IgG1, véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO02/060955 y WO02/096948^{a2}. Este vector se modifica mediante ingeniería genética para deleccionar el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que exprese una región constante de IgG1 con deleción de dominio.

[0108] En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente invención son minianticuerpos. Los minianticuerpos pueden obtenerse usando procedimientos descritos en la técnica; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 5.837.821 o la solicitud internacional WO 94/09817.

[0109] En una realización, un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado de la invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una deleción o sustitución de unos pocos o incluso un único aminoácido siempre que esto permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión a Fc y aumentar, de este modo, la localización de α -sinucleína. De forma similar, puede ser deseable simplemente deleccionar la parte de uno o más dominios constantes que controla la función efectora (p. ej., de unión al complemento) que se va a modular. Estas deleciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar características seleccionadas del anticuerpo (semivida en suero) mientras que se conservan otras funciones deseadas asociadas con el dominio intacto de la región constante del sujeto. Además, como se ha señalado antes, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencian el perfil de la construcción resultante. A este respecto puede ser posible alterar la

actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (p. ej., unión a Fc) mientras que se mantienen sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Aún otras realizaciones comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar características deseadas como la función efectora o proporcionar más citotoxina o unión de hidratos de carbono. En dichas realizaciones puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de la región constante seleccionados.

[0110] La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente o consisten en variantes (incluidos derivados) de moléculas de anticuerpo (p. ej., las regiones V_H y/o las regiones V_L) descritas en este documento, cuyos anticuerpos o sus fragmentos se unen inmuno específicamente a la α -sinucleína. Pueden usarse técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína, incluyendo, pero sin limitaciones, la mutagénesis dirigida a sitio y la mutagénesis mediada por PCR, que tienen como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las variantes (incluidos derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, menos de 2 sustituciones de aminoácidos en relación con la región V_H , V_H -CDR1, V_H -CDR2, V_H -CDR3, región V_L , V_L -CDR1, V_L -CDR2 o V_L -CDR3 de referencia. Una «sustitución de aminoácidos conservadora» es aquella en la que el resto de aminoácido se sustituye por un aminoácido con una cadena lateral con carga similar. En la materia se han descrito familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, pueden introducirse mutaciones de forma aleatoria a lo largo de toda o parte de la secuencia codificadora, como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse según su actividad biológica para identificar mutantes que mantengan la actividad (p. ej., la capacidad para unirse a α -sinucleína).

[0111] Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solo en las regiones estructurales o solo en las regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas puede ser silente o mutaciones de sentido erróneo neutras, por ejemplo, que tienen un efecto mínimo o nulo sobre la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno, de hecho, algunas de estas mutaciones no alteran en absoluto la secuencia de aminoácidos. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de los codones o mejora la producción de un anticuerpo por un hibridoma. En otra parte de este documento se describen regiones codificadas con codones optimizados que codifican anticuerpos de la presente invención. Alternativamente, las mutaciones de sentido erróneo no neutras pueden alterar la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. La localización de la mayoría de las mutaciones silentes o de sentido erróneo neutras es probablemente en las regiones estructurales, mientras que la localización de la mayoría de las mutaciones erróneas no neutras es probable que se produzca en las CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en la materia sería capaz de diseñar y probar moléculas mutantes con las propiedades deseadas, como sin alteración de la actividad de unión al antígeno o alteración en la actividad de unión (p. ej., mejora en la actividad de unión al antígeno o cambios en la especificidad del anticuerpo). Tras la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma rutinaria y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (p. ej., capacidad para unirse inmuno específicamente a al menos un epítipo de la α -sinucleína) puede determinarse usando técnicas descritas en este documento o modificando de forma rutinaria técnicas conocidas en la materia.

50 III. Polinucleótidos que codifican los anticuerpos

[0112] Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado puede estar compuesto por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser un ARN o ADN sin modificar o un ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado puede estar compuesto por ADN de cadena sencilla y doble, ADN que sea una mezcla de regiones de cadena sencilla y doble, ARN de cadena sencilla y doble y ARN que sea una mezcla de regiones de cadena sencilla y doble, moléculas híbridas compuestas de ADN y ARN que pueden ser de cadena sencilla o, más típicamente, de doble cadena o una mezcla de regiones de cadena sencilla y doble. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado puede estar

compuesto por regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado también puede contener una o más bases modificadas o esqueletos de ADN o ARN modificados por razones de estabilidad entre otras. Entre las bases «modificadas» se incluyen, por ejemplo, bases tritiadas y bases poco corrientes tales como inosina. Pueden hacerse diversas modificaciones del ADN y el ARN; de este modo, «polinucleótido» abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

[0113] Un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (p. ej., una porción de cadena pesada o una porción de cadena ligera de inmunoglobulina) puede obtenerse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de modo que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos dentro de la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar, como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos conservadoras se hacen en uno o más restos de aminoácidos no esenciales.

[0114] Como es conocido, el ARN puede aislarse a partir de las células B originales, células de hibridoma o de otras células transformadas mediante técnicas estándar, como extracción con isotiocianato de guanidinio y precipitación seguida de centrifugación o cromatografía. Cuando se desee, puede aislarse el ARNm a partir del ARN total mediante técnicas estándar como cromatografía en oligo dT celulosa. Estas técnicas adecuadas son conocidas en la materia. En una realización, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo pueden obtenerse, de forma simultánea o por separado, usando transcriptasa inversa y ADN polimerasa según procedimientos bien conocidos. La PCR puede iniciarse mediante cebadores consenso de la región constante o mediante cebadores más específicos en base a las secuencias de ADN y aminoácidos de las cadenas pesada y ligera publicadas. Como se describe anteriormente, también puede usarse la PCR para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. En este caso, pueden cribarse las bibliotecas mediante cebadores consenso o sondas homólogas más largas, como sondas de la región constante humana.

[0115] El ADN, típicamente ADN plasmídico, puede aislarse a partir de las células usando técnicas conocidas en la materia, mapearse y secuenciarse con enzimas de restricción según técnicas estándar bien conocidas establecidas en detalle, por ejemplo, en las referencias precedentes relacionadas con las técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede sintetizarse según la presente invención en cualquier momento durante el proceso de aislamiento o de análisis posterior.

[0116] La presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consta esencialmente o consta de un ácido nucleico que codifica una región variable (V_L) de la cadena ligera de la inmunoglobulina que tiene las secuencias polipeptídicas V_L -CDR1, V_L -CDR2, o V_L -CDR3 mostradas en la figura 1B.

[0117] En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consta esencialmente o consta de un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (V_H) en el que las regiones V_H -CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos V_H -CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3 mostrados en la figura 1B y en el listado de secuencias adjunto.

[0118] En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido comprende, consta esencialmente o consta de un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos de la región V_H o V_L de un anticuerpo anti- α -sinucleína como se establece en la SEC ID N.º 8 o 11. A este respecto, el experto en la materia apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar el dominio variable de ambas cadenas de inmunoglobulina o solo de una.

[0119] La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en otra parte de este documento. Adicionalmente, los polinucleótidos que codifican polinucleótidos de fusión, los fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en este documento también son contemplados con la invención.

[0120] Los polinucleótidos pueden producirse o fabricarse mediante cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados, por ejemplo, como se describe en Kutmeier y col., *BioTechniques* 17 (1994), 242 que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y ligamiento de estos

oligonucleótidos y, a continuación, amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

[0121] Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado puede generarse a partir del ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no se dispone de un clon que contenga un ácido nucleico que codifica un anticuerpo en particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, puede sintetizarse químicamente u obtenerse a partir de una fuente adecuada un ácido nucleico que codifique el anticuerpo (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpo o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A⁺, aislado de cualquier tejido o célula que exprese el anticuerpo específico de α -sinucleína, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos capaces de hibridar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o clonando usando una sonda oligonucleotídica específica de la secuencia génica en particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc a partir de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR pueden clonarse a continuación en vectores de clonación replicables usando cualquier procedimiento bien conocido en la materia.

[0122] Una vez que se determine la secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo, o de su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado, su secuencia nucleotídica puede manipularse usando procedimientos bien conocidos en la materia para la manipulación de las secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) y Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998)) para generar anticuerpos que tengan una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para generar sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

25 IV. Expresión de polipéptidos de anticuerpos

[0123] Tras la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos típicamente están insertados en un vector de expresión para la introducción en las células huésped que pueden usarse para producir la cantidad de anticuerpo deseada. En este documento se describe la expresión recombinante de un anticuerpo, o su fragmento, derivado o análogo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula diana. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o porción del mismo (conteniendo preferiblemente el dominio variable de la región pesada o ligera) de la invención, puede producirse el vector para la producción de la molécula de anticuerpo por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia. De este modo, se describen en este documento procedimientos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo. Pueden usarse procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican el anticuerpo y señales de control de la transcripción y de la traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, las técnicas de recombinación de ADN *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La invención proporciona, de este modo, vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la invención o una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de la cadena pesada o ligera, unida de forma operativa a un promotor. Estos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 86/05807 y WO 89/01036 y la patente de EE.UU. N° 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en este vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa.

[0124] El término «vector» o «vector de expresión» se usa en este documento para referirse a los vectores usados de acuerdo con la presente invención como vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula huésped. Como es sabido por los expertos en la materia, estos vectores pueden seleccionarse fácilmente a partir del grupo compuesto por plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariontas. Para los fines de esta invención, pueden emplearse muchos sistemas de vector de expresión. Por ejemplo, una clase de vectores utiliza elementos de ADN que derivan de virus animales como el virus del papiloma bovino, virus del polioma, adenovirus, virus de la vacuna, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistronicos con sitios internos de unión a ribosomas. Adicionalmente, las células que tienen integrado el ADN en sus cromosomas pueden seleccionarse introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de las células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionarse para inducir fototrofia a un huésped auxótrofo,

resistencia biocida (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados como el cobre. El gen del marcador seleccionable también puede estar directamente unido a las secuencias de ADN para que se exprese, o introduzca dentro de la misma célula mediante transformación conjunta. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis de los ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de ajuste así como
5 promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación.

[0125] En realizaciones especialmente preferidas los genes de la región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de las cadenas pesada y ligera (preferiblemente humana) como se describe anteriormente. En una realización, esto se realiza usando un vector de expresión patentado de
10 Biogen IDEC, Inc., denominado NEOSPLA, descrito en la patente de EE. UU. N.º 6.159.730. Este vector contiene el promotor/potenciador del citomegalovirus, el promotor principal de la globina beta de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, el exón 1 y el exón 2 de la neomicina fosfotransferasa, el gen y la secuencia líder de la dihidrofolato reductasa. Se ha encontrado que este vector tiene como resultado un nivel muy alto de expresión de anticuerpos tras la incorporación de los genes de las regiones
15 variable y constante, transfección en células CHO, seguida de la selección en medio que contiene G418 y amplificación con metotrexato. Por supuesto, en la presente invención puede usarse cualquier vector de expresión que sea capaz de inducir la expresión en células eucariotas. Entre los ejemplos de vectores adecuados se incluyen, pero sin limitaciones, los plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 y pZeoSV2 (disponible en Invitrogen, San Diego, CA) y el plásmido pCI
20 (disponible en Promega, Madison, WI). En general, es un experimento rutinario el cribado del gran número de células transformadas para obtener aquellas que expresan adecuadamente niveles altos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina que puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante sistemas robotizados. Los sistemas de vector también se muestran en las patentes de EE. UU. N.º 5.736.137 y 5.658.570. Este sistema proporciona altos niveles de expresión, por ejemplo, >30 pg/célula/día. Otros ejemplos de sistemas de vector se describen, por
25 ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 6.413.777.

[0126] En otras realizaciones preferidas los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden expresarse usando construcciones policistrónicas como las que se describen en la publicación de solicitud de patente N.º 2003-0157641 A1 incorporada a este documento en su totalidad. En
30 estos sistemas de expresión, los productos de genes múltiples de interés, como las cadenas pesada y ligera de anticuerpos pueden producirse a partir de una única construcción policistrónica. Estos sistemas usan de forma ventajosa un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos. Las secuencias IRES compatibles se describen en la patente de EE. UU. N.º 6.193.980 que también se incorpora a este documento. Los expertos en la materia apreciarán que estos sistemas de expresión pueden usarse
35 para producir de forma eficaz la variedad completa de anticuerpos descritos en la presente solicitud.

[0127] Más generalmente, una vez que se ha preparado el vector o la secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo, el vector de expresión puede introducirse en una célula huésped apropiada. La introducción del plásmido en la célula huésped puede conseguirse mediante diversas técnicas bien conocidas por
40 los expertos en la materia. Entre estas se incluyen, pero sin limitaciones, la transfección incluyendo lipotransfección usando, por ejemplo, Fugene o lipofectamina, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con el virus intacto. Típicamente, la introducción de plásmidos en el huésped se hace a través del método estándar de coprecipitación con fosfato cálcico. Las células huésped portadoras de la construcción de expresión se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de las cadenas
45 ligeras y las cadenas pesadas y se comprueba la síntesis de proteínas de cadenas pesada y/o ligera. Entre los ejemplos de técnicas de ensayo se incluyen el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o el análisis de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

[0128] El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y, a continuación, las células transfectadas se cultivan por técnicas convencionales para producir un anticuerpo para su uso en los procedimientos descritos en este documento. De esta manera, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo,
50 unido de forma operativa a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de cadenas dobles, pueden expresarse conjuntamente en una célula huésped vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como las ligeras para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

[0129] La célula huésped puede transfectarse conjuntamente con dos vectores de expresión de la invención,

codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de una cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan la expresión equivalente de los polipéptidos de las cadenas pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un vector único que codifique ambos polipéptidos de las cadenas pesada y ligera. En estas situaciones, la cadena ligera se coloca de forma ventajosa antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica; véase Proudfoot, Nature 322 (1986), 52, Khler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197. Las secuencias que codifican las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

[0130] Según se usa en este documento, «células huésped» se refiere a células que portan vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procesos de aislamiento de anticuerpos a partir de huéspedes recombinantes, los términos «célula» y «cultivo celular» se usan indistintamente para indicar la fuente del anticuerpo, siempre que no se especifique claramente otra cosa. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las «células» puede significar obtenerlo a partir de células completas centrifugadas o de cultivos celulares que contienen tanto el medio como las células en suspensión.

[0131] Puede utilizarse una diversidad de sistemas vector de expresión en huésped para expresar las moléculas de anticuerpo para su uso en los procedimientos descritos en este documento. Estos sistemas de expresión en huésped representan vehículos por los cuales las secuencias codificadoras de interés pueden producirse y, posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden expresar, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificadoras de nucleótidos apropiadas, una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitaciones, microorganismos como bacterias (p. ej., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contienen secuencias codificadoras del anticuerpo, levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias codificadoras del anticuerpo, sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus) que contienen las secuencias codificadoras del anticuerpo, sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contienen secuencias codificadoras del anticuerpo o sistemas de células de mamíferos (p. ej., células COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3) que portan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (p. ej., promotor de metalotioneina) o de virus de mamíferos (p. ej., el promotor tardío de adenovirus, el promotor 7,5 k del virus vaccinia). Preferiblemente, se usan células bacterianas, como *Escherichia coli*, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante y más preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante completa. Por ejemplo, las células de mamífero, como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector como el elemento promotor génico principal temprano intermedio del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos; véase, por ejemplo, Foecking y col., Gene 45 (1986), 101; Cockett y col., Bio/Technology 8 (1990), 2.

[0132] La línea celular huésped usada para la expresión de la proteínas a menudo es de origen mamífero; los expertos en la materia están acreditados para determinar preferiblemente células huésped concretas que se adapta mejor a la expresión en ellas del producto génico deseado. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped se incluyen, pero sin limitaciones, CHO (ovario de hámster chino), DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR negativa), HELA (carcinoma de cuello de útero humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (derivada de CVI con antígeno T de SV40), VERY, BHK (riñón de cría de hámster), MDCK, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma humano), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Son especialmente preferidas las células CHO y 293. Típicamente, las líneas de células huésped están disponibles en los servicios comerciales, en la American Tissue Culture Collection o de la bibliografía publicada.

[0133] Además, puede elegirse una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique y procese el producto génico en la manera específica deseada. Estas modificaciones (p. ej., glucosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Se han caracterizado células huésped diferentes y mecanismos específicos para el procesamiento postraducional y modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la modificación correcta y el procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito principal, glucosilación y fosforilación del producto génico.

[0134] Para una producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería genética líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo. Antes que usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación vírico, pueden transformarse células huésped con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (p. ej., 5 promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, puede dejarse que las células modificadas genéticamente crezcan durante 1-2 días en medios enriquecidos y, a continuación, se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para forman focos que sucesivamente puede clonarse y 10 expandirse en líneas celulares. Puede ser ventajoso usar este procedimiento para modificar genéticamente líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo.

[0135] Pueden usarse varios sistemas de selección que incluyen, pero sin limitación, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler y col., Cell 11 (1977), 223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa 15 (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202) y la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy y col., Cell 22 (1980), 817) que pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, puede usarse la resistencia antimetabolito como base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler y col., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418, Goldspiel y col., Clinical Pharmacy 12 (1993), 488- 20 505; Wu y Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 (1993), 573-596; Mulligan, Science 260 (1993), 926-932; y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre y col., Gene 30 (1984), 147. Pueden usarse procedimientos normalmente conocidos en la materia de tecnología de ADN recombinante como se describe en 25 Ausubel y col. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley e Hijos, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990) y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (editores), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley e hijos, NY (1994); Colberre-Garapin y col., J. Mol. Biol. 150: Biol. 1501:1 (1981).

[0136] Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación del vector; para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, Nueva York, Vol.3. (1987). Cuando un marcador en el sistema vector que expresa el anticuerpo es amplificable, un aumento en nivel de inhibición presente en el cultivo de células huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región 35 amplificada se asocia con el gen del anticuerpo, también se aumentará la producción del anticuerpo (Crouse y col., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257. La producción *in vitro* permite su escalada para obtener cantidades grandes de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo tisular son conocidas en la materia e incluyen cultivo en suspensión homogéneo, por ejemplo, en un reactor de transporte aéreo o en un reactor con agitador continuo o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, 40 microcápsulas, en microesferas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o se desea, las soluciones de polipéptidos pueden purificarse mediante por métodos cromatográficos habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno)afinidad, por ejemplo, tras biosíntesis preferencial de un polipéptido sintético de la región bisagra o antes o después del paso de cromatografía HIC descrito en este documento.

[0137] Los genes que codifican los anticuerpos, o los fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también puede expresarse en células no mamíferas como bacterias, insectos, levaduras o células vegetales. Entre las bacterias que aceptan fácilmente ácidos nucleicos se incluyen miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, como *Bacillus subtilis*; 50 *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Adicionalmente se apreciará que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos típicamente forman parte de los cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos pueden aislarse, purificarse y, a continuación, ensamblarse en moléculas funcionales. Cuando se desean forma tetravalentes, a continuación, las subunidades se autoensamblarán en anticuerpos tetravalente; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO02/096948.

[0138] En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse de forma ventajosa varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de esta proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos proteicos de 55

fusión que se purifican fácilmente. Entre estos vectores se incluyen, pero sin limitaciones, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., EMBO J. 2 (1983), 1791), en el que la secuencia codificadora del anticuerpo puede estar ligada individualmente dentro del vector en marco con la región codificadora de lacZ de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509) y similares; también pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, estas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de las células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguido de la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de las proteasas trombina o factor Xa de modo que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto GST.

[0139] Además de procariontes, también pueden usarse microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadería común, es la usada con mayor frecuencia entre los microorganismos eucariotas, aunque normalmente se dispone de varias cepas diferentes, por ejemplo, *Pichia pastoris*. Para la expresión en *Saccharomyces*, el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb y col., Nature 282 (1979), 39; Kingsman y col., Gene 7 (1979), 141; Tschemper y col., Gene 10 (1980), 157) se usa frecuentemente. Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura carente de la capacidad para crecer en presencia de triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85 (1977), 12). La presencia de la lesión trp1 como una característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona a continuación un ambiente eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano.

[0140] En un sistema de insecto, se usa típicamente el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificadora del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen poliedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de poliedrina).

[0141] Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado recombinantemente, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligera y pesada individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, pueden purificarse según procedimientos estándar de la técnica, incluido por ejemplo, mediante cromatografía (p. ej., cromatografía de intercambio iónico, afinidad, especialmente mediante afinidad por el antígeno específico tras Proteína A y exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, p. ej., precipitación con sulfato amónico, o mediante cualquier otra técnica estándar de purificación de proteínas; véase p. ej., Scopes, «Protein Purification», Springer Verlag, N.Y. (1982). Alternativamente, un procedimiento preferido para aumentar la afinidad de los anticuerpos de la invención se describe en la publicación de patente de EE. UU. 2002-0123057 A1.

V. Proteínas de fusión y conjugados

[0142] En determinadas realizaciones, el polipéptido del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos normalmente no asociados con un anticuerpo. A continuación se describen ejemplos de modificaciones con más detalle. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo fv de cadena sencilla de la invención puede comprender una secuencia enlazadora flexible, o puede modificarse añadiendo un resto funcional (p. ej., PEG, un fármaco, una toxina o una etiqueta fluorescente, radioactiva, enzimática, magnética, nuclear, metal pesado y similares).

[0143] Un polipéptido de anticuerpo de la invención puede comprender, constar esencialmente o constar de una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas quiméricas que comprende, por ejemplo, un dominio de inmunoglobulina de unión a α -sinucleína con al menos un sitio de unión diana y al menos una porción heteróloga, es decir, una porción a la que no está unido de forma natural en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden encontrarse normalmente en proteínas independientes que se colocan juntas en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína pero se colocan en una nueva disposición en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión pueden crearse, por ejemplo, mediante síntesis química, o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones peptídicas se codifican en la relación deseada.

[0144] El término «heterólogo» si se aplica a un polinucleótido o un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido deriva de una entidad diferente de la del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, según se usa en este documento, un «polipéptido heterólogo» que va a fusionarse con un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o análogo derivado de un polipéptido no inmunoglobulina de la misma especie, o un polipéptido inmunoglobulina o no inmunoglobulina de una especie diferente. Como se describe con mayor detalle en otra parte de este documento, los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno, variantes o

derivados de la invención pueden además fusionarse de forma recombinante en el extremo N o C-terminal con un polipéptido heterólogo o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes o no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos pueden estar fusionados o conjugados de forma recombinante a moléculas útiles como etiquetas en ensayos de detección y a moléculas efectoras como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleidos o toxinas; véase, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624; la patente de EE. UU. N.º 5.314.995 y la solicitud de patente europea EP 0 396 387.

[0145] Los anticuerpos, o sus fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de la presente invención pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o por enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los anticuerpos pueden modificarse mediante procesos naturales, como procesado postraducciona, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidos en la materia. Estas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa literatura de investigación. Las modificaciones pueden tener lugar en cualquier parte del anticuerpo, incluido el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminales, o en restos como hidratos de carbono. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grado variable en varios sitios de un determinado anticuerpo. También un determinado anticuerpo puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultados de una ubiquitinación y pueden ser cíclicos con o sin ramificaciones. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procedimientos naturales postraduccionales o pueden obtenerse mediante procedimientos sintéticos. Entre las modificaciones se incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfotidilinositol, entrecruzamiento, ciclización, formación de puentes disulfuro, demetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación; véanse, por ejemplo, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman y compañía, Nueva York 2ª Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, pág. 1-12 (1983); Seifter y col., *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan y col., *Ann. NY Acad. Sci.* 663 (1992), 48-62).

[0146] La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado, y un polipéptido heterólogo. En una realización, una proteína de fusión de la invención comprende, consta esencialmente o consta de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de la regiones V_H de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones V_L de un anticuerpo de la invención o sus fragmentos o variantes, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En otra realización, una proteína de fusión para su uso en procedimientos diagnósticos y de tratamiento descrita en este documento comprende, consta esencialmente o consta de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de la regiones V_H -CDR de un anticuerpo o sus fragmentos, variantes o derivados, o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos o tres de las V_L -CDR de un anticuerpo de la invención o sus fragmentos, variantes o derivados y una secuencia polipeptídica heteróloga. En una realización, la proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una V_H -CDR3 de un anticuerpo de la presente invención o su fragmento, derivado o variante y una secuencia polipeptídica heteróloga, proteína de fusión que se une específicamente a α -sinucleína. En otra realización, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una región V_H de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácidos de al menos una región V_L de un anticuerpo de la invención o sus fragmentos, derivados o variantes, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, las regiones V_H y V_L de la proteína de fusión corresponden a un anticuerpo original sencillo (o fragmento scFV o Fab) que se une específicamente a α -sinucleína. Aún en otra realización, una proteína de fusión para su uso en los procedimientos diagnósticos y de tratamiento descritos en este documento comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres o más de las regiones V_H -CDR de un anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres o más de las V_L -CDR de un anticuerpo, o sus fragmentos o variantes, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las regiones V_H -CDR o V_L -CDR se corresponden con un anticuerpo original sencillo (fragmento scFV o Fab) de la invención. La invención también abarca a las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión.

[0147] Entre los ejemplos de proteínas de fusión publicadas en la literatura se incluyen proteínas de fusión del receptor de células T (Gacogne y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon y col., Nature 337 (1989), 525-531; Traunecker y col., Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl y col., DNA Cell Biol. USA 9 (1990), 347-353 y Bym y col., Nature 344 (1990), 667-670); L-selectina (receptor de alojamiento) (Watson y col., J. Cell. Biol. 5 110 (1990), 2221-2229 y Watson y col., Nature 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo y col., Cell 61 (1990), 1303-1313); CD28 y B7 (Linsley y col., J. Exp. Med. 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley y col., J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic y col., Cell 66 (1991), 1133-1144); receptor de TNF (Ashkenazi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer y col., Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886; y Poppel y col., J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991); y receptor de IgE receptor a (Ridgway y Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), 10 Resumen N.º 1448).

[0148] Como se describe en otra parte de este documento, los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de la invención pueden fusionarse a polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para su uso en inmunoensayos usando procedimientos conocidos en la materia. Por 15 ejemplo, en una realización, el PEG puede conjugarse con los anticuerpos de la invención para aumentar su semivida *in vivo*; véase, por ejemplo, Leong y col., Cytokine 16 (2001), 106-119, Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir y col., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

[0149] Además, los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de la invención 20 pueden fusionarse con secuencias marcadoras, como un péptido, para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido hexahistidina (HIS), como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Entre otras 25 etiquetas peptídicas útiles para la purificación se incluyen, pero sin limitaciones, la etiqueta «HA» que se corresponde con un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina del virus influenza (Wilson y col., Cell 37 (1984), 767) y la etiqueta «flag».

[0150] Las proteínas de fusión pueden prepararse usando procedimientos que son bien conocidos en la materia, 30 véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.116.964 y 5.225.538. El sitio preciso en el que se realiza la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar las características de secreción o unión de la proteína de fusión. A continuación, el ADN que codifica la proteína de fusión se transfecta en una célula huésped para su expresión.

[0151] Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en forma no conjugada o pueden conjugarse al 35 menos con una variedad de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de la diana o para estudio por imagen o terapia del paciente. Los anticuerpos, o sus fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de la invención pueden marcarse o conjugarse antes o después de la purificación, cuando se realiza la purificación. En especial, los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno, 40 variantes o derivados de la invención pueden conjugarse con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, fármacos o PEG.

[0152] Se han descrito ampliamente en la materia conjugados que son inmunotoxinas que incluyen anticuerpos 45 convencionales. Las toxinas pueden conjugarse con los anticuerpos mediante técnicas de conjugación convencionales o pueden producirse como proteínas de fusión inmunotoxinas que contienen porciones de toxinas proteicas. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse de la forma correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Son ejemplos ilustrativos de dichas inmunotoxinas aquellas descritas por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 y por Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

[0153] Los expertos en la materia apreciarán que los conjugados también pueden ensamblarse usando diversas 50 técnicas dependiendo del agente seleccionado que se va a conjugar. Por ejemplo, los conjugados con biotina se preparan, haciendo reaccionar un polipéptido de unión a α -sinucleína con un éster de biotina activado, como el éster de N-hidroxisuccinimida biotina. De forma similar, pueden prepararse conjugados con un marcador fluorescente en presencia de un agente de conjugación, por ejemplo, los enumerados en este documento, o mediante la reacción 55 con un isotiocianato, preferiblemente isotiocianato de fluoresceína. Los conjugados de los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de la invención se preparan de una forma análoga.

[0154] La presente invención además abarca anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de la invención conjugados a un agente diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos pueden usarse a nivel

diagnóstico para, por ejemplo, demostrar la presencia de una enfermedad neurológica, para indicar el riesgo de desarrollar una enfermedad neurológica, para controlar el desarrollo o progresión de una enfermedad neurológica, es decir, una enfermedad sinucleinopática como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un determinado régimen de tratamiento y/o prevención. La detección puede facilitarse mediante la conjugación del anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado a una sustancia detectable. Entre los ejemplos de sustancias detectables se incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden estar conjugados a anticuerpos para su uso como agentes diagnósticos según la presente invención. Entre los ejemplos de enzimas adecuadas se incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa, entre los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; entre los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente es el luminol; entre los ejemplos de materiales bioluminiscentes se incluyen luciferasa, luciferina y aecuorina, y entre los ejemplos de material radiactivo adecuado se incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

[0155] Un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado también puede marcarse de forma detectable mediante la conjugación con un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo con etiqueta quimioluminiscente se determina a continuación mediante la detección de la presión de luminiscencia surgida durante el transcurso de una reacción química. Son ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente especialmente útiles luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

[0156] Una de las maneras en las que un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado puede marcarse de forma detectable es uniendo el mismo a una enzima y usando el producto unido en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., «The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)» Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller y col., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. y col., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokio (1981). La enzima, que está unida al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferiblemente un sustrato cromogénico, de manera que se produzca un resto químico que pueda detectarse, por ejemplo, mediante métodos espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Entre las enzimas que pueden usarse para marcar de forma detectable se incluyen, pero sin limitaciones, malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococos, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, alcalina fosfatasa, asparraginas, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Adicionalmente, la detección puede conseguirse mediante procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también puede conseguirse mediante comparación visual del grado de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de forma similar.

[0157] La detección también puede conseguirse usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, mediante marcaje radioactivo del anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado, es posible detectar el anticuerpo mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA), (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, [marzo, 1986]). El isótopo radiactivo puede detectarse por métodos que incluyen, pero sin limitaciones, un contador gamma, un contador de centelleo o una autorradiografía.

[0158] Un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado también puede marcarse de forma detectable usando metales emisores de fluorescencia, como ^{152}Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo usando dichos grupos quelantes de metales, como el ácido dietilentriaminofentacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético. Las técnicas para conjugar varios restos a un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, variante o derivado son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon y col., «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld y col. (eds.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., «Antibodies For Drug Delivery», en Controlled Drug Delivery (2ª Edición.), Robinson y col. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pág 623-53 (1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera y col. (eds.), pág. 475-506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», en Monoclonal Antibodies For

Cancer Detection And Therapy, Baldwin y col. (eds.), Academic Press pág. 303-16 (1985), y Thorpe y col., «The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates», Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158.

[0159] Como se mencionó, en determinadas realizaciones, puede conjugarse un resto que potencia la estabilidad y eficacia de una molécula de unión, por ejemplo, un polipéptido de unión, por ejemplo, un anticuerpo o su fragmento inmunoespecífico. Por ejemplo, en una realización, puede conjugarse PEG a las moléculas de unión de la invención para aumentar su semivida *in vivo*. Leong y col., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531 o Weir y col., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

10 VI. Composiciones y procedimientos de uso

[0160] La presente invención se refiere a composiciones que comprenden la molécula de unión a la α -sinucleína mencionada anteriormente, por ejemplo, el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de la presente invención o su derivado o variante, o el polinucleótido, vector o célula de la invención. La composición de la presente invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender otros agentes como interleuquinas o interferones dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Por ejemplo, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, el agente adicional puede seleccionarse a partir del grupo compuesto por moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti- α -sinucleína y combinaciones de los mismos. Por tanto, en una realización preferida en particular la presente invención se refiere al uso de la molécula de unión a α -sinucleína, por ejemplo, anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de la presente invención o una molécula de unión que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de las mismas, el polinucleótido, el vector y la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o diagnóstica para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una enfermedad sinucleinopática, el control de una progresión de una enfermedad sinucleinopática o una respuesta al tratamiento de la enfermedad sinucleinopática en un sujeto o para determinar el riesgo del sujeto para desarrollar dicha enfermedad sinucleinopática.

[0161] Por tanto, en una realización la presente invención se refiere al anticuerpo anti- α -sinucleína y su fragmento de unión a la α -sinucleína de la presente invención para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico caracterizado por una acumulación anómala y/o depósito de α -sinucleína en el cerebro y el sistema nervioso central, respectivamente, cuyo tratamiento comprende la administración a un sujeto que necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las moléculas de unión a α -sinucleína, anticuerpos, polinucleótidos, vectores o células descritas anteriormente de la presente invención. El término «trastorno neurológico» incluye, pero sin limitaciones, enfermedades sinucleinopáticas como enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA), atrofia sistémica múltiple (ASM), insuficiencia autónoma pura (IAP), neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo 1 (NACH-1), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, distrofia neuroaxonal generalizada de inicio juvenil (enfermedad de Hallervorden-Spatz), esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática y síndrome de Down así como otros trastornos y enfermedades del movimiento del sistema nervioso central (SNC) en general. A no ser que se especifique otra cosa, los términos neurodegenerativo, neurológico y neuropsiquiátrico se usan indistintamente en este documento.

[0162] Una ventaja en particular de la estrategia terapéutica de la presente invención recae en el hecho de que los anticuerpos de la presente invención derivan de células B o células B de memoria de sujetos de edad avanzada sin signos de Parkinsonismo y, por tanto son, con una determinada probabilidad, capaces de prevenir una enfermedad sinucleinopática clínicamente manifiesta, o de disminuir el riesgo de aparición de la enfermedad clínicamente manifiesta, o de retrasar el inicio o progresión de la enfermedad clínicamente manifiesta. Típicamente, los anticuerpos de la presente invención también han pasado ya con éxito a través de maduración somática, es decir, la optimización con respecto a la selectividad y eficacia en la alta afinidad de unión a la molécula de α -sinucleína diana mediante variación somática de las regiones variables del anticuerpo.

[0163] El conocimiento de que estas células *in vivo*, por ejemplo en un humano, no se han activado a través de proteínas fisiológicas o estructuras celulares relacionadas, o de otro tipo, en el sentido de una reacción autoinmunitaria o alérgica también es de gran importancia médica ya que esto significa un aumento considerable en la posibilidad de sobrevivir a través de las fases de las pruebas clínicas. Por así decirlo, la eficiencia, aceptabilidad y tolerabilidad ya se han demostrado antes del desarrollo preclínico y clínico del anticuerpo profiláctico o terapéutico en al menos un sujeto humano. Por lo tanto, se puede esperar que los anticuerpos anti- α -sinucleína humanos de la presente invención, tanto su eficacia específica de la estructura diana como agente terapéutico y la disminución de la probabilidad de efectos adversos aumentan significativamente su probabilidad clínica de éxito.

- [0164]** La presente invención también proporciona un producto farmacéutico y de diagnóstico, respectivamente, paquete o kit que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los componentes descritos anteriormente, por ejemplo, anticuerpo anti- α -sinucleína, fragmento de unión, derivado o variante de la misma, 5 polinucleótido, vector o célula de la presente invención. Asociado con estos recipientes puede haber una nota en la forma establecida por una agencia gubernamental para la regulación de la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración en humanos. Además o alternativamente, el kit comprende reactivos y/o instrucciones para su uso en ensayos diagnósticos apropiados. La composición, por ejemplo, el kit de la presente invención es, por supuesto, 10 especialmente adecuada para la evaluación del riesgo, diagnóstico, prevención y tratamiento de un trastorno que va acompañado con la presencia de α -sinucleína, y en particular, aplicable para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewi (DCL) y variante con cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA).
- 15 **[0165]** Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica; véase por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) de la University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la materia e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las 20 composiciones que comprenden estos vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse a través de diversos medios, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal, tópica o intradérmica o administración intramedular o cerebral. Las formulaciones en aerosol, como formulación de spray nasal incluyen 25 soluciones acuosas o de otro tipo purificadas del principio activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Estas formulaciones se ajustan preferiblemente a un pH y estado isotónico compatibles con las membranas de la mucosa nasal. Las formulaciones para la administración rectal o vaginal pueden presentarse como supositorios con un vehículo adecuado.
- 30 **[0166]** Además, mientras que la presente invención incluye el procedimiento ahora habitual (aunque afortunadamente infrecuente) de realizar un pequeño agujero en el cráneo para administrar un fármaco de la presente invención, en un aspecto preferido, la molécula de unión, especialmente el anticuerpo o fármaco basado en un anticuerpo de la presente invención puede atravesar la barrera hematoencefálica, lo que permite su 35 administración intravenosa u oral.
- [0167]** El médico responsable determinará la pauta posológica y demás factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, como la estatura del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto en particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se estén administrando 40 simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 μ g (o de ácido nucleico para su expresión o para inhibición de la expresión en este intervalo); sin embargo, también están previstas las dosis por debajo o por encima de este ejemplo de intervalo, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. En general, la dosis puede oscilar, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente de 0,01 a 5 mg/kg (p. ej., 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del 45 peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o estar dentro del intervalo de 1 a 10 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén dentro del alcance de la invención. Puede administrarse a los sujetos estas dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o según cualquier otro programa determinado mediante análisis empírico. Un ejemplo de tratamiento implica la administración en múltiples dosis durante un 50 periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Ejemplos de pautas posológicas adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Entre los calendarios posológicos se incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos procedimientos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado está dentro de los 55 intervalos indicados. El progreso puede controlarse mediante evaluación periódica. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de solventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Entre los vehículos acuosos se incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólico/acuosas, incluyendo medios salinos y tamponados. Entre los vehículos parenterales se

incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer con lactato o aceites fijados. Entre los vehículos intravenosos se incluyen agentes de sustitución de líquidos y nutrientes, agentes de sustitución de electrolitos (como aquellos a base de dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos como, por ejemplo, antricrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender otros agentes como dopamina o fármacos psicofarmacológicos, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica.

[0168] Además, en una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica puede formularse como una vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo anti- α -sinucleína o su fragmento de unión, derivado o variante para inmunización pasiva. Como se mencionó en la sección de antecedentes, se han encontrado especies oligoméricas de α -sinucleína extracelularmente en plasma y en LCE (E1-Agnaf et al., FASEB J. 20 (2006), 419-425) y estudios de inmunización pasiva en modelos humanos de la enfermedad de Parkinson muestran que los anticuerpos monoclonales de ratón extracelulares frente a α -sinucleína pueden reducir el acúmulo de agregados de α -sinucleína intracelulares (Masliah y col., Neuron, 46 (2005), 857-868). Por consiguiente, es prudente esperar que los anticuerpos anti- α -sinucleína humanos y sus moléculas de unión frente a α -sinucleína equivalente de la presente invención sean especialmente útiles como vacuna para la prevención o mejora de las enfermedades sinucleinopáticas como EP, DCL y VCLEA.

[0169] En una realización, puede ser beneficioso usar Fab recombinante (rFab) y fragmentos de cadena sencilla (scFv) del anticuerpo de la presente invención, que podrían penetrar más fácilmente la membrana celular. Por ejemplo, Robert y col., Protein Eng. Des. Sel. (2008) Oct 16; S1741-0134, publicado previamente online, describen el uso de fragmentos Fab quiméricos recombinantes (rFab) y de cadena sencilla (scFv) del anticuerpo monoclonal WO-2 que reconoce un epítope en la región N-terminal de A β . Los fragmentos obtenidos por ingeniería genética modificados eran capaces de (i) prevenir la fibrilación del amiloide, (ii) disgregar las fibrillas A β 1-42 previamente formadas y (iii) inhibir la neurotoxicidad mediada por los oligómeros A β 1-42 *in vitro* de forma tan eficaz como la molécula de IgG completa. Entre las ventajas percibidas del uso de los formatos pequeños de anticuerpos genéticamente modificados Fab y scFv que carecen de la función efectora se incluyen su paso más eficaz a través de la barrera hematoencefálica y que minimizan el riesgo de desencadenar reacciones inflamatorias secundarias. Adicionalmente, además de conservar los anticuerpos scFv y de dominio sencillo la especificidad de unión de los anticuerpos de longitud completa, pueden expresarse como genes únicos e intracelularmente, en células de mamíferos como intracuerpos, con el potencial para la alteración de los plegamientos, interacciones, modificaciones o localización subcelular de sus dianas, véase para revisión, por ejemplo, Miller y Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394-401.

[0170] En una estrategia diferente, Muller y col., Expert Opin. Biol. Ther. (2005) 237-241, describen una plataforma tecnológica denominada «tecnología de superanticuerpos», que según se afirma potencia la transferencia de los anticuerpos dentro de células vivas sin efectos nocivos para las mismas. Estos anticuerpos que entran en las células abren nuevas ventanas de diagnóstico y tratamiento. Se ha acuñado el término de «TransAcm» para estos anticuerpos.

[0171] En una realización adicional, puede ser deseable la administración conjunta o secuencial de otros agentes neuroprotectores útiles para tratar una enfermedad sinucleinopática. En una realización, el agente adicional está comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención. Entre los ejemplos de agentes neuroprotectores que pueden usarse para tratar a un sujeto se incluyen, pero sin limitaciones, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, un antagonista del receptor glutamatérgico, inhibidores de quinasas, inhibidores de HDAC, agentes antiinflamatorios, divalproex sódico o cualquier combinación de los mismos. En la materia se describen ejemplos de otros agentes neuroprotectores que pueden usarse de forma concomitante con la composición farmacéutica de la presente invención; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO2007/011907. En una realización, el agente adicional es dopamina o un agonista del receptor de la dopamina.

[0172] En una realización adicional de la presente invención las moléculas de unión a α -sinucleína, en especial los anticuerpos de la presente invención también pueden administrarse conjuntamente o antes o después de la terapia de trasplante con trasplantes neurales o terapia de células madre útiles para el tratamiento de una enfermedad sinucleinopática. Estas estrategias con trasplantes de neuronas mesencefálicas embrionarias se han realizado en pacientes con enfermedad de Parkinson con el objetivo de sustituir las neuronas perdidas en la enfermedad y restituir la neurotransmisión dopaminérgica en el núcleo estriado. A los 11-16 años posttrasplante, se encontró que las neuronas trasplantadas contenían cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy. Esta propagación de la patología de α -sinucleína desde el huésped a los tejidos trasplantados puede prevenirse mediante la administración conjunta de moléculas de unión a α -sinucleína, en especial los anticuerpos de la presente invención.

[0173] Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad del principio activo suficiente para mejorar los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de estos compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, la DE_{50} (dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL_{50} (dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} . Preferiblemente, el agente terapéutico en la composición se presenta en una cantidad suficiente para reestablecer o conservar el comportamiento normal y/o las propiedades cognitivas en el caso de EP, DCL u otras enfermedades sinucleinopáticas.

10

[0174] A partir de lo anterior, es evidente que la presente invención abarca cualquier uso de una molécula de unión a α -sinucleína que comprende las CDR del anticuerpo descrito anteriormente, en especial para el diagnóstico y/o para su uso en el tratamiento de una enfermedad sinucleinopática como se mencionó anteriormente, especialmente la enfermedad de Parkinson. Preferiblemente, dicha molécula de unión al ligando es un anticuerpo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo.

15

[0175] En otra realización, la presente invención se refiere a una composición diagnóstica que comprende cualquiera de las moléculas de unión a α -sinucleína descritas anteriormente, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, polinucleótidos, vectores o células de la invención y, opcionalmente, medios adecuados para la detección, como reactivos usados convencionalmente en métodos diagnósticos inmunológicos o basados en ácidos nucleicos. Los anticuerpos de la invención son, por ejemplo, adecuados para su uso en inmunoensayos en los que pueden utilizarse en fase líquida o unidos a un vehículo en fase sólida. Los ejemplos de inmunoensayos en los que se puede utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Son ejemplos de estos inmunoensayos el radioinmunoensayo (RIA), el sandwich (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y el ensayo de inmunotransferencia. Los antígenos y anticuerpos de la invención pueden unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para aislar las células unidas específicamente a estos. Entre los ejemplos de vehículos bien conocidos se incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Hay muchos marcadores diferentes y procedimientos de marcaje que son conocidos para los expertos en la materia. Entre los ejemplos de los tipos de marcadores que pueden usarse en la presente invención se incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes; véanse también las realizaciones descritas anteriormente en este documento.

[0176] Mediante una realización adicional, las moléculas de unión a α -sinucleína, en especial los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad en un individuo obteniendo una muestra de líquido corporal del individuo del ensayo que puede ser una muestra de sangre, una muestra de linfa o cualquier otra muestra de líquido corporal y poniendo en contacto la muestra de líquido corporal con un anticuerpo de la presente invención en condiciones que permitan la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El nivel de estos complejos se determina a continuación mediante procedimientos conocidos en la técnica, indicando un nivel significativamente mayor que el formado en una muestra control la presencia de enfermedad en el individuo estudiado. De la misma forma, también puede usarse el antígeno específico al que se unen los anticuerpos de la invención. Por tanto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de la invención.

45

[0177] En este contexto, la presente invención también se refiere a medios diseñados específicamente para este fin. Por ejemplo, puede usarse una matriz a base de anticuerpos, que esté cargada, por ejemplo, con anticuerpos o moléculas de unión al antígeno equivalentes de la presente invención que reconocen específicamente a la α -sinucleína. El diseño de inmunoensayos con micromatrices se resume en Kusnezow y col., *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a micromatrices cargadas con moléculas de unión a α -sinucleína identificadas según la presente invención.

50

[0178] En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad sinucleinopática en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

55

(a) evaluar el nivel de α -sinucleína en una muestra del sujeto que se va a diagnosticar con un anticuerpo de la presente invención o su fragmento de unión a α -sinucleína; y

(b) comparar el nivel de α -sinucleína con un patrón de referencia que indica el nivel de la α -sinucleína en uno o más

sujetos control,

donde una diferencia o similitud entre el nivel de la α -sinucleína y el patrón de referencia indica que el sujeto tiene enfermedad de Parkinson.

5

[0179] El sujeto que se va a diagnosticar puede estar asintomático o presintomático para la enfermedad. Preferiblemente, el sujeto control tiene una enfermedad sinucleinopática, por ejemplo EP, DCL o VCLEA, donde una similitud entre el nivel de α -sinucleína y el patrón de referencia indica que el sujeto que va a ser diagnosticado tiene una enfermedad sinucleinopática. Alternativamente, o además como segundo control, el sujeto control no tiene

10

enfermedad sinucleinopática, donde una diferencia entre el nivel de α -sinucleína y el patrón de referencia indica que el sujeto que va a ser diagnosticado tiene una enfermedad sinucleinopática. Preferiblemente, el sujeto que va a ser diagnosticado y el sujeto control tienen una edad similar. La muestra que se va a analizar puede ser cualquier líquido corporal que se sospecha contiene α -sinucleína, por ejemplo una muestra de sangre, LCE u orina.

15

[0180] El nivel de α -sinucleína puede evaluarse mediante cualquier procedimiento conocido en la materia adecuado que comprende, por ejemplo, analizar la α -sinucleína mediante una o más técnicas elegidas entre inmunotransferencia, inmunoprecipitación, ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), selección de células activada por fluorescencia (FACS), electroforesis bidimensional en gel, espectroscopía de masas (EM), desorción/ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a tiempo de vuelo-EM (MALDI-TOF), desorción/ionización por láser de superficie acoplada a tiempo de vuelo (SELDI-TOF), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), cromatografía líquida multidimensional (LC) seguido de espectrometría de masa en tándem (EM/EM) y densitómetro láser. Preferiblemente, dicho estudio por imagen *in vivo* de α -sinucleína comprende tomografía de emisión de positrones (PET), tomografías de emisión de fotón único (SPECT), estudio por imagen óptica en el infrarrojo cercano (NIR) o

20

25

[0181] Los procedimientos de diagnóstico de una enfermedad sinucleinopática como la enfermedad de Parkinson o enfermedad de cuerpos de Lewy, el seguimiento de la progresión de la enfermedad sinucleinopática y el seguimiento del tratamiento de una enfermedad sinucleinopática usando anticuerpos y medios relacionados que pueden adaptarse según la presente invención también se describen en la solicitud internacional WO2007/011907. De forma similar, los procedimientos de detección basados en anticuerpos para α -sinucleína se describen en las solicitudes internacionales WO99/50300, WO2005/047860, WO2007/021255 y WO2008/103472. Esos procedimientos pueden aplicarse como se describe, pero con un anticuerpo específico de α -sinucleína, fragmento de unión, derivado o variante de la presente invención.

35

[0182] Estas y otras realizaciones están descritas y las abarcan la descripción y los ejemplos de la presente invención. La bibliografía adicional correspondiente a cualquiera de los materiales, procedimientos, usos y compuestos que han de utilizarse según la presente invención pueden obtenerse de bibliotecas y bases de datos públicas, usando por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública «Medline» que está hospedada por el National Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine de los National Institutes of Health. Otras bases de datos y direcciones web, como la del European Bioinformatics Institute (EBI), que es parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) son conocidas por los expertos en la materia y también pueden obtenerse usando motores de búsqueda en Internet. En Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364, se proporciona una visión general de la información de patentes en biotecnología y un estudio de las fuentes relevantes de información de patentes útil para la búsqueda retrospectiva y el conocimiento actual.

40

45

[0183] La presente invención se describe, en general, en la memoria descriptiva. Siempre que no se especifique otra cosa, los términos usados en este documento cuentan con las definiciones proporcionadas en el Diccionario Oxford de Bioquímica y Biología Molecular, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 e reimpresso en 2003, ISBN 0198506732.

50

[0184] Puede obtenerse un entendimiento más completo en referencia a los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento solo con fines ilustrativos.

55 EJEMPLOS

[0185] Los ejemplos que aparecen a continuación ilustran adicionalmente la invención, pero no deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención de ninguna forma. Los siguientes experimentos de los ejemplos 1 y 2 se ilustran y describen en referencia a los anticuerpos NI-202.3G12, NI-202.12F4 y NI-202.3D8 como clonados, es

decir, que contienen mutaciones inducidas por el cebador justo en los extremos N-terminal de las regiones variables de Ig estructurales 1 y sin ajustarse a las secuencias de la línea germinal (LG) de las cadenas pesada y ligera variables humanas; véase la figura 1. Sin embargo, los otros anticuerpos de la serie NI-202, en especial aquellos con las secuencias LG ajustadas son estructuralmente similares y, por tanto puede esperarse que proporcionen resultados comparables. Estos anticuerpos se expresaron como moléculas de IgG1 humanas. Los experimentos de los ejemplos 3 y 4 se ilustran y describen en referencia al anticuerpo NI-202.12F4 con mutaciones inducidas por cebador en los extremos N-terminales de las regiones variables de la Ig ajustado a las secuencias de la línea germinal (LG) de las cadenas pesada y ligera de la región variable humana; véase la figura 1. Este anticuerpo se expresaba como una molécula quimérica donde los dominios variables humanos ajustados estaban fusionados con las regiones constantes de la IgG2a de ratón para permitir estudios de administración crónica en modelos de ratones transgénicos sin inducir una respuesta inmune antihumano en ratones.

Material y procedimientos

[0186] Las descripciones detalladas de los métodos convencionales, como los empleados en este documento, pueden encontrarse en la literatura citada. Siempre que no se especifique otra cosa a continuación, la identificación de células B específicas de α -sinucleína y la clonación molecular de los anticuerpos anti- α -sinucleína que muestran especificidad de interés así como su expresión recombinante y caracterización funcional se han realizado o pueden realizarse como se describe en los ejemplos y en la sección de procedimientos suplementarios de la solicitud internacional PCT/EP2008/000053 publicada como WO2008/081008.

Purificación del antígeno

[0187] His- α -sinucleína recombinante se obtuvo mediante expresión recombinante en *Escherichia coli* y posterior purificación usando precipitación inducida por calor, cromatografía de afinidad a níquel, intercambio aniónico y exclusión molecular.

[0188] Por ejemplo, se usó una construcción de ADN que comprendía el ADNc que codifica la α -sinucleína bajo el control del promotor T7 para transformar una cepa de *Escherichia coli* apropiada, como la BL21(DE3) y se indujo la expresión de un cultivo de células de 200 ml mediante la adición de β -D-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) 1 mM. Las células se recogieron tras 4 h de inducción a 37°C y, a continuación, se resuspendieron en 20 ml de Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 8, seguido de sonicación. Tras hervir durante 15 min, se recogió el sobrenadante de 17000 g resistente al calor. De forma similar, se recogió el sobrenadante de 17000 g resistente al calor del control de *Escherichia coli*. Desde, el sobrenadante de 17000 g resistente al calor (20 ml) de *Escherichia coli* que expresaba α -sinucleína etiquetada con His se ajustó con Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8, se cargó en una columna HisTrap HP de 1 ml (GE Life Science) y la HIS- α -sinucleína se eluyó con un gradiente de imidazol 30-500 mM. Las fracciones que contienen HIS- α -sinucleína se agruparon y, a continuación se diluyeron 1:10 con Tris 50 mM pH 8. Las fracciones agrupadas y diluidas se aplicaron en una columna HiTrap Q HP de 1 ml (GE Life Science) y las proteínas unidas se eluyeron en un gradiente de NaCl de 30-1000 mM. Finalmente, los eluidos que contenían HIS- α -sinucleína se purificaron usando filtración en gel de alta resolución (Superdex 200 10/300 GL). Este procedimiento de purificación produce HIS- α -sinucleína con un grado de pureza de aproximadamente el 99% según se estima mediante PAGE-SDS y tinción con Coomassie. La concentración de proteína purificada se determinó usando un ensayo de BCA (Pierce).

Selección de anticuerpos frente a α -sinucleína

[0189] Se recubrieron microplacas de 96 pocillos de media área (Corning) con HIS- α -sinucleína purificada o α -sinucleína (rPéptido) a una concentración estándar de 2 μ g/ml en tampón de recubrimiento (PBS pH 9,6) durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBS-T pH 7,6 y los sitios de unión inespecífica se bloquearon durante 1 hora a TA con PBS-T que contenía BSA al 2% (Sigma, Buchs, Suiza). El medio condicionado con células B se preabsorbió durante 1 h a TA con proteínas resistentes al calor de *E. coli* al 10% en BSA al 1%. Este paso de preabsorción se ha desarrollado después de que varios intentos previos de selección mediante ELISA no permitieran identificar anticuerpos humanos específicos de α -sinucleína. Por tanto, afortunadamente se descubrió que la preabsorción de la placa de ELISA con proteínas resistentes al calor de *E. coli* excluye de la selección falsos negativos como anticuerpos adhesivos y anticuerpos dirigidos frente a contaminaciones proteicas de *E. coli*, probablemente presentes en las muestras purificadas de α -sinucleína recombinante. A continuación, el medio preabsorbido se transfirió de las placas de cultivo de linfocito B de memoria a placas de ELISA y se incubó durante 2 h a TA. Las placas de ELISA se lavaron con PBS-T y, después, se incubaron con anticuerpos policlonales de burro anti IgG humana (específica del fragmento Fc γ) conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras lavar con

PBS-T, se determinó la unión de anticuerpos humanos midiendo la actividad de la HRP en un ensayo colorimétrico estándar.

Clonación molecular de los anticuerpos frente a α -sinucleína

5 **[0190]** Se obtuvieron muestras que contenían células B de memoria de voluntarios >60 años de edad. Todos los voluntarios tenían en común la ausencia de cualquier signo de Parkinsonismo. Se recogieron las células B vivas de los cultivos de células B de memoria seleccionadas y se preparó el ARNm. A continuación, se obtuvieron las secuencias de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas usando cebadores específicos de la región estructural 1 de la Ig para todas las familias de cadenas variables pesadas y ligeras humanas como cebadores 5' en combinación con cebadores específicos de todos los segmentos J (cadenas pesada y ligera kappa) y segmentos C (cadena ligera lambda) como cebadores 3' (Marks y col., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard y col., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

15 **[0191]** La identificación del clon de anticuerpo con la especificidad deseada se realizó mediante la repetición del cribado en ELISA tras la expresión recombinante de anticuerpos completos. La expresión recombinantes de anticuerpos IgG1 humanos completos o de anticuerpos IgG2a quiméricos se consigue tras la inserción de la secuencias de las cadenas pesada y ligera variables «en marco de lectura correcto» en vectores de expresión que complementan la secuencia de la región variable con una secuencia que codifica un péptido líder en el extremo 5' y en el extremo 3' con una secuencia que codifica los dominios constantes apropiados. Para este fin, los cebadores contenían sitios de restricción diseñados para facilitar la clonación de las secuencias variables de las cadenas pesada y ligera en vectores de expresión de anticuerpos. Las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas se expresan insertando en marco el producto de RT-PCR de la cadena pesada de la inmunoglobulina en un vector de expresión de cadena pesada que lleva un péptido señal y los dominios constantes de las cadenas gamma 1 de la inmunoglobulina humana o gamma 2^a de la inmunoglobulina de ratón. La cadena ligera kappa de la inmunoglobulina se expresa mediante la inserción en marco del producto de la RT-PCR de la cadena ligera kappa de NI-202.3D8 en un vector de expresión de cadena ligera que proporciona un péptido señal y el dominio constante de la cadena ligera kappa de la inmunoglobulina humana. La cadena ligera lambda de las inmunoglobulinas NI-202.12F4 y NI-202.3G12 se expresa mediante la inserción del producto de la RT-PCR de la cadena ligera kappa en marco dentro de un vector de expresión de cadena ligera lambda que proporciona un péptido señal y el dominio constante de la cadena ligera kappa de la inmunoglobulina humana o de ratón.

35 **[0192]** Los anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales se obtienen tras la transfección conjunta en células HEK293 o CHO (o en cualquier otra línea celular receptora apropiada de origen humano o murino) de un vector de expresión de la cadena pesada de Ig y un vector de expresión de la cadena ligera kappa o lambda de Ig. Posteriormente, el anticuerpo monoclonal humano recombinante se purifica a partir del medio condicionado usando una purificación en columna de proteína A estándar. El anticuerpo monoclonal humano recombinante puede producirse en cantidades ilimitadas usando células transfectadas de forma transitoria o estable. La línea celular productora del anticuerpo monoclonal humano recombinante puede estabilizarse usando los vectores de expresión de Ig directamente o clonando de nuevo las regiones variables de Ig en diferentes vectores de expresión. También pueden generarse derivados como F(ab), F(ab)₂ y scFV a partir de estas regiones variables de Ig.

Anticuerpos

45 **[0193]** El anticuerpo policlonal de conejo pan sinucleína (Abcam), el anticuerpo monoclonal de ratón específico de α -sinucleína LB509 (Invitrogen), el anticuerpo Sny211 (Sigma) y el Clon 42 (BD Biosciences) se usaron según el protocolo del fabricante. Los anticuerpos humanos recombinantes frente a α -sinucleína NI202.3G12, NI202.12F4 y NI-202.3D8 son anticuerpos de esta invención. Estos se expresaron en células HEK293 o CHO y, a continuación, se usaron directamente medios condicionados en aplicaciones posteriores siempre que no se indicara otra cosa. En los ejemplos 3 a 5 se usaron anticuerpos recombinantes purificados de la presente invención.

ELISA directo

55 **[0194]** Se recubrieron microplacas de 96 pocillos de media área (Corning) con antígenos a las concentraciones indicadas en PBS pH 9.6 durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron en PBS-T pH 7,6 y los sitios de unión inespecífica se bloquearon durante 1 h a TA con PBS-T que contenía BSA al 2% (Sigma). A continuación, las sondas (anticuerpos primarios) se transfirieron a los pocillos y se incubaron durante 2 h a TA. Tras lavar con PBS-T pH 7,6, los pocillos se incubaron con anticuerpos secundarios policlonales anti-humano (para los anticuerpos humanos recombinantes), anti-conejo (para el anticuerpo pan sinucleína) o anti-ratón (para LB509 o Syn211)

conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h a TA. Tras un lavado riguroso con PBS-T, la unión de las sondas se determinó midiendo la actividad HRP en un ensayo colorimétrico estándar usando 3,3',5,5'-tetrametilbifenil-4,4'-diamina (Sigma) como sustrato cromogénico.

5 Inmunotransferencia y tinción de proteínas con Coomassie

[0195] Para evaluar la unión a α -sinucleína humana y de ratón se homogeneizaron cerebros congelados de ratones de tipo salvaje o transgénicos para α -sinucleína en PBS (10 ml/g de peso húmedo) usando un homogeneizador Dounce. El extracto se centrifugó a 100 000 g y el sobrenadante se denominó fracción soluble. La fracción soluble o de proteínas recombinantes (750 ng) se mezcló con colorante de carga, se calentó a 65°C durante 10 min y se cargaron 0,75 μ g por carril y se separaron en un PAGE-SDS con Tris-Glicina 4-20%. Los geles se tiñeron con una solución de Coomassie Brilliant blue R 250 al 0,025% (Fluka) o se electrotransfirieron a una membrana de transferencia de nitrocelulosa. A continuación las transferencias se incubaron con el anticuerpo primario durante 2 horas. La unión de los anticuerpos primarios se reveló usando anticuerpos secundarios anti humano conjugados con HRP. Las transferencias se desarrollaron usando ECL más reactivos de detección para inmunotransferencias (GE Healthcare). Para evaluar la unión a los monómeros y agregados de α -sinucleína, se prepararon extractos de cerebro en PBS con Tritón X100 al 0,5% seguido de la centrifugación a 1000 g durante 5 min. Los sobrenadantes se separaron mediante electroforesis en gel NuPAGE con Bis-Tris 4-12% y se analizaron mediante inmunotransferencia.

20

Prueba de la barra

[0196] La prueba se realizó en los ratones al inicio de la fase de oscuridad cuando estaban más activos. La barra se prepara a partir de un palo de madera de 50 cm de longitud y un 1 cm de espesor cubierto con un trapo para facilitar el ascenso. La base de la barra se coloca en la jaula del ratón. El ratón se colocan en la parte superior de la barra y se registra el tiempo que tarda en orientarse hacia abajo y el tiempo que tarda en descender hasta la jaula durante 5 pruebas con intervalos de 30 min entre cada prueba. Se analiza la prueba mejor realizada.

Prueba del laberinto en cruz elevado

30

[0197] La prueba se realizó en los ratones al inicio de la fase de oscuridad cuando estaban más activos y con poca luz (40 lux). El laberinto en cruz elevado consta de dos brazos abiertos y dos brazos cerrados (longitud del brazo: 30 cm; anchura: 5 cm). Los brazos abiertos tienen un pequeño borde de 1 cm y los brazos cerrados están bordeados por una pared de 15 cm. Al inicio de la tarea, los ratones se colocan en el centro del laberinto en cruz elevado mirando hacia un brazo abierto. Se graba en vídeo a los ratones mientras exploran el laberinto durante 5 min. Se mide y analiza el tiempo empleado en los brazos abiertos y cerrados y la distancia recorrida.

35

Ratones transgénicos

[0198] Los ratones transgénicos para α -sinucleína B6;C3-Tg(Prnp-SNCA*A53T)83Vle/J (Giasson y col., Neuron. 34 (2002), 521-533) y los correspondientes ratones de tipo salvaje se mantuvieron en condiciones de alojamiento estándar con un ciclo invertido de 12h:12h luz/oscuridad con acceso libre al pienso y al agua. Los grupos de tratamiento se equilibraron por edad y sexo.

Determinación de los niveles de NI-202.12F4 y α -sinucleína en el plasma del ratón

[0199] Los niveles en plasma de NI-202.12F4 se determinaron usando un ELISA directo para α -sinucleína usando NI-202.12F4 recombinante de concentración conocida como patrón. Para la determinación de los niveles de α -sinucleína humana en plasma se aplicó un ELISA tipo sandwich (Invitrogen, EE. UU.).

50

Ejemplo 1: Identificación de anticuerpos humanos específicos de α -sinucleína con diferentes especificidades de epitope

[0200] La α -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos (aa) de longitud desplegada en su forma nativa t compuesta por tres dominios. Estos son la región N-terminal repetida anfipática (1-60 aa), la región central (61-95 aa) y la región C-terminal ácida (96-140). Para entender mejor la especificidad de los anticuerpos humanos recombinantes frente α -sinucleína, se determinó la secuencia del dominio de α -sinucleína que contiene la secuencia de reconocimiento. Se recubrieron placas de ELISA con las formas truncadas de α -sinucleína 1-60 aa, 1-95 aa, 61-140 aa y 96-140 aa a igual concentración y se comprobó a continuación la capacidad de unión de los

55

autoanticuerpos NI-202.3G12 y NI-202.12F4 a estas formas truncadas.

[0201] Curiosamente, NI-202.3G12 sólo se une a las placas recubiertas con α -sinucleína de longitud completa pero no lo hace a ninguna de las cuatro formas truncadas ensayadas (fig. 2a). Esto sugiere que el epítope de reconocimiento de NI-202.3G12 es un motivo estructural en lugar de una secuencia de reconocimiento primaria lineal.

[0202] Por otro lado, NI-202.12F4 se une a los fragmentos de α -sinucleína que comprenden los aa 1-60 (figura 2B) pero no a los fragmentos truncados en el extremo N-terminal que comprenden los aminoácidos 61-140 o 96-140. Esto muestra que este epítope se localiza dentro del extremo N-terminal. Es de destacar que la caracterización de los anticuerpos monoclonales de ratón que selectivamente se unen a la α -sinucleína en las inclusiones patológicas, reveló que sus epítopos están dentro del segmento más próximo al extremo N-terminal (Waxman y col., *Acta Neuropathol.* 116 (2008), 37-46).

[0203] Además, los resultados preliminares de los ensayos ELISA directos realizados con el anticuerpo NI-202.3D8 mostraron que NI-202.3D8 reconoce específicamente el extremo C-terminal de α -sinucleína, en particular los aminoácidos 96-140. La delección de los aminoácidos clave 125-140 dentro del dominio C-terminal altera en gran medida la agregación de la α -sinucleína y en los cerebros de pacientes con demencia debido a enfermedad de cuerpos de Lewy (ECL) así como en modelos de animales transgénicos, se produce una abundante acumulación de fragmentos C-terminales de α -sinucleína. Estos estudios sugieren que los anticuerpos capaces de reconocer la región C-terminal podrían tener posibles efectos terapéuticos; véase Masliah y col., *Neuron*, 46 (2005), 857-568.

[0204] Para excluir que las formas truncadas que comprenden el extremo C-terminal de la α -sinucleína no recubren de forma eficaz las placas de ELISA, se realizó un mapeo de epítopos del anticuerpo monoclonal de ratón frente a alfa sinucleína LB509 (Baba y col., *Am. J. Pathol.* 152 (1998), 879-884). LB509 se une a un epítotope C-terminal (Jakes y col., *Neuroscience Letters* 269 (1999), 13-16). Como se muestra en la figura 2C, este estudio confirma el epítotope C-terminal de LB509 y, por tanto, confirma el recubrimiento eficaz de los fragmentos C-terminales de la α -sinucleína. En conclusión, el mapeo de epítopos de los anticuerpos humanos recombinantes frente a α -sinucleína en los experimentos realizados según la presente invención muestra que estos anticuerpos están dirigidos frente a diferentes epítopos, incluyendo epítopos conformacionales y posibles estructuras patológicas en los extremos N-terminal y C-terminal.

Ejemplo 2: Los anticuerpos humanos son específicos de α -sinucleína

[0205] Las α , β y γ -sinucleínas son proteínas con una elevada homología que se expresan predominantemente en el sistema nervioso, en músculo esquelético y en el corazón. Sin embargo, solo la α -sinucleína anómala se asocia con un amplio espectro de enfermedades del SNC mientras que se sugiere que la β -sinucleína puede ser un inhibidor de la agregación de α -sinucleína y puede proteger al sistema nervioso central de los efectos neurotóxicos de esta última. Por tanto, los anticuerpos (terapéuticos) frente a variantes patológicas de α -sinucleína preferiblemente no correaccionan con β y γ -sinucleína. Para apoyar el uso específico y el potencial terapéutico de los anticuerpos humanos recombinantes anti- α -sinucleína, se comprobó la unión de los anticuerpos candidatos a α , β y γ -sinucleína en un ensayo ELISA directo y mediante inmunotransferencia (WB). En primer lugar, las placas de ELISA se recubrieron con α , β y γ -sinucleína recombinantes a concentraciones de recubrimiento equivalentes (2 μ g/ml) y, a continuación, se incubaron con un anticuerpo control pan sinucleína o anticuerpos humanos recombinantes frente a α -sinucleína. El anticuerpo pan sinucleína reacciona con las placas de ELISA recubiertas con las tres proteínas sinucleína (figura 3^a). Después, se comprobó la especificidad de unión a α -sinucleína de los anticuerpos humanos recombinantes frente a α -sinucleína. Tanto NI-202.3G12 como NI-202.12F4 reaccionan con los pocillos recubiertos de α -sinucleína pero no con β ni γ -sinucleína (figuras 3a y 3B).

[0206] De forma similar, la especificidad de los anticuerpos recombinantes también se estudió usando análisis mediante WB. La tinción de proteínas con Coomassie confirma que se han aplicado concentraciones equivalentes de las tres proteínas sinucleína al análisis por PAGE-SDS (figura 4a). A continuación el análisis mediante WB mostraba que NI-202.12F4 se une selectivamente a α -sinucleína (figura 4B) mientras que sin anticuerpo primario no se detectaba señal (figura 4C). La unión de NI-202.3G12 a α -sinucleína en WB era indetectable. Esto coincide con un epítotope estructural en lugar de la secuencia de reconocimiento lineal de NI-202.3G12. Estos resultados demuestran que los anticuerpos recombinantes humanos frente a alfa sinucleína descritos en la presente invención puede ser altamente específicos.

[0207] Todos los experimentos posteriores se realizaron con el anticuerpo quimérico de ratón NI-202.12F4.

Ejemplo 3: Especificidades de unión del anticuerpo NI-202.12F4Unión específica a α -sinucleína humana con preferencia por especies de α -sinucleína agregada

5

[0208] Para evaluar la unión de NI-202.12F4 a α -sinucleína humana y de ratón, se prepararon extractos de cerebro de ratones de tipo salvaje y transgénicos para α -sinucleína A53T y se analizó la unión del anticuerpo mediante inmunotransferencia. NI-202.12F4 detecta una banda prominente que se corresponde con α -sinucleína en extractos de cerebros de ratones transgénicos para α -sinucleína A53T humana mientras que dicha banda está prácticamente ausente en los extractos de los cerebros de ratones de tipo salvaje (figura 5^a), que sugiere la unión a la α -sinucleína humana pero no de ratón. Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo comercial LB509 (Jakes y col., Neuroscience Letters 269 (1999), 13-16) dirigido frente a un epítipo específico de la α -sinucleína humana. Por el contrario, el anticuerpo comercial del clon 42 (van der Putten y col., J. Neurosci. 20 (2000), 6021-6029) que como se publicó se une a ambas especies de α -sinucleína, detecta tanto la proteína α -sinucleína humana como la de ratón. Estos datos sugieren que NI-202.12F4 se une preferentemente a la α -sinucleína humana.

[0209] Para evaluar la unión de NI-202.12F4 tanto a formas fisiológicas como a agregados patológicos de la α -sinucleína humana, se prepararon extractos de cerebros corticales de un sujeto control sano y de un paciente con demencia con cuerpos de Lewy (DCL) así como extractos de cerebro de ratones de tipo salvaje y de ratones transgénicos para la α -sinucleína A30P humana (Kahle y col. J. Neurosci. 20 (2000), 6365-73) que se separaron mediante electroforesis en gel en presencia de SDS y se analizaron mediante inmunotransferencia. NI-202.12F4 detecta con alta sensibilidad una mancha prominente que refleja formas oligoméricas y fibrilares de agregados de α -sinucleína en DCL y en extracto de cerebro de transgénicos para α -sinucleína A30P pero no en los extractos del control sano ni en control de tipo salvaje (figura 5B). Por el contrario, se observó una unión mínima a formas monoméricas de α -sinucleína en tejidos humanos o de ratón de tipo salvaje y una unión moderada en los extractos de cerebro de ratones transgénicos para α -sinucleína A30P que sobreexpresaban en gran medida α -sinucleína. Por el contrario, el anticuerpo del clon 42 mostraba el patrón de unión opuesto en el análisis mediante inmunotransferencia, detectando formas monoméricas y fragmentos de α -sinucleína con una alta sensibilidad y uniéndose muy mal a las especies agregadas de α -sinucleína. Estos resultados sugieren que NI-202.12F4 se une preferentemente a agregados patológicos de α -sinucleína como oligómeros y fibrillas por encima de los monómeros fisiológicos de α -sinucleína.

NI-202.12F4 se une a la alfa sinucleína humana de tipo natural y a los mutantes causantes de enfermedad con alta afinidad

35

[0210] Se determinó la concentración eficaz máxima medida (EC_{50}) para la α -sinucleína humana de tipo natural así como para los mutantes causantes de la enfermedad usando un ELISA directo para α -sinucleína. Se observó una unión de alta afinidad para el tipo natural así como para las formas mutantes A30P, E46K y A53T de la α -sinucleína humana (figura 6).

40

NI-202.12F4 recombinante se une preferentemente a formas patológicas de α -sinucleína en cerebro.

[0211] La unión de NI-202.12F4 a α -sinucleína se caracterizó adicionalmente mediante tinción inmunohistoquímica de cortes de cerebro de ratones transgénicos para α -sinucleína y de pacientes con enfermedad de Parkinson o demencia con cuerpos de Lewy neuropatológicamente confirmada. NI-202.12F4 muestra una tinción prominente de la patología de α -sinucleína incluyendo inclusiones como cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy así como pequeñas acumulaciones somatodendríticas y sinápticas de α -sinucleína en cortes flotantes de ratones transgénicos que expresan α -sinucleína A53T (figura 7a) o A30P (figura 7B) humana así como en tejidos de cerebro humano de enfermedad de Parkinson y demencia con cuerpos de Lewy (figuras 7C y D). Al contrario que el anticuerpo comercial Syn211 (Gianson y col., J. Neurosci. Res. 59 (2000), 528-33) que también detecta α -sinucleína sináptica fisiológica con una alta sensibilidad (figura 7E), NI-202.12F4 se une preferentemente a agregados patológicos de α -sinucleína como ocurre por ejemplo en la tinción inmunohistoquímica de ratones transgénicos para la α -sinucleína A30P humana (figura 7B). La unión de NI-202.12F4 está prácticamente ausente en los cortes de cerebro de ratones de tipo salvaje (figura 7F) comparable con la tinción control solo con anticuerpo secundario (figura 7G) lo que confirma la unión preferente a α -sinucleína humana frente a la de ratón como se observó en el análisis mediante inmunotransferencia (figura 5). Por el contrario, el anticuerpo comercial del clon 42 (van der Putten y col., J. Neurosci. 20 (2000), 6021-6029) que se publicó se une a la α -sinucleína de origen humano así como de ratón, mostraba una tinción sináptica prominente de la proteína α -sinucleína de ratón en cortes de cerebro de ratones de tipo salvaje (figura 7 H).

55

NI-202.12F4 muestra unión preferencial por la α -sinucleína humana a altas concentraciones de recubrimiento lo que apunta a un epítipo conformacional

5 **[0212]** La concentración eficaz máxima media (EC_{50}) que indica la potencia de un anticuerpo se determinó para concentraciones de recubrimiento bajas y altas de α -sinucleína recombinantes usando un ELISA directo para α -sinucleína. Se observó unión de alta afinidad de NI-202.12F4 recombinante con una EC_{50} de \square 100 pM para altas densidades de recubrimiento de proteína α -sinucleína (20 μ g/ml). A concentraciones de recubrimiento más bajas de α -sinucleína, se observó una rápida caída de la afinidad, con un aumento correspondiente de la EC_{50} de aproximadamente 100 veces (figura 8 A). Por el contrario, el anticuerpo comercial Syn211 (Gianson y col., J. Neurosci. Res. 59 (2000), 528-33) dirigido frente a un epítipo lineal dentro del extremo C-terminal de la α -sinucleína no mostraba disminución de la afinidad de unión a las densidades de recubrimiento más bajas de alfa sinucleína (figura 8 B). Estos hallazgos sugieren que NI-202.12F4 se dirige preferentemente a un epítipo estructural de la α -sinucleína que se forma a altas concentraciones de α -sinucleína. Los resultados concuerdan con las características inmunohistoquímicas de unión de NI-202.12F4 que sugieren una preferencia por conformaciones patológicas de agregados de α -sinucleína como fibrillas u oligómeros de α -sinucleína. Como se observó para la α -sinucleína de longitud completa, al unirse a la α -sinucleína truncada 1-60, NI-202.12F4, muestra una dependencia equivalente de la concentración de recubrimiento lo que apunta a un epítipo conformacional contenido dentro de los aminoácidos 1-60 de la proteína α -sinucleína (figura 8 C). No obstante, no puede excluirse que los aminoácidos 60-140 de la α -sinucleína puedan influir sobre la formación del epítipo N-terminal. Es de destacar que los aminoácidos N-terminales 1-60 de la α -sinucleína humana que contienen la mutación A53T son idénticos al 100% al extremo N-terminal de la α -sinucleína de ratón. Por tanto, la preferencia observada por la α -sinucleína humana frente a su homóloga de ratón podría ser debida a la influencia de la parte C-terminal de la α -sinucleína sobre la accesibilidad o formación del epítipo de NI-202.12F4 preferido en el extremo N-terminal. Los estudios de mapeo de epítopos usando fragmentos más pequeños derivados del extremo N-terminal de la α -sinucleína (aminoácidos 1-20, 21-40, 41-60, 11-30, 31-50) no revelaron unión del anticuerpo NI-202.12F4 a ninguno de los péptidos, lo que sugiere que estas regiones no son suficientes para la unión de NI-202.12F4 (figura 8 D).

30 **Ejemplo 4: El anticuerpo derivado de humano recombinante frente a alfa sinucleína mejora el rendimiento motor y el comportamiento en el laberinto en cruz elevado en un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Parkinson**

[0213] Para evaluar los efectos farmacológicos del tratamiento con NI-202.12F4, se trató semanalmente i.p. a ratones transgénicos de 10,5 meses de edad que sobreexpresaban el transgén de la α -sinucleína A53T humana (Giasson y col., Neuron 34 (2002), 521-533) con 5 mg/kg de anticuerpo NI-202.12F4 quimérico recombinante o vehículo control durante un total de 4 meses. Tras 2 meses de tratamiento, el rendimiento motor se evaluó en la prueba de la barra. Los ratones tratados con NI-202.12F4 mostraban una mejora significativa en el rendimiento motor en comparación con el grupo tratado con el vehículo con una reducción significativa en el tiempo de giro en la barra (Tgiro; $p < 0,001$; $n = 17-19$ animales por grupo) así como en el tiempo total para descender a la jaula (Ttotal; $p < 0,05$; $n = 17-19$ animales por grupo) como se muestra en la figura 9. En una segunda prueba de comportamiento, se analizaron los efectos del tratamiento sobre la realización del laberinto en cruz elevado. Previamente se comunicó que los ratones transgénicos para α -sinucleína A53T mostraban alteraciones de comportamiento en el laberinto en cruz elevado, utilizando más tiempo en los brazos abiertos en comparación con los controles de tipo silvestre (George y col., Exp. Neurol., 210 (2008), 788-92). Como se muestra en la figura 10, el tratamiento crónico con NI-202.12F4 induce una mejora significativa en el comportamiento en el laberinto en cruz elevado de los animales transgénicos para α -sinucleína A53T. Los ratones tratados con anticuerpos tardan significativamente menos tiempo y cubren una distancia significativamente menor en los brazos abiertos en comparación con los animales tratados con el vehículo ($p < 0,05$; $n = 17-19$ animales por grupo) mientras que los niveles de actividad eran equivalentes en ambos grupos. Estos resultados demuestran que el tratamiento crónico con el anticuerpo NI-202.12F4 induce una mejora significativa en el rendimiento motor y una recuperación del comportamiento anómala en el laberinto en cruz elevado en modelos de ratón transgénico para α -sinucleína de enfermedad de Parkinson.

55 **Ejemplo 5: El anticuerpo NI-202.12F4 aumenta los niveles plasmáticos de α -sinucleína en modelos de ratones transgénicos para α -sinucleína de enfermedad de Parkinson**

[0214] Se trató a ratones transgénicos para α -sinucleína A53T de 10,5 meses de edad semanalmente i.p. con NI-202.12F4 quimérico a 5 mg/kg o PBS durante 2 meses. Veinticuatro horas después de la última inyección, se prepararon muestras de plasma y se determinaron las concentraciones plasmáticas del anticuerpo de tratamiento y de α -sinucleína humana mediante ELISA (figura 11). Los niveles plasmáticos de α -sinucleína humana aumentaban

significativamente en más de 10 veces en comparación con los animales tratados con el vehículo ($25 \pm 4,1$ ng/ml para el grupo de tratamiento con NI-202.12F4 frente a $1,9 \pm 1,2$ ng/ml para el grupo de PBS, $p = 0,0002$) lo que demuestra la modulación farmacodinámica de la α -sinucleína tras el tratamiento con NI-202.12F4. Se observaron efectos similares tras el tratamiento agudo con anticuerpo en los ratones transgénicos para α -sinucleína A30P.

5 Como en los modelos transgénicos para α -sinucleína A53T y A30P, la α -sinucleína humana se expresan predominantemente en el cerebro, el aumento de α -sinucleína humana en circulación podría ser debido a un flujo de salida neto mediado por NI-202.12F4 de esta proteína del cerebro a la periferia.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

[0215]

<110> Neurimmune Therapeutics AG

15 <120> Anticuerpos humanos anti-alfa sinucleína

<130> NE30A27/P-WO

<150> US 61/139.253

20 <151> 19/12/2008

<150>EP 08 022 188.0

<151> 19/12/2008

25 <160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

30 <211> 140

<212> PROT

<213> Homo sapiens

<220>

35 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(140)

<223> Secuencia de aminoácidos de alfa-sinucleína; véase, p. ej., Ueda y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993), 1282-1286; GenBank de swissprot: locus SYUA_HUMAN, número de acceso P37840

40 <400> 1

ES 2 544 569 T3

```

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

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

```

<210> 2

<211> 363

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SC

10 <222> (1)..(363)

<223>NI-202.3G12-VHB1 secuencia de la región variable (VH) de la cadena pesada

<220>

<221> Región V

15 <222> (91)..(105)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>

<221> Región V

20 <222> (198)..(198)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>

ES 2 544 569 T3

<221> Región V
 <222> (295)..(330)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
 <220>

5

<221> Región V
 <222> (295)..(330)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

10 <400> 2

gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gct	gag	gtg	aag	aag	ccg	ggg	gcc	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tca	gtg	aga	ctc	tcc	tgt	agg	gct	tct	gga	tac	aac	ttc	atc	gac	ttc	96
Ser	Val	Arg	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Phe	Ile	Asp	Phe	
			20					25					30			
cat	ata	cac	tgg	gtg	cga	cag	gcc	cct	gga	gag	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
His	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40						45			
ggc	tgg	agt	aat	cct	caa	agt	ggc	aac	tca	agt	tct	gca	cag	agg	ttt	192
Gly	Trp	Ser	Asn	Pro	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Ser	Ser	Ala	Gln	Arg	Phe	
	50					55					60					
cag	ggc	cgg	gtc	acc	atg	acc	acg	gac	acg	tcc	atg	tcc	gcg	gcc	tac	240
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Met	Ser	Ala	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
atg	gac	ctg	aac	tgg	ctg	aca	ctt	gac	gac	acg	gcc	gtg	tat	tac	tgt	288
Met	Asp	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Leu	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
acg	aga	ccc	cat	gat	ggc	gca	gga	aac	tac	cga	ttt	gac	acc	tgg	ggc	336
Thr	Arg	Pro	His	Asp	Gly	Ala	Gly	Asn	Tyr	Arg	Phe	Asp	Thr	Trp	Gly	
			100					105					110			
cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tcg								363
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120									

<210> 3
 15 <211> 121
 <212> PROT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

20

ES 2 544 569 T3

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Asp Phe
20          25          30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45

Gly Trp Ser Asn Pro Gln Ser Gly Asn Ser Ser Ser Ala Gln Arg Phe
50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Met Ser Ala Ala Tyr
65          70          75          80

Met Asp Leu Asn Trp Leu Thr Leu Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

Thr Arg Pro His Asp Gly Ala Gly Asn Tyr Arg Phe Asp Thr Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 4

<211> 121

5 <212> PROT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(121)

<223> NI-202.3G12-VHB1-LG Secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) alineada con la secuencia de la línea germinal (LG)

<220>

15 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (31)..(35)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>

20 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (50)..(66)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>

25 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (99)..(110)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

ES 2 544 569 T3

<400> 4

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Asp Phe
          20          25          30

His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

Gly Trp Ser Asn Pro Gln Ser Gly Asn Ser Ser Ser Ala Gln Arg Phe
          50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Met Ser Ala Ala Tyr
65          70          75          80

Met Asp Leu Asn Trp Leu Thr Leu Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Thr Arg Pro His Asp Gly Ala Gly Asn Tyr Arg Phe Asp Thr Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

5

<210> 5
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> SC
 <222> (1)..(324)
 <223>NI-202.3G12-VLc1 secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL)

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (67)..(99)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

20

<220>
 <221> Región V
 <222> (145)..(165)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

25

<220>
 <221> Región V

ES 2 544 569 T3

<222> (262)..(294)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

<400> 5

5

cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tcg gtg tca gtg gcc cca gga cag	48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
acg gcc agg atc acc tgc tct ggt gat gcc ttg cca aaa cac tat gct	96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys His Tyr Ala	
20 25 30	
cat tgg tac cag cag aag cca ggc cag gtc cct ata gtg gtc atc tat	144
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ile Val Val Ile Tyr	
35 40 45	
aaa gac act gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggt tcc	192
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	
acc tca ggg aca aca gtc acc ctg acc atc agt ggc gtc cag gca gag	240
Thr Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu	
65 70 75 80	
gac gag gct cat tat tat tgt caa tca gca gac gtc agt tca act tat	288
Asp Glu Ala His Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Val Ser Ser Thr Tyr	
85 90 95	
gtt gtg ttt ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta	324
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
100 105	

<210> 6

<211> 108

10 <212> PROT

<213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 544 569 T3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys His Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ile Val Val Ile Tyr
35 40 45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

ES 2 544 569 T3

Asp Glu Ala His Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Val Ser Ser Thr Tyr
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

- <210> 7
- <211> 108
- 5 <212> PROT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> PÉPTIDO
- 10 <222> (1)..(108)
- <223> NI-202.3G12-VLc1-LG Secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL) alineada con la secuencia de la línea germinal (LG)

- <220>
- 15 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
- <222> (23)..(33)
- <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

- <220>
- 20 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
- <222> (49)..(55)
- <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

- <220>
- 25 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
- <222> (88)..(98)
- <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

- <400> 7
- 30

ES 2 544 569 T3

```

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1          5          10          15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys His Tyr Ala
20          25          30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ile Val Val Ile Tyr
35          40          45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50          55          60

Thr Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65          70          75          80

Asp Glu Ala His Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Val Ser Ser Thr Tyr
85          90          95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100          105

```

5 <210> 8
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)
 <223>NI-202.12F4-VHA1b secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH)

15 <220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(105)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

20 <220>
 <221> Región V
 <222> (147)..(204)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

25 <220>
 <221> Región V
 <222> (301)..(306)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

30 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (319)..(339)
 <223> La secuencia de nucleótidos de las posiciones 319 a 339 puede leerse alternativamente «tcc cgg gtc acc gtc gcc tca» y codifica los aminoácidos «Ser Arg Val Thr Val Ala Ser»

35

ES 2 544 569 T3

<400> 8

gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggt ctg gtc gag ccg ggg ggg	48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc cta aga ctc tcc tgt gca gtc tcc gga ttc gat ttc gaa aaa gcc	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Phe Glu Lys Ala	
20 25 30	
tgg atg agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg cag ggg cta cag tgg gtt	144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Val	
35 40 45	
gcc cgt atc aag agc aca gct gat ggt ggg aca aca agc tac gcc gcc	192
Ala Arg Ile Lys Ser Thr Ala Asp Gly Gly Thr Thr Ser Tyr Ala Ala	
50 55 60	
ccc gtg gaa ggc agg ttc atc atc tca aga gat gat tcg aga aac atg	240
Pro Val Glu Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Met	
65 70 75 80	
ctt tat ctg caa atg aac agt ctg aaa act gaa gac aca gcc gtc tat	288
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
85 90 95	
tat tgt aca tca gcc cac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc	336
Tyr Cys Thr Ser Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
tcg	339
Ser	

5 <210> 9

<211> 113

<212> PROT

<213> Homo sapiens

10 <400> 9

ES 2 544 569 T3

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Phe Glu Lys Ala
20           25           30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Val
35           40           45

Ala Arg Ile Lys Ser Thr Ala Asp Gly Gly Thr Thr Ser Tyr Ala Ala
50           55           60

Pro Val Glu Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Met
65           70           75           80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85           90           95

Tyr Cys Thr Ser Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100          105          110

```

Ser

- <210> 10
- <211> 113
- 5 <212> PROT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> PÉPTIDO
- 10 <222> (1)..(113)
- <223> NI-202.12F4-VHA1b-LG Secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) alineada con la secuencia de la línea germinal (LG)

- <220>
- 15 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
- <222> (31)..(35)
- <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

- <220>
- 20 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
- <222> (50)..(68)
- <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

- <220>
- 25 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
- <222> (101)..(102)
- <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (107)..(113)

<223> La secuencia de aminoácidos de las posiciones 107 a 1132 puede leerse alternativamente «Ser Arg Val Thr
5 Val Ala Ser»

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Phe Glu Lys Ala
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Lys Ser Thr Ala Asp Gly Gly Thr Thr Ser Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Glu Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Met
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Ser Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

10

<210> 11

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<220>

<221> SC

<222> (1)..(324)

<223>NI-202.12F4-VLa1 secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL)

20

<220>

<221> Región V

<222> (67)..(99)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

25

<220>

<221> Región V

<222> (145)..(165)

ES 2 544 569 T3

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

<220>

<221> Región V

5 <222> (262)..(294)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

<400> 11

cag tct gtg ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag 48
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

acg gcc agg atc acc tgc tct gga gaa gca ttg cca atg caa ttt gct 96
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Met Gln Phe Ala
 20 25 30

cat tgg tac caa cag agg cca ggc aag gcc cca gtg ata gtg gtg tac 144
 His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Val Ile Val Val Tyr
 35 40 45

aaa gac agt gag aga ccg tca ggt gtc cct gag cga ttc tct ggc tcc 192
 Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

agc tca ggg aca aca gcc acg ttg acc atc act gga gtc cag gca gaa 240
 Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80

gat gag gct gac tat tac tgc cag tcg cca gac agc act aac act tat 288
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Pro Asp Ser Thr Asn Thr Tyr
 85 90 95

gaa gtc ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 324
 Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

10

<210> 12

<211> 108

<212> PROT

15 <213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Met Gln Phe Ala
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Val Ile Val Val Tyr
 35 40 45

20

ES 2 544 569 T3

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Pro Asp Ser Thr Asn Thr Tyr
 85 90 95

Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 13

<211> 108

5 <212> PROT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(108)

<223> NI-202.12F4-VLa1-LG Secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL) alineada con la secuencia de la línea germinal (LG)

<220>

15 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (23)..(33)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

<220>

20 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (49)..(55)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

<220>

25 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (88)..(98)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

<400> 13

30

ES 2 544 569 T3

```

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Met Gln Phe Ala
20          25          30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Val Ile Val Val Tyr
35          40          45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50          55          60

Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu
65          70          75          80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Pro Asp Ser Thr Asn Thr Tyr
85          90          95

Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100          105

```

- <210> 14
- <211> 369
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> SC
- 10 <222> (1)..(369)
- <223>NI-202.3D8-VHE1 secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH)

- <220>
- <221> Región V
- 15 <222> (91)..(105)
- <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

- <220>
- <221> Región V
- 20 <222> (148)..(198)
- <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

- <220>
- <221> Región V
- 25 <222> (295)..(336)
- <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

- <400> 14

ES 2 544 569 T3

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	agg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	act	ttc	agt	acc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	
			20					25					30			
gcc	att	tcc	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtg	144
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
gca	att	att	tca	aat	gat	gga	agt	cgt	aaa	tat	tat	gca	gac	tcc	gtg	192
Ala	Ile	Ile	Ser	Asn	Asp	Gly	Ser	Arg	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	agg	gac	acg	ctg	gat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Arg	Asp	Thr	Leu	Asp	
65					70				75					80		
ctg	gaa	atg	aac	agc	ctg	aga	gat	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Glu	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85					90					95			
gcg	aaa	aaa	cga	ggg	acg	tat	gcc	agc	agg	tgc	aaa	gcc	ttt	gac	ttc	336
Ala	Lys	Lys	Arg	Gly	Thr	Tyr	Ala	Ser	Arg	Cys	Lys	Ala	Phe	Asp	Phe	
			100						105					110		
tgg	ggc	cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tcg						369
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120									

<210> 15
 <211> 123
 5 <212> PROT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

ES 2 544 569 T3

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

<210> 16

<211> 123

5 <212> PROT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(123)

<223> NI-202.3D8-VHE1-LG Secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) alineada con la secuencia de la línea germinal (LG)

<220>

15 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (31)..(35)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>

20 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (50)..(66)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>

25 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (99)..(112)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

ES 2 544 569 T3

<400> 16

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
          20          25          30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ala Ile Ile Ser Asn Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asp Thr Leu Asp
65          70          75          80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Lys Lys Arg Gly Thr Tyr Ala Ser Arg Cys Lys Ala Phe Asp Phe
          100          105          110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

5

<210> 17
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> SC
 <222> (1)..(318)
 <223>NI-202.3D8-VKa1 secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL)

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(102)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

20

<220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(168)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

25

<220>
 <221> Región V

ES 2 544 569 T3

<222> (265)..(288)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

<400> 17

5

```

gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt ggc tgg      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Trp
          20          25          30

ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35          40          45

tat gat gcc tcc aat ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc      192
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

gat gat ttt gca act tat tat tgc caa cag tat gat aat tat tgg acg      288
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Trp Thr
          85          90          95

ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa      318
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 18

<211> 106

10 <212> PROT

<213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 544 569 T3

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Trp
           20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Trp Thr
           85           90           95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105

```

5 <210> 19
 <211> 106
 <212> PROT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(106)
 <223> NI-202.3D8-VKa1-LG Secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL) alineada con la secuencia de la línea germinal (LG)

15 <220>
 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
 <222> (24)..(34)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

20 <220>
 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
 <222> (50)..(56)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

25 <220>
 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
 <222> (89)..(96)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

30 <400> 19

ES 2 544 569 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

5 <210> 20
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> SC
 <222> (1)..(321)
 <223>NI-202.3D8-VKc1 secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL)

15 <220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(102)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

20 <220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(168)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

25 <220>
 <221> Región V
 <222> (265)..(291)
 <223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

30 <400> 20

ES 2 544 569 T3

gaa att gtg atg acg cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct att gga	48
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly	
1 5 10 15	
gac aga gtc acc ttc act tgt cgg gcg agt cac gac att agc aat tat	96
Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr	
20 25 30	
tta gcc tgg ttt cgg cag caa cca ggg aaa gcc cct aag tcc ctg atc	144
Leu Ala Trp Phe Arg Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile	
35 40 45	
tat gct gca tct agt ctg caa agt ggg gtc cca tca aga ttc agc gcc	192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala	
50 55 60	
agt gga tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag ccc	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gat ttt gca act tat tat tgt gtt caa tat agg act tac ccc ctc	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Arg Thr Tyr Pro Leu	
85 90 95	
acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa	321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
100 105	

<210> 21

<211> 107

5 <212> PROT

<213> Homo sapiens

<400> 21

ES 2 544 569 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Arg Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Arg Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 22

<211> 107

5 <212> PROT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1)..(107)

<223> NI-202.3D8-VKc1-LG Secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL) alineada con la secuencia de la línea germinal (LG)

<220>

15 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (24)..(34)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

<220>

20 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (50)..(56)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

<220>

25 <221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (89)..(97)

<223> Región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

<400> 22

30

ES 2 544 569 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Arg Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Arg Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano anti- α -sinucleína o su fragmento de unión a α -sinucleína; en el que el anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína comprende en su región variable una región VH CDR1 que
5 comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 31-35 de la SEC ID N° 9, una región VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 50-68 de la SEC ID N° 9, una región VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 101-102 de la SEC ID N° 9, una región VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 23-33 de la SEC ID N° 12, una región VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 49-55 de la SEC ID N° 12, una región VL CDR3 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 88-89 de la SEC ID N° 12.
2. El anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de la reivindicación 1, en el que la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 9 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 12.
15
3. El anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de la reivindicación 1, en el que la región VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 10 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 13.
- 20 4. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4.
- 25 6. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 5.
7. Un procedimiento para preparar un anticuerpo anti- α -sinucleína o su fragmento, comprendiendo dicho procedimiento
- 30 (a) cultivar la célula de la reivindicación 6 y
(b) aislar dicho anticuerpo o su fragmento a partir del cultivo.
8. Un anticuerpo anti- α -sinucleína o su fragmento codificado por el polinucleótido de la reivindicación 4 u
35 obtenible mediante el procedimiento de la reivindicación 7.
9. El anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de cualquier de las reivindicaciones 1 a 3 u 8, que está
- 40 (i) marcado detectablemente, donde el marcador detectable se selecciona a partir del grupo compuesto por una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado o
(ii) unido a un fármaco.
- 45 10. Una composición que comprende el anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8 o 9, el polinucleótido de la reivindicación 4, el vector de la reivindicación 5 o la célula de la reivindicación 6 en el que la composición es
- (i) una composición farmacéutica que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable o
50 (ii) una composición diagnóstica que además comprende uno o más reactivos de diagnóstico inmunológicos o a base de ácido nucleico.
11. El anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8 o 9 para
55 su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad sinucleinopática en un sujeto, en el que la enfermedad sinucleinopática se selecciona a partir del grupo compuesto por enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA), atrofia sistémica múltiple (ASM), insuficiencia autonómica pura (IAP), neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo 1 (NACH-1), enfermedad de Alzheimer, enfermedad

de Pick, distrofia neuroaxonal generalizada de inicio juvenil (enfermedad de Hallervorden-Spatz), esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática y síndrome de Down.

12. El anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de la reivindicación 3 para su uso según la reivindicación 11, en el que la enfermedad sinucleinopática es la enfermedad de Parkinson.

13. Un procedimiento de diagnóstico o control de la progresión de una enfermedad sinucleinopática en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

10 (a) evaluar el nivel de α -sinucleína en una muestra del sujeto que se va a diagnosticar con el anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8 o 9; y

(b) comparar el nivel de α -sinucleína con un patrón de referencia que indica el nivel de α -sinucleína en uno o más sujetos control,

15

en el que una diferencia o similitud entre el nivel de α -sinucleína y el patrón de referencia indica que el sujeto tiene una enfermedad sinucleinopática, donde la enfermedad sinucleinopática se selecciona a partir del grupo compuesto por enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA), atrofia sistémica múltiples (ASM), insuficiencia autónoma pura (IAP), neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo 1 (NACH-1), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, distrofia neuroaxonal generalizada de inicio juvenil (enfermedad de Hallervorden-Spatz), esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática y síndrome de Down.

14. Un kit para el diagnóstico de una enfermedad sinucleinopática, comprendiendo dicho kit el anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8 o 9, el polinucleótido de la reivindicación 3, el vector de la reivindicación 5 y la célula de la reivindicación 6 con reactivos y/o instrucciones para su uso.

15. Una composición que comprende el anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8 o 9 unido a un agente terapéutico o de diagnóstico para su uso en la detección *in vivo* de α -sinucleína, o dirige un agente terapéutico y/o de diagnóstico hacia la α -sinucleína en el cuerpo humano o animal, donde la α -sinucleína se detecta mediante tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotón único (SPECT), estudio por imagen óptica en el infrarrojo cercano (NIR), estudio por imagen mediante resonancia magnética (MRI) o una combinación de los mismos.

35

16. Un procedimiento de seguimiento de la progresión de una enfermedad sinucleinopática o de la respuesta al tratamiento de la enfermedad sinucleinopática en un sujeto que comprende:

(a) poner en contacto una muestra biológica con el anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 8 o 9; y

(b) detectar el anticuerpo o su fragmento de unión a α -sinucleína,

en el que la enfermedad sinucleinopática se selecciona a partir del grupo compuesto por enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA), atrofia sistémica múltiple (ASM), insuficiencia autonómica pura (IAP), neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo 1 (NACH-1), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, distrofia neuroaxonal generalizada de inicio juvenil (enfermedad de Hallervorden-Spatz), esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática y síndrome de Down.

50

A

NI-202.3G12-VHB1 (secuencia de la región variable de la cadena pesada VHB1; SEC ID N.º 3)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
EVQLVQSGAEVKKPGASVRLSCRASGYNFIDFH^IH^IWVRQAPGEGLEWMGWSNPQSGN^SSSAQ
-----FR3-----CDR3-----JH-----
RFQGRVTMTTDTSMSAAYMDLNWLTLD^DTAVYYCTRPHDGAGNYRFD^TWGQGLVTVSS

NI-202.3G12-VHB1-LG (secuencia de la región variable de la cadena pesada VHB1, alineada con la secuencia de la Línea Germinal; SEC ID N.º 4)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
QVQLVQSGAEVKKPGASVRLSCRASGYNFIDFH^IH^IWVRQAPGEGLEWMGWSNPQSGN^SSSAQ
-----FR3-----CDR3-----JH-----
RFQGRVTMTTDTSMSAAYMDLNWLTLD^DTAVYYCTRPHDGAGNYRFD^TWGQGLVTVSS

NI-202.3G12-VLc1 (secuencia de la región variable de la cadena ligera VLc1; SEC ID N.º 6)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2---FR3-----
QSVLTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALPKHYAHWYQKPGQVPIVVIYKDTERPSGIPERFS
-----CDR3-----JK-----
GSTSGTTVTLTISGVQAEDEAHYYCQSADVSSTYVVFGGGTKLTVL

NI-202.3G12-VLc1-LG (secuencia de la región variable de la cadena ligera VLc1, alineada con la secuencia de la Línea Germinal; SEC ID N.º 7)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2---FR3-----
SYELTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALPKHYAHWYQKPGQVPIVVIYKDTERPSGIPERFS
-----CDR3-----JK-----
GSTSGTTVTLTISGVQAEDEAHYYCQSADVSSTYVVFGGGTKLTVL

Fig. 1

B

NI-202.12F4-VHA1b (secuencia de la región variable de la cadena pesada VHA1b; SEC ID N.º 9)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 EVQLVQSGGGLVEPGGSLRLSCAVSGFD**FEKAWMSWVRQAPGQGLQWVARIKSTADGGTTSY**
 -----FR3-----CDR3-----JH-----
AAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMNSLKTEDTAVYYCT**SAHWGQGLVTVSS**

NI-20212F4-VHA1b-LG (secuencia de la región variable de la cadena pesada VHA1b, alineada con la secuencia de la Línea Germinal; SEC ID N.º 10)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAVSGFD**FEKAWMSWVRQAPGQGLQWVARIKSTADGGTTSY**
 -----FR3-----CDR3-----JH-----
AAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMNSLKTEDTAVYYCT**SAHWGQGLVTVSS**

NI-202.12F4-VLa1 (secuencia de la región variable de la cadena ligera VLa1; SEC ID N.º 12)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
 QSVLTQPPSVSVSPGQTARITC**SGEALPMQFAHWYQQRPGKAPVIVVYKDSERPSGVPERFS**
 -----CDR3-----JK-----
 GSSSGTTATLTITGVQAEDEADYYC**QSPDSTNTYEVFGGGTKLTVL**

NI-202.12F4-VLa1-LG (secuencia de la región variable de la cadena ligera VLa1, alineada con la secuencia de la Línea Germinal; SEC ID N.º 13)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
 BYELTQPPSVSVSPGQTARITC**SGEALPMQFAHWYQQRPGKAPVIVVYKDSERPSGVPERFS**
 -----CDR3-----JK-----
 GSSSGTTATLTITGVQAEDEADYYC**QSPDSTNTYEVFGGGTKLTVL**

Fig. 1 (continuación)

C

NI-202.3D8-VHE1 (secuencia de la región variable de la cadena pesada VHE1; SEC ID N.º 15)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAIISWVRQAPGKGLEWVAIISNDGSRKYYAD
 -----FR3-----CDR3-----JH-----
 SVKGRFTISRDNRSRDTLDLEMNSLRDEDTAVYYCAKRRGTYASRCKAFDFWGQGLVTVSS

NI-202.3D8-VHE1-LG (secuencia de la región variable de la cadena pesada VHE1, alineada con la secuencia de la Línea Germinal; SEC ID N.º 16)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAIISWVRQAPGKGLEWVAIISNDGSRKYYAD
 -----FR3-----CDR3-----JH-----
 SVKGRFTISRDNRSRDTLDLEMNSLRDEDTAVYYCAKRRGTYASRCKAFDFWGQGLVTVSS

NI-202.3D8-VKa1 (secuencia de la región variable de la cadena ligera VKa1; SEC ID N.º 18)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASQISGWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRF
 -----CDR3-----JK-----
 SSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYDNYWTFGQGTKVEIK

NI-202.3D8-VKa1-LG (secuencia de la región variable de la cadena ligera VKa1, alineada con la secuencia de la Línea Germinal; SEC ID N.º 19)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQISGWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRF
 -----CDR3-----JK-----
 SSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYDNYWTFGQGTKVEIK

Fig. 1 (continuación)

D

NI-202.3D8-VKc1 (secuencia de la región variable de la cadena ligera VKc1; SEC ID N.º 21)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
EIVMTQSPSSLSASIGDRVTFTCRASHDISNYLAWFRQQPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SASGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCVQYRTYPLTFGQGTRLEIK
```

NI-202.3D8-VKc1-LG (secuencia de la región variable de la cadena ligera VKc1, alineada con la secuencia de la Línea Germinal; SEC ID N.º 22)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
DIQMTQSPSSLSASIGDRVTFTCRASHDISNYLAWFRQQPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SASGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCVQYRTYPLTFGQGTRLEIK
```

Fig. 1 (continuación)

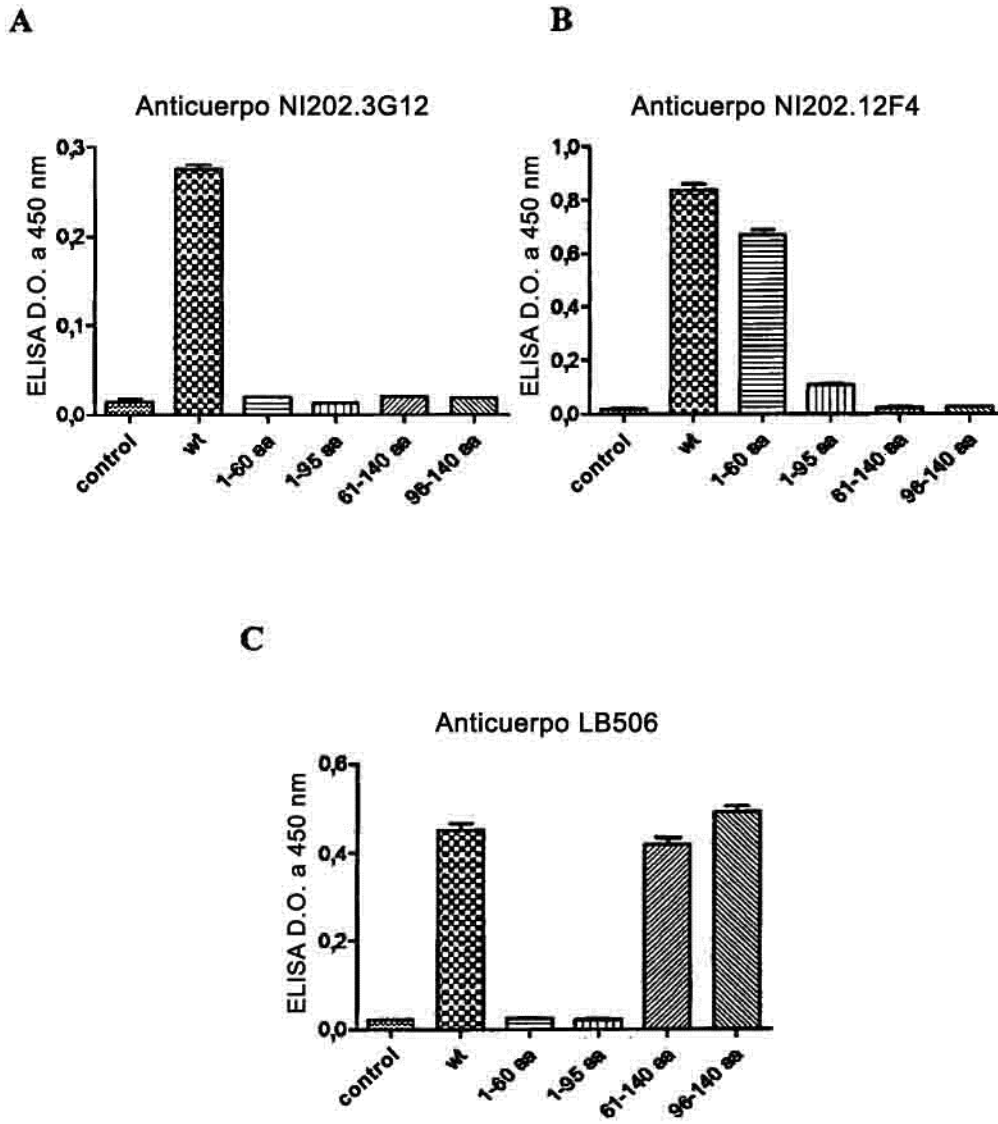
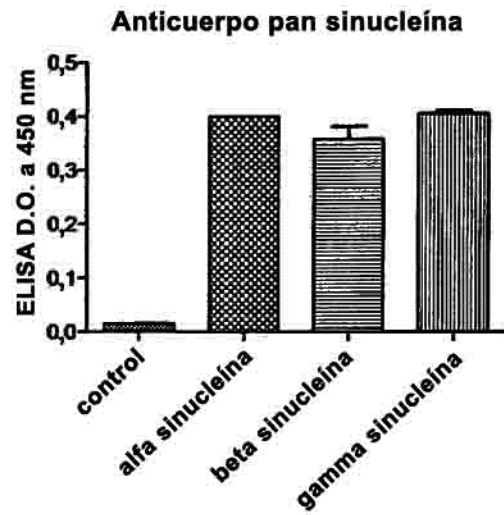
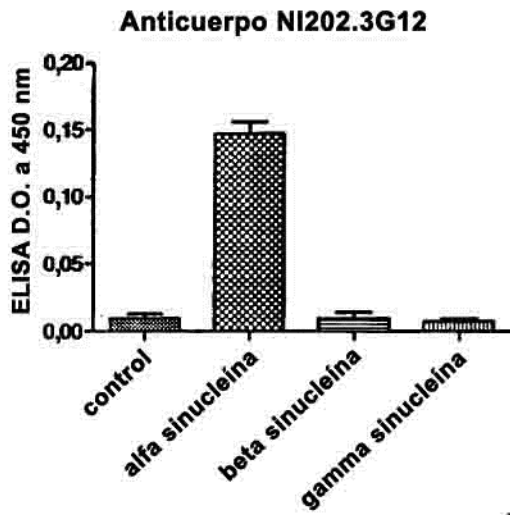


Fig. 2

A



A



B

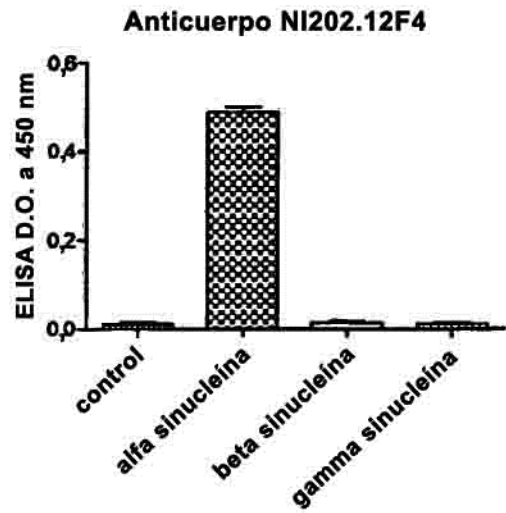


Fig. 3

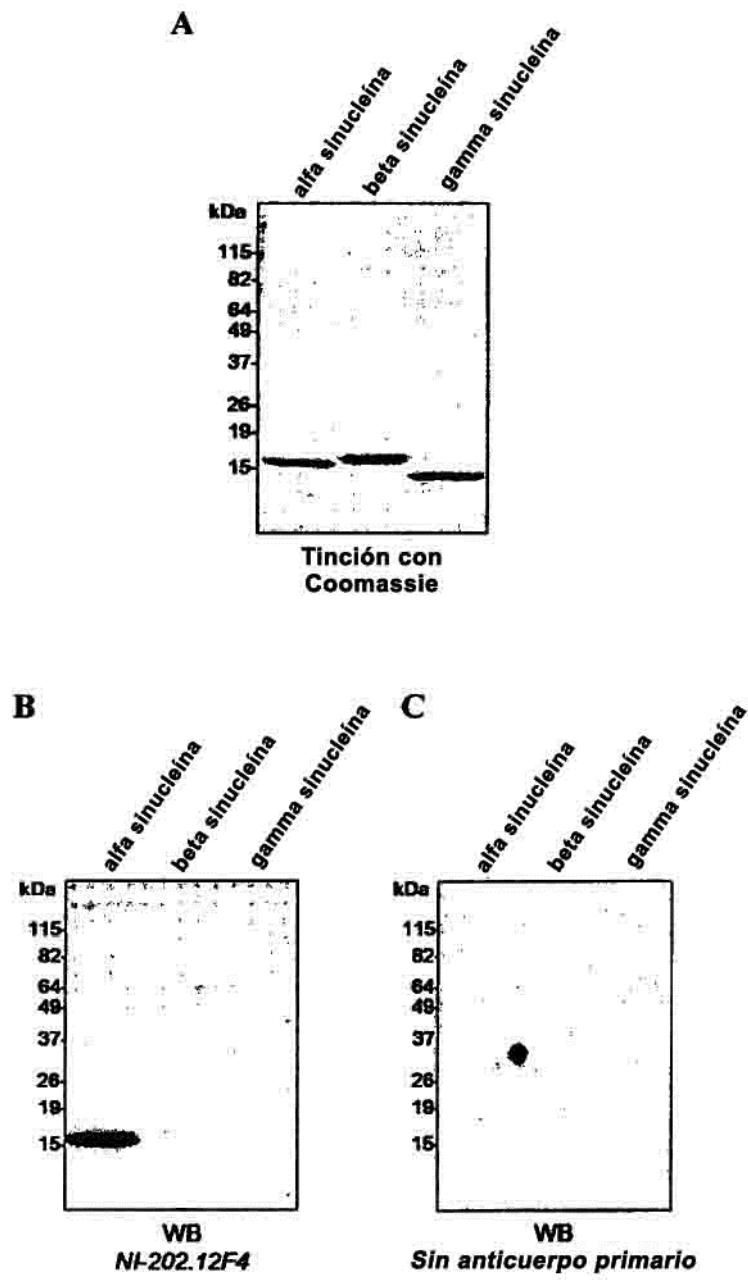


Fig. 4

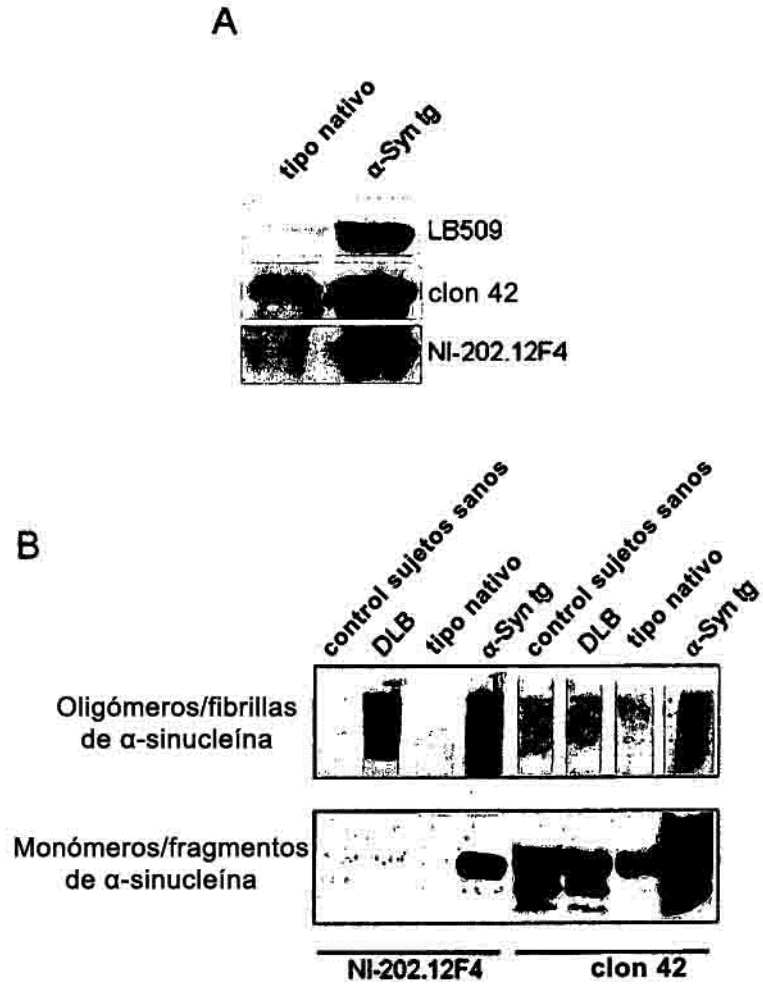


Fig. 5

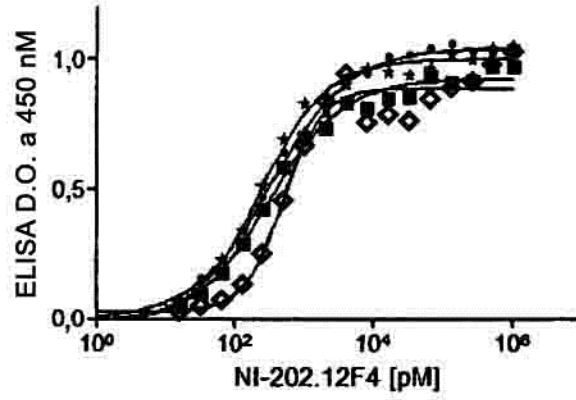


Fig. 6

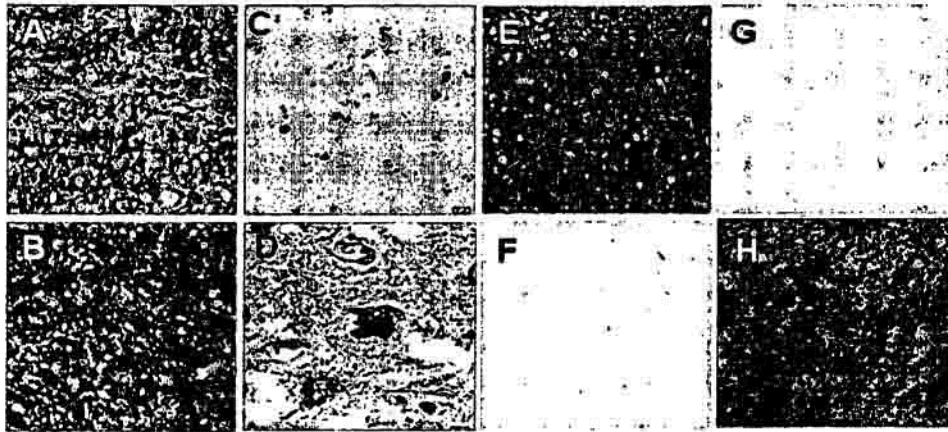


Fig. 7

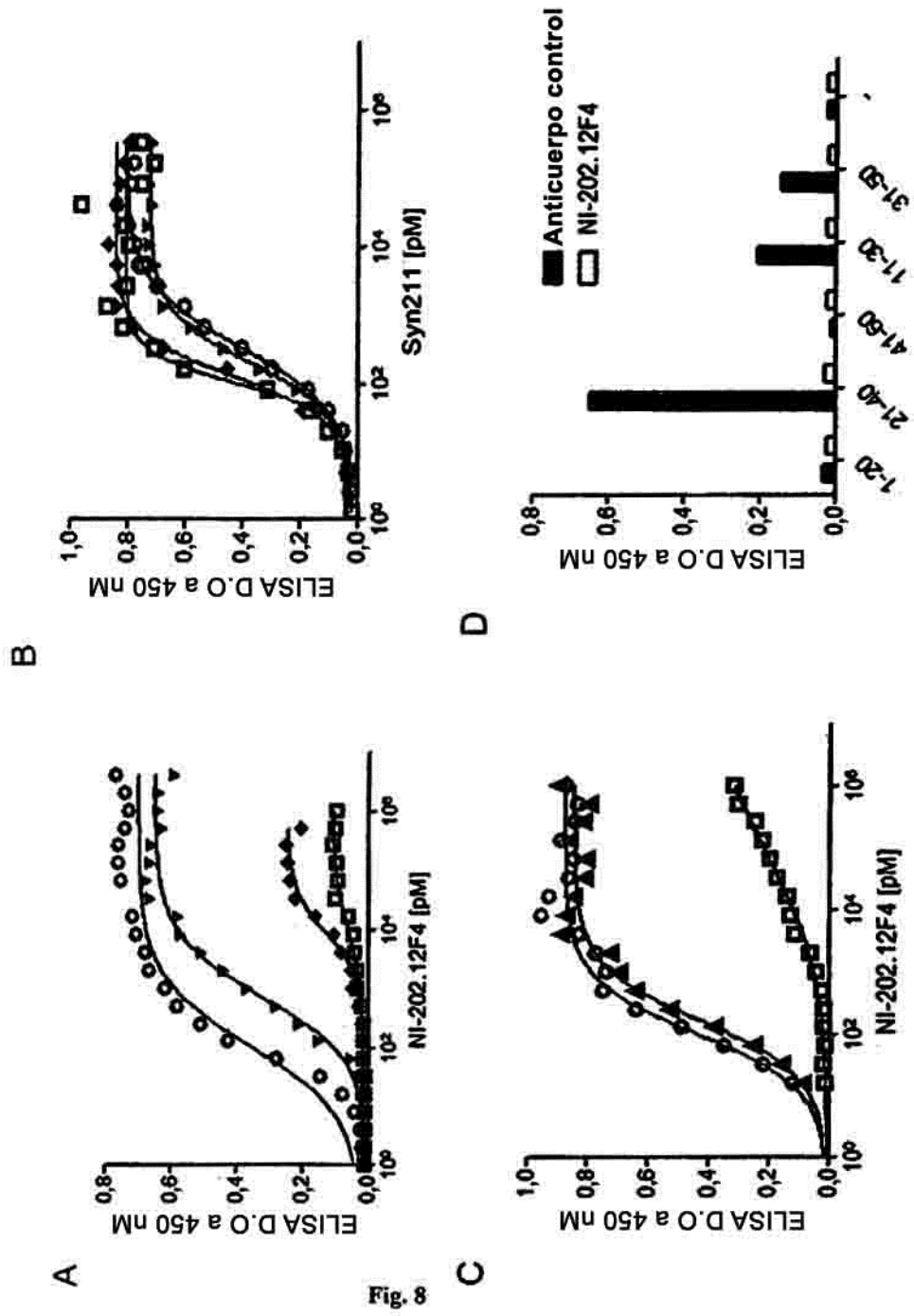


Fig. 8

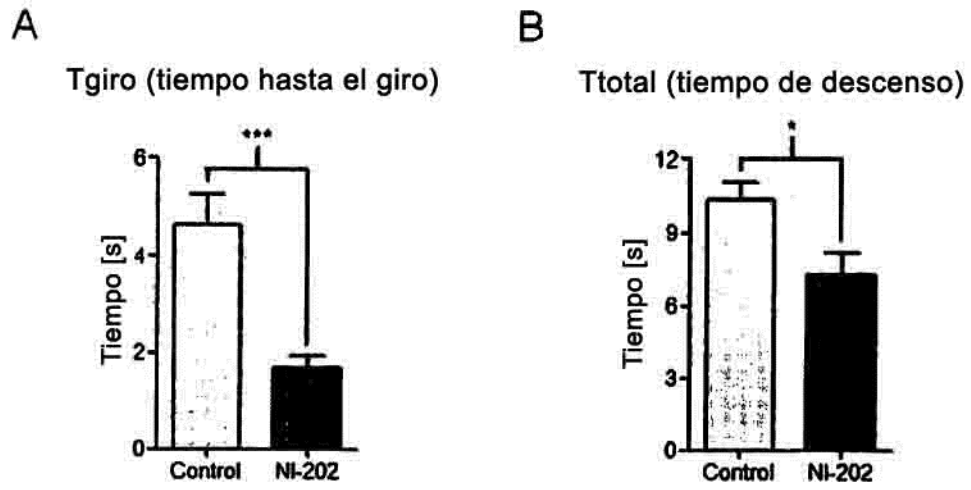


Fig. 9

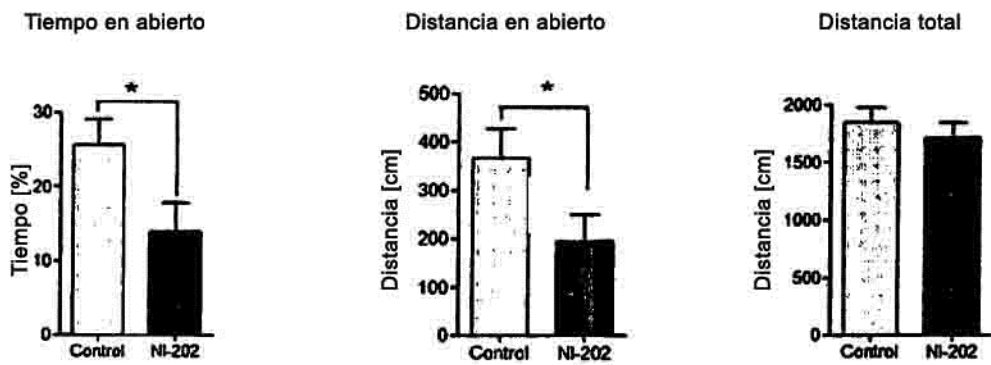


Fig. 10

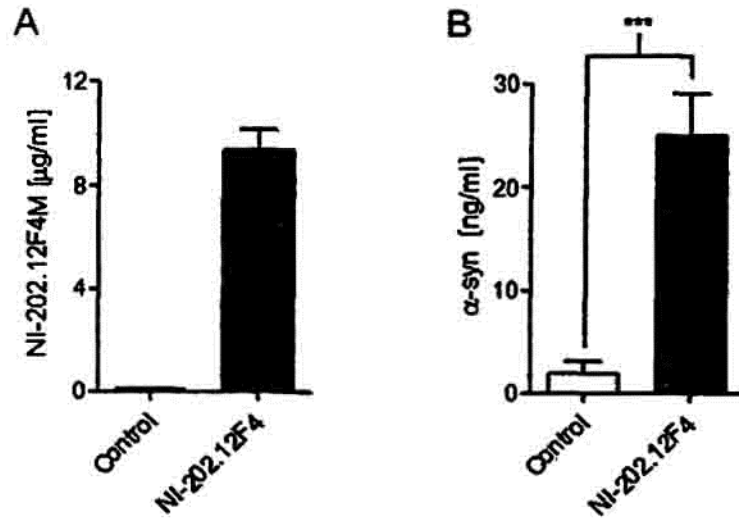


Fig. 11