

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 070**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2003 E 03783083 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 1578253**

54 Título: **Prevención y tratamiento de una enfermedad sinucleinopática**

30 Prioridad:

01.11.2002 US 423012 P

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

22.10.2015

73 Titular/es:

**PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (50.0%)
25-28 North Wall Quay
Dublin 1, IE y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHENK, DALE B. y
MASLIAH, ELIEZER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 549 070 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

Prevención y tratamiento de una enfermedad sinucleinopática

Antecedentes de la invención

- 5 La patología cerebral por alfa-sinucleína (alfaSN) es una característica llamativa de varias enfermedades neurodegenerativas, que incluyen la enfermedad de Parkinson (PD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), atrofia de múltiples sistemas (MSA), y neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro de tipo 1 (NBIA-1). Son comunes a todas estas enfermedades, denominadas sinucleinopatías, las inclusiones proteicas insolubles en las neuronas y en la neuroglia que están compuestas principalmente de alfaSN.
- 10 Los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy son inclusiones intraneuronales que están compuestas principalmente de alfaSN. Los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy son las marcas distintivas neuropatológicas de la enfermedad de Parkinson (PD). PD y otras enfermedades sinucleinopáticas se han denominado colectivamente enfermedad con cuerpos de Lewy (LBD). LBD se caracteriza por la degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deterioro cognitivo, y formación de cuerpos de Lewy (LBs). (McKeith *et al.*, *Clinical and*
- 15 *pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the CDLB International Workshop, Neurology (1996) 47:1113-24*). Otras LBDs incluyen la enfermedad con cuerpos de Lewy difusos (DLBD), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), PD y enfermedad de Alzheimer (AD) combinada, y atrofia de múltiples sistemas. La demencia con cuerpos de Lewy (DLB) es un término acuñado para conciliar las diferencias en la terminología de las LBDs.
- 20 Los trastornos con LBs continúan siendo una causa habitual de trastornos del movimiento y deterioro cognitivo en la población anciana (Galasko *et al.*, *Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias. Arch. Neurol.* (1994) 51:888-95). Aunque su incidencia continúa incrementándose, creando un problema grave de salud pública, hasta la fecha estos trastornos no son ni curables ni prevenibles, y la comprensión de las causas y la patogénesis de PD es crucial para el desarrollo de tratamientos nuevos (Tanner *et al.*, *Epidemiology of*
- 25 *Parkinson's disease and akinetic syndromes, Curr. Opin. Neurol.* (2000) 13:427-30). La causa de PD es controvertida, y se ha propuesto que múltiples factores desempeñan un papel, que incluyen diversas neurotoxinas y factores de susceptibilidad genética.
- En los últimos años, han surgido nuevas esperanzas para la comprensión de la patogénesis de PD. De manera específica, varios estudios han demostrado que la proteína sináptica alfa-SN desempeña un papel clave en la patogénesis de PD debido a que: (1) esta proteína se acumula en LBs (Spillantini *et al.*, *Nature* (1997) 388:839-40; Takeda *et al.*, *AM. J. Pathol.* (1998) 152:367-72; Wakabayashi *et al.*, *Neurosci. Lett.* (1997) 239:45-8), (2) las mutaciones en el gen de alfa-SN co-segregan con formas familiares poco frecuentes de parkinsonismo (Kruger *et al.*, *Nature Gen.* (1998) 18:106-8; Polymeropoulos MH, *et al.*, *Science* (1997) 276:2045-7) y, (3) su sobreexpresión en ratones transgénicos (Masliah *et al.*, *Science* (2000) 287:1265-9) y *Drosophila* (Feany *et al.*, *Nature* (2000) 404:394-8) imita varios aspectos patológicos de PD. Así, el hecho de que la acumulación de alfa-SN en el cerebro esté asociada a alteraciones morfológicas y neurológicas similares en especies tan diversas como seres humanos, ratones y moscas sugiere que esta molécula contribuye al desarrollo de PD.
- 30 Un fragmento de alfa-SN, que previamente se determinó que era un constituyente de las placas amiloides de AD, se denominó componente no amiloide-beta (no A β) del amiloide de AD (NAC) (Iwai A., *Biochim. Biophys. Acta* (2000) 1502:95-109); Masliah *et al.*, *AM. J. Pathol* (1996) 148:201-10; Ueda *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:11282-6). Aunque no se conoce la función exacta de NAC, puede desempeñar un papel crucial en los sucesos sinápticos, tales como la neuroplasticidad durante el desarrollo, y el aprendizaje y la degeneración de las terminaciones nerviosas en condiciones patológicas en LBD, AD, y otros trastornos (Hasimoto *et al.*, *Alpha-Synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease, Brain Pathol* (1999) 9:707-20; Masliah, *et al.*, (2000).
- 45 AD, PD, y la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) son los trastornos neurodegenerativos hallados más habitualmente en ancianos. Aunque su incidencia continúa incrementándose, lo que está creando un problema grave de salud pública, hasta la fecha estos trastornos no son ni curables ni prevenibles. Los estudios epidemiológicos recientes han demostrado una estrecha relación clínica entre AD y PD, ya que alrededor de un 30% de los pacientes de Alzheimer también tienen PD. En comparación con el resto de la población anciana, los pacientes de AD son, así,
- 50 más propensos a desarrollar una PD concomitante. Además, los pacientes de PD que llegan a tener demencia normalmente han desarrollado AD clásica. Aunque cada enfermedad neurodegenerativa parece tener una predilección por regiones cerebrales y poblaciones celulares específicas, lo que da como resultado diferentes características patológicas, PD, AD, DLB y LBD también comparten marcas distintivas patológicas comunes. Los pacientes con AD familiar, síndrome de Down, o AD esporádica desarrollan LBs en el cuerpo amigdalino, los cuales son las marcas distintivas neuropatológicas clásicas de PD. Además, cada enfermedad está asociada a la degeneración de neuronas, conexiones sinápticas interneuronales y finalmente a la muerte celular, la reducción de neurotransmisores, y la acumulación anormal de proteínas mal plegadas, cuyos precursores participan en la función normal del sistema nervioso central. Los estudios bioquímicos han confirmado la asociación entre AD, PD y DLB.
- 55

Las placas neuríticas, que son la marca distintiva patológica clásica de AD, contienen péptido beta-amiloide (A β) y péptido del componente no beta-amiloide (NAC). A β procede de una proteína precursora mayor denominada proteína precursora amiloide (APP). NAC procede de una proteína precursora mayor denominada componente no beta-amiloide de APP, actualmente denominada más habitualmente alfa-SN. NAC comprende los residuos de aminoácidos 60-87 ó 61-95 de alfa-SN. Tanto A β como NAC se identificaron primero en las placas amiloides como fragmentos proteolíticos de sus respectivas proteínas de longitud completa, para las cuales se identificaron y se clonaron los cADNs de longitud completa.

Alfa-SN es parte de una gran familia de proteínas que incluyen beta- y gamma-sinucleína y sinoretina. Alfa-SN se expresa en el estado normal asociado con las sinapsis, y se cree que desempeña un papel en la neuroplasticidad, el aprendizaje y la memoria. Se han identificado mutaciones en la alfa-SN humana (h) que aumentan la agregación de alfa-SN (Ala30Pro y Ala53Thr), y están asociadas a formas poco frecuentes de formas autosómicas dominantes de PD. Se desconoce el mecanismo mediante el cual estas mutaciones incrementan la propensión de la alfa-SN a agregarse.

A pesar del hecho de que se pueden hallar varias mutaciones en APP y alfa-SN en la población, la mayoría de los casos de AD y PD son esporádicos. Las formas esporádicas más frecuentes de estas enfermedades están asociadas a una acumulación anormal de A β y alfa-SN, respectivamente. Sin embargo, se desconocen las razones de la acumulación excesiva de estas proteínas. A β se secreta en las neuronas y se acumula en las placas amiloides extracelulares. Además, se puede detectar A β dentro de las neuronas. Alfa-SN se acumula en las inclusiones intraneuronales denominadas LBs. Aunque las dos proteínas se hallan en general juntas en las placas de AD neuríticas extracelulares, también se hallan ocasionalmente juntas en inclusiones intracelulares.

No están claros los mecanismos mediante los cuales la acumulación de alfa-SN conduce a la neurodegeneración y a los síntomas característicos de PD. Sin embargo, la identificación del papel de los factores que estimulan y/o bloquean la agregación de alfa-SN es crucial para entender la patogénesis de LBD y el desarrollo de nuevos tratamientos para sus trastornos asociados. La investigación para identificar los tratamientos se ha dirigido a la búsqueda de compuestos que reducen la agregación de alfa-SN (Hashimoto, *et al.*) o a ensayar factores de crecimiento que estimularán la regeneración y/o la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, que son las células principalmente afectadas (Djaldetti *et al.*, *New therapies for Parkinson's disease*, *J. Neurol* (2001) 248:357-62; Kirik *et al.*, *Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system*, *J. Neurosci* (2000) 20:4686-4700). Estudios recientes en un modelo de ratón transgénico de AD han demostrado que los anticuerpos contra A β 1-42 facilitan y estimulan la eliminación de amiloide del cerebro, mejoran la patología similar a AD y dan como resultado la mejora del rendimiento cognitivo (Schenk *et al.*, *Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in PDAPP mouse*, *Nature* (1999) 408:173-177; Morgan *et al.*, *A-beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease*, *Nature* (2000) 408:982-985; Janus *et al.*, *A-beta peptide immunization reduces behavioral impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease*, *Nature* (2000) 408:979-82). El documento WO-A-00/72876 describe composiciones farmacéuticas y métodos para prevenir o tratar varias enfermedades amiloides. Las composiciones farmacéuticas incluyen cantidades inmunológicamente reactivas de los componentes de las fibrillas amiloides. En contraste con las placas amiloides extracelulares halladas en los cerebros de pacientes de Alzheimer, los cuerpos de Lewy son intracelulares, y los anticuerpos en general no entran en la célula. Cao *et al.* (*Neuroscience*, resumen de 2002, *Development of an alpha synuclein recombinant protein as a potential vaccine candidate against Parkinson's Disease*, 2002 Neuroscience Meeting, Orlando, FL, póster 594, <http://www.sfn.org/Annual-Meeting/Past-and-Future-Annual-Meetings/Abstract-Archive/Abstract-Archive-Detail?AbsYear=2002&AbsID=8974>) informa sobre un intento de desarrollar una proteína recombinante de alfa sinucleína como un candidato de vacuna potencial contra la enfermedad de Parkinson, pero apunta a la vacunación mediante vacunas basadas en plásmidos de ADN.

Sorprendentemente, dada la naturaleza intracelular de los LBs en el tejido cerebral, los inventores han tenido éxito en la reducción del número de inclusiones en ratones transgénicos inmunizados con sinucleína. La presente descripción se dirige entre otros al tratamiento de PD y otras enfermedades asociadas a LBs mediante la administración de sinucleína, fragmentos de sinucleína, antígenos que imitan la sinucleína o fragmentos de los mismos, o anticuerpos hacia ciertos epítomos de sinucleína a un paciente en condiciones que generan una respuesta inmunitaria beneficiosa en el paciente. Los inventores también han tenido éxito sorprendentemente en la reducción del número de inclusiones en ratones transgénicos inmunizados con A β . La presente descripción se dirige entre otros al tratamiento de PD y otras enfermedades asociadas a LBs mediante la administración de A β , fragmentos de A β , antígenos que imitan A β o fragmentos de los mismos, o anticuerpos hacia ciertos epítomos de A β a un paciente en condiciones que generan una respuesta inmunitaria beneficiosa en el paciente. La descripción satisface así una antigua necesidad de regímenes terapéuticos para prevenir o mejorar la neuropatología y, en ciertos pacientes, el deterioro cognitivo asociado a PD y otras enfermedades asociadas a los LBs.

Breve resumen de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para el uso en métodos para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro, en la que la enfermedad

es la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad con cuerpos de Lewy difusos, disautonomía pura, disfagia con cuerpos de Lewy, enfermedad con cuerpos de Lewy incidentales, enfermedad con cuerpos de Lewy hereditaria o atrofia de múltiples sistemas. Tales métodos implican inducir una respuesta inmunógena contra alfa-SN. Tal inducción se puede conseguir mediante la administración activa de alfa-sinucleína o un fragmento inmunógeno de la misma, o pasiva mediante la administración de un anticuerpo hacia alfa-sinucleína o un fragmento inmunógeno de la misma. En ciertos métodos, el paciente está asintomático. En ciertos métodos, el paciente tiene la enfermedad y está asintomático. En ciertos métodos el paciente tiene un factor de riesgo para la enfermedad y está asintomático. En ciertos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En ciertos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson, y la administración del agente mejora las características motoras del paciente. En ciertos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson, y la administración del agente previene el deterioro de las características motoras del paciente. En ciertos métodos, el paciente no tiene la enfermedad de Alzheimer.

Para el tratamiento de pacientes que padecen cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro, un régimen de tratamiento implica administrar una dosis de alfa-SN o un fragmento activo de la misma al paciente para inducir la respuesta inmunitaria. En ciertos métodos, la alfa-SN o un fragmento activo de la misma se administra en dosis múltiples a lo largo de un periodo de al menos seis meses. La alfa-SN o un fragmento activo de la misma se puede administrar, por ejemplo, de manera periférica, intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosa. En ciertos métodos, la alfa-SN o un fragmento activo de la misma se administra con un adyuvante que aumenta la respuesta inmunitaria a la alfa-SN o a un fragmento activo de la misma. En ciertos métodos, la respuesta inmunógena comprende anticuerpos hacia alfa-SN o un fragmento activo de la misma.

En ciertos métodos, el agente es los aminoácidos 35-65 de alfa-SN. En ciertos métodos, el agente comprende los aminoácidos 130-140 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos en total. En ciertos métodos, los aminoácidos C-terminales del agente son el aminoácido C-terminal de alfa-SN. En algunos de los métodos anteriores, la alfa-SN o el fragmento activo se une a una molécula portadora para formar un conjugado. En algunos de los métodos anteriores, la alfa-SN o el fragmento activo se une a un portador en el extremo N-terminal de la alfa-SN o del fragmento activo.

Para el tratamiento de pacientes que padecen cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro, un régimen de tratamiento implica administrar una dosis de un anticuerpo hacia alfa-SN o un fragmento activo de la misma al paciente para inducir la respuesta inmunitaria. El anticuerpo usado puede ser humano, humanizado, quimérico, o policlonal, y puede ser monoclonal o policlonal. En ciertos métodos, el isotipo del anticuerpo es una IgG1 humana. En ciertos métodos, el anticuerpo se prepara a partir de un ser humano inmunizado con el péptido alfa-SN, y el ser humano puede ser el paciente a tratar con el anticuerpo. En ciertos métodos, el anticuerpo se une a la superficie externa de las neuronas que tienen cuerpos de Lewy, por lo que se disipan los cuerpos de Lewy. En ciertos métodos, el anticuerpo se interioriza en las neuronas que tienen cuerpos de Lewy, por lo que se disipan los cuerpos de Lewy.

En ciertos métodos, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico en forma de una composición farmacéutica. En ciertos métodos, el anticuerpo se administra a una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg de anticuerpo/kg de peso corporal. En ciertos métodos, el anticuerpo se administra en dosis múltiples a lo largo de un periodo prolongado, por ejemplo, al menos seis meses. En ciertos métodos, los anticuerpos se pueden administrar en forma de una composición de liberación sostenida. El anticuerpo se puede administrar, por ejemplo, de manera periférica, intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosa. En ciertos métodos, se monitoriza el nivel del anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

En ciertos métodos, se administra el anticuerpo administrando al paciente un polinucleótido que codifica al menos una cadena del anticuerpo. El polinucleótido se expresa para producir la cadena del anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el polinucleótido codifica las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, y el polinucleótido se expresa para producir las cadenas pesadas y ligeras en el paciente.

Esta invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo hacia alfa-SN y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el uso en los tratamientos descritos anteriormente.

Esta invención proporciona además composiciones farmacéuticas, para el uso en los tratamientos descritos anteriormente, que comprenden un agente eficaz para inducir una respuesta inmunógena contra un componente de un cuerpo de Lewy en un paciente, tal como se describió anteriormente, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En ciertos compuestos, el agente es alfa-SN o un fragmento activo, por ejemplo, NAC. En ciertos compuestos, el agente es 6CHC-1 o un fragmento activo. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo específico hacia un componente de un cuerpo de Lewy.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos de cribado de un anticuerpo hacia alfa-sinucleína, o el cribado de un fragmento inmunógeno de alfa-sinucleína, en función de la actividad en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada a cuerpos de Lewy como se definió anteriormente. Tales métodos implican poner en contacto un animal transgénico no humano predispuesto a desarrollar una característica de la enfermedad por cuerpos de Lewy con el anticuerpo o fragmento de alfa-sinucleína. Después, se determina si la puesta en contacto afecta al

grado o velocidad de desarrollo de la característica respecto de un control.

Descripción breve de los dibujos

La FIG. 1 muestra la secuencia de aminoácidos de alfa-SN (SEQ ID N°: 1) en alineación con dos secuencias de aminoácidos de NAC, SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 3, respectivamente.

5 La FIG. 2 muestra cortes de cerebro teñidos mediante inmunohistoquímica de ratones no transgénicos (paneles A, E, e I), ratones transgénicos para alfa-SN inmunizados con adyuvante solo (paneles B, F, J), y ratones transgénicos para alfa-SN inmunizados con alfa-SN que desarrollaron títulos bajos (paneles C, G, y K) y títulos elevados (paneles D, H, e I) de anticuerpos hacia alfa-SN. Los cortes se sometieron a tinción con un anticuerpo anti-alfa-sinucleína para detectar los niveles de sinucleína (paneles A-D), un anticuerpo anti-IgG para determinar los niveles de IgG
10 totales presentes en el corte (paneles E-H), y para la proteína ácida fibrilar neuroglial (GFAP), un marcador de células astrogliales.

La FIG. 3 muestra los efectos del anticuerpo policlonal anti-mSIN sobre la agregación de sinucleína en células GT1-7 transfectadas tal como se observa mediante microscopía óptica.

15 La FIG. 4 es una transferencia de Western de los niveles de sinucleína en el citoplasma (C) y las membranas (P) de células α -sin GT1-7 tratadas con sueros preinmunes y con el anticuerpo 67-10 a una concentración de (1:50) durante 48 horas antes del análisis.

La FIG. 5 muestra los resultados de los estudios del efecto de la inmunización con A β 1-42 sobre el depósito de amiloide en los cerebros de ratones no transgénicos, y transgénicos para SIN, APP y SIN/APP. Los niveles de amiloide detectables observados en los ratones APP y SIN/APP se reducen mediante la inmunización con A β 1-42.

20 La FIG. 6 muestra los resultados de los estudios del efecto de la inmunización con A β 1-42 tras la formación de inclusiones de sinucleína en los cerebros de ratones no transgénicos, y transgénicos para SIN, APP y SIN/APP. Las inclusiones de sinucleína detectadas en los ratones SIN y SIN/APP se reducen mediante la inmunización con A β 1-42.

25 La FIG. 7 muestra los mecanismos directos e indirectos mediante los cuales los anticuerpos bloquean la agregación de alfa-SN.

Definiciones

La expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT mediante el uso de las ponderaciones por hueco por defecto, comparten al menos un 65 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 80 o 90 por ciento de
30 identidad de secuencia, más preferiblemente al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia o más (p.ej., 99 por ciento de identidad de secuencia o más). Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones conservativas de aminoácidos.

Para la comparación de secuencias, en general una secuencia actúa como una secuencia de referencia, respecto de la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las
35 secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de las subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula después la identidad de secuencia en porcentaje para la(s) secuencia(s) de ensayo respecto de la secuencia de referencia, basándose en los parámetros designados del programa.

40 La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, p.ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics Software
45 Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase en general Ausubel *et al.*, anteriormente mencionado). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia en porcentaje y la similitud de secuencias es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El programa informático para llevar a cabo análisis BLAST está disponible públicamente a través de la página de Internet del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). En
50 general, se pueden usar los parámetros por defecto del programa para llevar a cabo la comparación de secuencias, aunque también se pueden usar parámetros personalizados. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915 (1989)).

55 Con el fin de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan como sigue: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas

laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de las cadenas): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

Los agentes terapéuticos de la invención en general están sustancialmente puros de contaminantes indeseados. Esto significa que un agente tiene en general una pureza de al menos alrededor del 50% p/p (peso/peso), y además está sustancialmente exento de proteínas y contaminantes que interfieren. A veces, los agentes tienen una pureza de al menos alrededor del 80% p/p y, más preferiblemente, al menos del 90 o alrededor del 95% p/p. Sin embargo, mediante el uso de técnicas convencionales de purificación de proteínas, se pueden obtener péptidos homogéneos de al menos un 99% p/p.

La frase en la que una molécula "se une de manera específica" a un objetivo se refiere a una reacción de unión que es determinativa de la presencia de la molécula en presencia de una población heterogénea de otras moléculas biológicas. Así, en las condiciones designadas de inmunoensayo, una molécula especificada se une preferentemente a un objetivo particular, y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas biológicas presentes en la muestra. La unión específica de un anticuerpo a un objetivo en tales condiciones requiere que el anticuerpo se seleccione por su especificidad hacia el objetivo. Se puede usar una diversidad de formatos de inmunoensayos para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan de manera rutinaria inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, p.ej., Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayos que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica. La unión específica entre dos entidades significa una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M⁻¹, o 10^{10} M⁻¹. Se prefieren las afinidades mayores de 10^8 M⁻¹.

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se usa para incluir los anticuerpos intactos y los fragmentos de unión de los mismos. En general, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que se obtuvieron por la unión específica a un fragmento de antígeno, que incluyen las diferentes cadenas pesadas, cadenas ligeras, Fab, Fab' F(ab')₂, Fabc, y Fv. Los fragmentos se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye una o más cadenas de inmunoglobulina que se conjugan químicamente a, o se expresan como, proteínas de fusión con otras proteínas. El término "anticuerpo" también incluye un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo bifuncional o biespecífico es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una diversidad de métodos, que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, p.ej., Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321, (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹, y APP⁷⁷⁰ se refieren, respectivamente, a los polipéptidos de una longitud de 695, 751, y 770 residuos de aminoácidos codificados por el gen APP humano. Véase Kang *et al.*, *Nature* 325, 773 (1987); Ponte *et al.*, *Nature* 331, 525 (1988); y Kitaguchi *et al.*, *Nature* 331, 530 (1988). Se asignan números a los aminoácidos de la proteína precursora de amiloide (APP) humana según la secuencia de la isoforma APP770. Los términos tales como Aβ₃₉, Aβ₄₀, Aβ₄₁, Aβ₄₂ y Aβ₄₃ se refieren a un péptido Aβ que contiene los residuos de aminoácidos 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 y 1-43.

Un "antígeno" es una entidad a la que se une de manera específica un anticuerpo.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio de un antígeno al que responden las células B y/o T. Los epítipos de células B se pueden formar a partir de aminoácidos contiguos o no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos en general se mantienen tras la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por el plegamiento terciario normalmente se pierden tras tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye en general al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 ó 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p.ej., *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestre la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo. Las células T reconocen epítipos continuos de alrededor de nueve aminoácidos para las células CD8 o alrededor de 13-15 aminoácidos para las células CD4. Las células T que reconocen el epítipo se pueden identificar mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente del antígeno, tal como se determina mediante la incorporación de ³H-timidina por las células T sensibilizadas en respuesta a un epítipo (Burke *et al.*, *J. Inf. Dis.* 170, 1110-19 (1994)), mediante destrucción dependiente del antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges *et al.*, *J. Immunol.* 156, 3901-3910) o mediante secreción de citocinas.

La expresión respuesta "inmunológica" o "inmunitaria" es el desarrollo de una respuesta beneficiosa humoral (mediada por anticuerpos) y/o celular (mediada por células T específicas del antígeno o sus productos de secreción)

5 dirigida contra un péptido amiloide en un paciente receptor. Tal respuesta puede ser una respuesta activa inducida mediante la administración del inmunógeno o una respuesta pasiva inducida mediante la administración del anticuerpo o de células T sensibilizadas. Una respuesta inmunitaria celular se provoca por la presentación de epítopos polipeptídicos en asociación con las moléculas del MHC de Clase I o Clase II para activar las células auxiliares T CD4⁺ específicas del antígeno y/o las células T citotóxicas CD8⁺. La respuesta puede implicar también la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de la microglia, eosinófilos u otros componentes de la inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar mediante ensayos de proliferación (células T CD4⁺) o ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos) (véase Burke, anteriormente mencionado; Tigges, anteriormente mencionado). Las contribuciones relativas de las respuestas humorales y celulares al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno se pueden distinguir aislando por separado los anticuerpos y las células T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Un "agente inmunógeno" o "inmunógeno" es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí mismo tras la administración a un mamífero, opcionalmente junto con un adyuvante.

15 El término "todos D" se refiere a péptidos que tienen $\geq 75\%$, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, y 100% de aminoácidos de configuración D.

La expresión "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido sin complejar con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos a veces se clonan en un vector plasmídico.

20 El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra junto con un antígeno aumenta la respuesta inmunitaria hacia el antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmunitaria hacia el antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunitaria mediante varios mecanismos, que incluyen la incorporación de linfocitos, la estimulación de células B y/o T, y la estimulación de macrófagos.

El término "paciente" incluye los sujetos humanos y otros mamíferos que reciben un tratamiento profiláctico o terapéutico.

25 La competición entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que la inmunoglobulina de ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como alfa-SN. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida, ensayo competitivo de tipo sándwich (véase Stahl *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242-253 (1983)); EIA directo con biotina-avidina en fase sólida (véase Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)); ensayo con marcador directo en fase sólida, ensayo de tipo sándwich con marcador directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA con marcador directo en fase sólida mediante el uso de un marcador de I-125 (véase Morel *et al.*, *Molec. Immunol.* 25(1): 7-15 (1988)); EIA directo con biotina-avidina en fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546-552 (1990)); y RIA con marcador directo (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82 (1990)). En general, tal ensayo implica el uso de un antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que albergan alguno de estos, una inmunoglobulina de ensayo sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Normalmente, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados mediante el ensayo de competición (anticuerpos competitivos) incluyen los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y los anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente lo suficientemente próximo al epítipo al que se une el anticuerpo de referencia para que se dé un impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos un 50 ó 75%.

45 El término "síntoma" o "síntoma clínico" se refiere a una prueba subjetiva de una enfermedad, tal como un modo de andar alterado, tal como lo percibe el paciente. Un "signo" se refiere a una prueba objetiva de una enfermedad tal como lo observa un médico.

50 Las composiciones o métodos "que comprenden" uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos que no se enumeran de manera específica. Por ejemplo, una composición que comprende un péptido alfa-SN abarca tanto un péptido alfa-SN aislado como un péptido alfa-SN como componente de una secuencia polipeptídica mayor.

Descripción detallada de la invención

I. General

55 La descripción proporciona métodos para prevenir o tratar varias enfermedades y afecciones caracterizadas por la presencia de depósitos de péptidos alfa-SN agregados hasta una masa insoluble en el cerebro de un paciente, en forma de cuerpos de Lewy. Tales enfermedades se denominan colectivamente enfermedades con cuerpos de Lewy (LBD), e incluyen la enfermedad de Parkinson (PD). Tales enfermedades se caracterizan por agregados de alfa-SN que tienen una estructura de lámina β y tinción con tioflavina-S y rojo Congo (véase Hasimoto, *Ibid.*). La descripción

proporciona métodos para prevenir o tratar tales enfermedades mediante el uso de un agente que puede generar una respuesta inmunógena hacia alfa-SN. La respuesta inmunógena actúa para prevenir la formación de, o para eliminar, los depósitos de sinucleína dentro de las células del cerebro. Aunque la comprensión del mecanismo no es esencial para la práctica de la invención, la respuesta inmunógena puede inducir la eliminación como resultado de los anticuerpos hacia sinucleína que se interiorizan dentro de las células y/o que interactúan con la membrana de tales células, y de ese modo interfieren con la agregación de sinucleína. En ciertos métodos, la respuesta de eliminación se puede efectuar al menos en parte mediante la fagocitosis mediada por los receptores de Fc. La inmunización con sinucleína puede reducir la acumulación de sinucleína en las sinapsis del cerebro. Aunque la comprensión del mecanismo no es esencial para la práctica de la invención, este resultado se puede explicar porque los anticuerpos hacia sinucleína son captados por las vesículas sinápticas.

Opcionalmente, los agentes que generan una respuesta inmunógena contra alfa-SN se pueden usar en combinación con agentes que generan una respuesta inmunógena hacia A β . La respuesta inmunógena es útil para eliminar los depósitos de A β en los individuos que tienen tales depósitos (p.ej., individuos que tienen tanto la enfermedad de Alzheimer como la de Parkinson); sin embargo, la respuesta inmunógena también tiene actividad en la eliminación de los depósitos de sinucleína. Así, la presente descripción usa tales agentes solos o en combinación con agentes que generan una respuesta inmunógena hacia alfa-SN en individuos con LBD pero que no padecen o corren el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

II. Agentes que generan una respuesta inmunógena contra alfa sinucleína

Una respuesta inmunógena puede ser activa, como cuando se administra un inmunógeno para inducir anticuerpos reactivos con alfa-SN en un paciente, o pasiva, como cuando se administra un anticuerpo que se une él mismo a alfa-SN en un paciente.

1. Agentes que inducen una respuesta inmunitaria activa

Los agentes terapéuticos inducen una respuesta inmunógena dirigida de manera específica a ciertos epítomos del péptido alfa-SN. Los agentes preferidos son el péptido alfa-SN propiamente dicho y los fragmentos del mismo. También se pueden usar variantes de tales fragmentos, análogos y moléculas miméticas del péptido alfa-SN natural que inducen y/o reaccionan de manera cruzada con anticuerpos hacia los epítomos preferidos del péptido alfa-SN.

La alfa sinucleína se identificó en un principio en cerebros humanos como la proteína precursora del componente no β -amiloide (NAC) de las placas de AD. (Ueda *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (23):11282-11286 (1993). Alfa-SN, también denominada precursor del componente no-A β del amiloide de AD (NACP), es un péptido de 140 aminoácidos. Alfa-SN tiene la secuencia de aminoácidos:

```
MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGV
ATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEE
GAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (SEQ ID N°:1)
```

(Ueda *et al.*, *Ibid.*; número de acceso de GenBank: P37840).

El componente no-A β del amiloide de AD (NAC) procede de alfa-SN. NAC, un dominio sumamente hidrófobo de la alfa sinucleína, es un péptido que consiste en al menos 28 residuos de aminoácidos (residuos 60-87) (SEQ ID N°: 3) y opcionalmente 35 residuos de aminoácidos (residuos 61-95) (SEQ ID N°: 2). Véase la Fig. 1. NAC muestra una tendencia a formar una estructura de lámina beta (Iwai, *et al.*, *Biochemistry*, 34:10139-10145). Jensen *et al.* ha informado que NAC tiene la secuencia de aminoácidos:

EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV (SEQ ID N°: 2)

(Jensen *et al.*, *Biochem. J.* 310 (Pt 1): 91-94 (1995); número de acceso de GenBank S56746).

Ueda *et al.* ha informado que NAC tiene la secuencia de aminoácidos:

```
KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (SEQ ID N°: 3)
```

(Ueda *et al.*, *PNAS USA* 90:11282-11286 (1993).

Alfa-SN desagregada, o los fragmentos de la misma, que incluyen NAC, significan unidades peptídicas monoméricas. La alfa-SN desagregada o los fragmentos de la misma en general son solubles, y son capaces de autoagregarse hasta formar oligómeros solubles. Los oligómeros de alfa-SN y los fragmentos de la misma normalmente son solubles, y existen predominantemente en forma de hélices alfa. La alfa-SN monomérica se puede preparar *in vitro* disolviendo péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La disolución resultante se centrifuga para eliminar las partículas insolubles. La alfa-SN agregada o los fragmentos de la misma, que incluyen NAC, significan oligómeros de alfa-SN o fragmentos de la misma que se han asociado hasta estructuras de láminas beta insolubles. La alfa-SN agregada o los fragmentos de la misma, que incluyen NAC, significan también polímeros fibrilares. Las fibrillas normalmente son insolubles. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN soluble o a los fragmentos de la misma o a alfa-SN agregada o a los fragmentos de la misma. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN tanto

soluble como agregada, o a los fragmentos de la misma.

Alfa-SN, el componente principal de la característica de los cuerpos de Lewy de PD, y los fragmentos epitópicos de la misma, tales como, por ejemplo, NAC, o fragmentos distintos de NAC, se pueden usar para inducir una respuesta inmunógena. Preferiblemente, tales fragmentos comprenden cuatro o más aminoácidos de alfa-SN o análogos de los mismos. Algunos fragmentos activos incluyen un epítipo en o cerca del extremo C-terminal de alfa-SN (p.ej., dentro de los aminoácidos 70-140, 100-140, 120-140, 130-140, o 135-140). En algunos fragmentos activos, el residuo C-terminal del epítipo es el residuo C-terminal de alfa-SN. También se pueden usar otros componentes de los cuerpos de Lewy, por ejemplo, sinfilina-1, Parkina, ubiquitina, neurofilamento, beta-cristalina, y los fragmentos epitópicos de los mismos, para inducir una respuesta inmunógena.

A menos que se indique de otra manera, la referencia a alfa-SN incluye las secuencias de aminoácidos humanas naturales indicadas anteriormente, así como los análogos, que incluyen las variantes alélicas, de especie e inducidas, las formas de longitud completa y los fragmentos inmunógenos de las mismas. Los análogos difieren en general de los péptidos naturales en una, dos o varias posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservativas. Los análogos exhiben en general al menos un 80 ó 90% de identidad de secuencia con los péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de los aminoácidos N- o C-terminales en una, dos o varias posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido glutámico natural de la posición 139 de alfa-SN se puede sustituir con ácido isoaspártico. Los ejemplos de aminoácidos no naturales son los aminoácidos D, alfa, alfa-disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxi prolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetil-lisina, épsilon-N-acetil-lisina, O-fosfoferina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilisina, omega-N-metilarginina, β -alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-amino butírico, homoserina, citrulina, y ácido isoaspártico. Los agentes terapéuticos también incluyen los análogos de los fragmentos de alfa-SN. Algunos agentes terapéuticos de la invención son péptidos todos-D, p.ej., alfa-SN todos-D o NAC todos-D, y los análogos peptídicos todos-D. Los fragmentos y análogos se pueden cribar en función de la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos en comparación con los controles sin tratar o placebos como se describe más adelante.

Alfa-SN, sus fragmentos, y los análogos se pueden sintetizar mediante síntesis peptídica en fase sólida o expresión recombinante, o se pueden obtener de fuentes naturales. Hay disponibles comercialmente sintetizadores de péptidos automáticos de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede darse en bacterias, tales como *E. coli*, levadura, células de insecto o células de mamífero. Los procedimientos para la expresión recombinante se describen en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H.P. Press, NY 2ª ed., 1989). Algunas formas del péptido alfa-SN también están disponibles comercialmente, por ejemplo, de BACHEM y American Peptide Company, Inc.

Los agentes terapéuticos también incluyen polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un fragmento activo del péptido alfa-SN, junto con otros aminoácidos. Por ejemplo, los agentes preferidos incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de alfa-SN fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga que induce una respuesta de células T auxiliares contra la secuencia de aminoácidos heteróloga, y de ese modo una respuesta de células B contra el segmento de alfa-SN. Tales polipéptidos se pueden cribar en función de la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales en comparación con los controles sin tratar o placebos como se describe más adelante. El péptido alfa-SN, análogo, fragmento activo u otro polipéptido se puede administrar en forma asociada o multimérica o en forma disociada. Los agentes terapéuticos también incluyen los multímeros de los agentes inmunógenos monoméricos. Los agentes terapéuticos de la invención pueden incluir secuencias de polilisina.

En una variación adicional, un péptido inmunógeno, tal como un fragmento de alfa-SN, se puede presentar mediante un virus o bacteria como parte de una composición inmunógena. Se incorpora un ácido nucleico que codifica el péptido inmunógeno en un genoma o episoma del virus o bacteria. Opcionalmente, el ácido nucleico se incorpora de tal manera que el péptido inmunógeno se expresa como una proteína secretada o como una proteína de fusión con una proteína de la superficie externa de un virus, o una proteína transmembrana de una bacteria, de forma que se expresa el péptido. Los virus o bacterias usadas en tales métodos deberían ser apatógenos o atenuados. Los virus adecuados incluyen adenovirus, HSV, virus de la encefalitis equina venezolana y otros alfa virus, virus de la estomatitis vesicular, y otros rhabdovirus, vaccinia y viruela aviar. Las bacterias adecuadas incluyen *Salmonella* y *Shigella*. La fusión de un péptido inmunógeno a HBsAg de HBV es especialmente adecuada.

Los agentes terapéuticos también incluyen péptidos y otros compuestos que no tienen necesariamente una similitud de secuencias de aminoácidos significativa con alfa-SN, pero sin embargo sirven como moléculas miméticas de alfa-SN, e inducen una respuesta inmunitaria similar. Por ejemplo, cualquier péptido y proteína que forme láminas beta se puede cribar en función de su idoneidad. También se pueden usar anticuerpos anti-idiotípicos contra anticuerpos monoclonales hacia alfa-SN u otros componentes de los cuerpos de Lewy. Tales anticuerpos anti-Id imitan el antígeno y generan una respuesta inmunitaria hacia él (véase *Essential Immunology*, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA, 6ª ed., pág. 181). Los agentes distintos de alfa-SN deberían inducir una respuesta inmunógena contra uno o más de los segmentos preferidos de alfa-SN enumerados anteriormente (p.ej., NAC). Preferiblemente, tales agentes inducen una respuesta inmunógena que se dirige de manera específica hacia uno de estos segmentos sin dirigirse hacia otros segmentos de alfa-SN.

También se pueden cribar bibliotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos en función de su idoneidad. Se pueden producir bibliotecas combinatorias para muchos tipos de compuestos que se pueden sintetizar por etapas. Tales compuestos incluyen polipéptidos, moléculas miméticas de giros beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas N-sustituidas oligoméricas y oligocarbamatos. Se pueden construir grandes bibliotecas combinatorias de los compuestos mediante el método de bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) descrito en Affymax, documento WO 95/12608, Affymax, documento WO 93/06121, Universidad de Columbia, documento WO 94/08051, Pharmacoepia, documento WO 95/35503 y Scripps, documento WO 95/30642. También se pueden generar bibliotecas de péptidos mediante métodos de expresión en fagos. Véase, p.ej., Devlin, documento WO 91/18980.

Las bibliotecas combinatorias y otros compuestos se criban inicialmente en función de su idoneidad determinando su capacidad de unirse a anticuerpos o linfocitos (B o T) que se sabe que son específicos de alfa-SN u otros componentes de los cuerpos de Lewy. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo cribados iniciales con cualquier suero policlonal o anticuerpo monoclonal hacia alfa-SN o un fragmento de la misma. Los compuestos se pueden cribar después en función de la unión a un epítipo específico de alfa-SN (p.ej., un epítipo de NAC). Los compuestos se pueden ensayar mediante los mismos procedimientos descritos para cartografiar las especificidades por los epítopos de los anticuerpos. Los compuestos identificados mediante tales cribados se analizan después adicionalmente por su capacidad de inducir anticuerpos o linfocitos reactivos hacia alfa-SN o los fragmentos de la misma. Por ejemplo, se pueden ensayar múltiples diluciones de sueros en placas de microtitulación que se han prerrevestido con alfa-SN o un fragmento de la misma, y se puede llevar a cabo un ELISA estándar para ensayar los anticuerpos reactivos hacia alfa-SN o el fragmento. Después se pueden ensayar los compuestos en función de su eficacia profiláctica y terapéutica en animales transgénicos predispuestos a una enfermedad asociada a la presencia de cuerpos de Lewy, como se describe en los Ejemplos. Tales animales incluyen, por ejemplo, ratones transgénicos que sobreexpresan alfa-SN o un mutante de la misma (p.ej., sustitución de alanina a treonina en la posición 53) como se describe, p.ej., en el documento WO 98/59050, Masliah, *et al.*, *Science* 287: 1265-1269 (2000), y van der Putter, *et al.*, *J. Neuroscience* 20: 6025-6029 (2000), o los ratones transgénicos que también sobreexpresan APP o un mutante de la misma. Se prefieren en particular los ratones transgénicos para sinucleína que albergan una mutación en 717 de APP descrita por Games *et al.*, *Nature* 373, 523 (1995) y los ratones que albergan una mutación sueca 670/671 de APP tal como describió McConlogue *et al.*, documento US 5.612.486 y Hsiao *et al.*, *Science* 274, 99 (1996); Staufenbiel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Borchelt *et al.*, *Neuron* 19, 939-945 (1997)). Se proporcionan ejemplos de tales animales transgénicos para sinucleína/APP en el documento WO 01/60794. Los modelos animales adicionales de PD incluyen los modelos animales de 6-hidroxidopamina, rotenona, y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (M. Flint Beal, *Nature Reviews Neuroscience* 2:325-334 (2001)). Se puede usar la misma aproximación de cribado con otros análogos potenciales de alfa-SN y péptidos más largos que incluyen fragmentos de alfa-SN, descritos anteriormente, y otros componentes de los cuerpos de Lewy y análogos o fragmentos de los mismos.

2. Agentes para la respuesta inmunitaria pasiva

Los agentes terapéuticos de la invención también incluyen anticuerpos que se unen de manera específica a alfa-SN. Se conocen los anticuerpos inmunorreactivos hacia alfa-SN (véase, por ejemplo, Arima, *et al.*, *Brain Res.* 808: 93-100 (1998); Crowther *et al.*, *Neuroscience Lett.* 292: 128-130 (2000); Spillantini, *et al.* *Nature* 388: 839-840 (1997). Tales anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Algunos de tales anticuerpos se unen de manera específica a agregados insolubles de alfa-SN sin unirse de manera específica a la forma monomérica soluble. Algunos se unen de manera específica a la forma monomérica soluble sin unirse a la forma agregada insoluble. Algunos se unen tanto a las formas agregadas como a las monoméricas solubles. Algunos de tales anticuerpos se unen a la forma corta natural de alfa-SN (p.ej., NAC) sin unirse a la alfa-SN de longitud completa natural. Algunos anticuerpos se unen a una forma larga sin unirse a una forma corta. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN sin unirse a otros componentes de los LBs. Los anticuerpos usados en los métodos terapéuticos tienen normalmente una región constante intacta o al menos suficiente de la región constante para interaccionar con un receptor de Fc. Se prefiere el isotipo humano IgG1 debido a que tiene la afinidad más alta de los isotipos humanos por el receptor FcRI de las células fagocíticas. También se pueden usar fragmentos Fab biespecíficos, en los que un brazo del anticuerpo tiene especificidad hacia alfa-SN, y el otro hacia un receptor de Fc. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN con una afinidad de unión mayor o igual a alrededor de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} M^{-1} .

Los sueros policlonales contienen en general poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen a varios epítopos a lo largo de alfa-SN. Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos de un segmento particular de alfa-SN, tal como NAC. Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo específico de alfa-SN, que puede ser un epítipo conformacional o no conformacional. La eficacia profiláctica y terapéutica de los anticuerpos se puede ensayar mediante el uso de los procedimientos con modelos de animales transgénicos descritos en los Ejemplos. Los anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítipo de NAC. En ciertos métodos, se usan múltiples anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión hacia diferentes epítopos. Tales anticuerpos se pueden administrar de manera secuencial o simultánea. También se pueden usar anticuerpos hacia componentes de los cuerpos de Lewy distintos de alfa-SN. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden dirigir al neurofilamento, ubiquitina, o sinfilina. Los agentes terapéuticos también incluyen anticuerpos generados contra análogos de alfa-SN y los fragmentos de los mismos. Algunos agentes terapéuticos de la invención son péptidos todos-D, p.ej., alfa-SN todos-D o NAC todos-D.

5 Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítipo dentro de residuos especificados, tal como alfa-SN 1-5, por ejemplo, lo que se quiere decir es que el anticuerpo se une de manera específica a un polipéptido que contiene los residuos especificados (es decir, alfa-SN 1-5 en este ejemplo). Tal anticuerpo no entra en contacto necesariamente con cada residuo dentro de alfa-SN 1-5. Tampoco afecta necesariamente de manera significativa a la afinidad de unión cada sustitución o delección de un único aminoácido dentro de alfa-SN 1-5. La especificidad por el epítipo de un anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, formando una biblioteca de expresión en fagos en la que diferentes miembros expresen diferentes subsecuencias de alfa-SN. La biblioteca de expresión en fagos se selecciona después en función de los miembros que se unen de manera específica a un anticuerpo que se está ensayando. Se aísla una familia de secuencias. En general, tal familia contiene una secuencia central común, y longitudes variables de secuencias flanqueantes en los diferentes miembros. La secuencia central más corta que muestra una unión específica al anticuerpo define el epítipo unido por el anticuerpo. También se pueden ensayar los anticuerpos por su especificidad hacia el epítipo en un ensayo competitivo con un anticuerpo cuya especificidad hacia el epítipo ya se ha determinado.

15 Algunos anticuerpos de la invención se unen de manera específica a un epítipo de NAC. Algunos anticuerpos se unen de manera específica a un epítipo de una forma glicosilada de 22 kilodaltons de sinucleína, p.ej., P22-sinucleína (H. Shimura *et al.*, *Science*, julio de 2001 13:293(5528):224-5). Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en o cerca del extremo C-terminal de alfa-SN (p.ej., en los aminoácidos 70-140, 100-140, 120-140, 130-140 o 135-140). Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en el que el residuo C-terminal del epítipo es el residuo C-terminal de alfa-SN. En algunos métodos, el anticuerpo se une de manera específica a NAC sin unirse a alfa-SN de longitud completa.

20 Los anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen de manera específica a un segmento preferido de alfa-SN sin unirse a otras regiones de alfa-SN tienen varias ventajas respecto de los anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o los sueros policlonales hacia alfa-SN intacta. En primer lugar, para dosis de igual masa, las dosis de anticuerpos que se unen de manera específica a segmentos preferidos contienen una dosis molar superior de anticuerpos eficaces para la eliminación de las placas amiloides. En segundo lugar, los anticuerpos que se unen de manera específica a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de eliminación contra los LBs sin inducir una respuesta de eliminación contra la alfa-SN intacta, por lo que se reduce la posibilidad de efectos secundarios.

i. Características generales de las inmunoglobulinas

30 Se sabe que la unidad estructural básica de los anticuerpos comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, y cada par tiene una cadena "ligera" (alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (alrededor de 50-70 kDa). La porción aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. La porción carboxiterminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

35 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. En las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de alrededor de 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de alrededor de 10 o más aminoácidos. (Véase en general, *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y., 1989, Cap. 7).

40 Las regiones variables de cada par de cadenas ligeras/pesadas forman el sitio de unión del anticuerpo. Así, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones estructurales (FR) relativamente conservadas unidas mediante tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada par se alinean mediante las regiones estructurales, lo que permite la unión a un epítipo específico. De N-terminal a C-terminal, las cadenas ligeras y pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de los aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); o Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989).

50 ii. Producción de anticuerpos no humanos

Los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen la misma o similar especificidad y afinidad de unión que un anticuerpo de ratón o de otro animal no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de la cadena ligera y pesada se han construido, en general, mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulinas que pertenecen a especies diferentes. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden unir a segmentos constantes (C) humanos, tales como IgG1 e IgG4. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. En ciertos métodos, el isotipo del anticuerpo es el IgG1 humano. También se pueden usar anticuerpos IgM en ciertos métodos. Un anticuerpo quimérico típico es, así, una proteína híbrida que consiste en el dominio V o de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón, y el dominio C o efector de un anticuerpo

humano.

Los anticuerpos humanizados tienen residuos estructurales de la región variable sustancialmente de un anticuerpo humano (denominado anticuerpo aceptor) y regiones determinantes de la complementariedad sustancialmente de un anticuerpo de ratón, (denominado inmunoglobulina donante). Véase, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989), los documentos WO 90/07861, US 5.693.762, US 5.693.761, US 5.585.089, US 5.530.101, y Winter, US 5.225.539. La(s) región(es) constante(s), si está(n) presente(s), también son sustancialmente o completamente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos se eligen normalmente de anticuerpos humanos cuyas secuencias estructurales exhiben un grado elevado de identidad de secuencia con los dominios de la región variable murina de la que proceden las CDRs. Los residuos estructurales de la región variable de la cadena pesada y ligera pueden proceder de secuencias de anticuerpos humanos iguales o diferentes.

Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos naturales, o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Carter *et al.*, documento WO 92/22653. Ciertos aminoácidos de los residuos estructurales de la región variable humana se seleccionan para su sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de la CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de tales posibles influencias es mediante modelización, examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, u observación empírica del efecto de la sustitución o de la mutagénesis de aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo estructural de la región variable murina y un residuo estructural de la región variable humana seleccionado, el aminoácido estructural humano se debería sustituir normalmente por el aminoácido estructural equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espere razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una de manera no covalente al antígeno directamente,
- (2) esté adyacente a una región CDR,
- (3) interaccione de otra manera con una región CDR (p.ej., esté dentro de alrededor de 6 Å de una región CDR), o
- (4) participe en la interfase VL-VH.

Otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos estructurales humanos aceptores que son poco habituales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos se pueden sustituir con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donante de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos estructurales humanos aceptores que son poco habituales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Las zonas estructurales de la región variable de inmunoglobulinas humanizadas normalmente muestran al menos un 85% de identidad de secuencia respecto de una secuencia estructural de la región variable humana o consenso de tales secuencias.

iv. Anticuerpos humanos

Se proporcionan anticuerpos humanos contra alfa-SN mediante una diversidad de técnicas descritas más adelante. Algunos anticuerpos humanos se seleccionan mediante experimentos de unión competitiva, o de otra manera, para que tengan la misma especificidad por el epítipo que un anticuerpo de ratón particular, tal como uno de los anticuerpos monoclonales de ratón descritos en el Ejemplo XI. Los anticuerpos humanos también se pueden cribar en función de la especificidad por un epítipo particular mediante el uso de solamente un fragmento de alfa-SN como inmunógeno, y/o cribando los anticuerpos con una colección de mutantes por delección de alfa-SN. Los anticuerpos humanos tienen preferiblemente especificidad del isotipo IgG1 humano.

(1) Metodología de triomas

Se ha descrito la aproximación básica y un complemento de fusión celular ejemplar, SPAZ-4, para el uso en esta aproximación en Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, patente de EE.UU. nº 4.634.664; y Engleman *et al.*, patente de EE.UU. nº 4.634.666. Las líneas celulares productoras de anticuerpos obtenidas mediante este método se denominan triomas, porque descienden de tres células, dos humanas y una de ratón. Inicialmente, una línea de mieloma de ratón se fusiona con un linfocito B humano para obtener una célula híbrida xenogénica que no produce anticuerpos, tal como la línea celular SPAZ-4 descrita por Oestberg, anteriormente mencionado. La célula xenogénica se fusiona después con un linfocito B humano inmunizado para obtener una línea celular de trioma que produce anticuerpos. Se ha descubierto que los triomas producen anticuerpos de manera más estable que los hibridomas habituales hechos a partir de células humanas.

Los linfocitos B inmunizados se obtienen a partir de la sangre, bazo, nódulos linfáticos o médula ósea de un donante humano. Si se desean anticuerpos contra un antígeno o epítipo específico, es preferible usar ese antígeno o epítipo del mismo para la inmunización. La inmunización puede ser *in vivo* o *in vitro*. Para la inmunización *in vivo*, se aíslan en general las células B a partir de un ser humano inmunizado con alfa-SN, un fragmento de la misma, un polipéptido mayor que contiene alfa-SN o un fragmento, o un anticuerpo anti-idiotípico hacia un anticuerpo hacia

alfa-SN. En ciertos métodos, las células B se aíslan del mismo paciente al que finalmente se le va a administrar la terapia con anticuerpos. Para la inmunización in vitro, los linfocitos B se exponen en general al antígeno durante un periodo de 7-14 días en un medio tal como RPMI-1640 (véase Engleman, anteriormente mencionado) complementado con un 10% de plasma humano.

5 Los linfocitos B inmunizados se fusionan a una célula híbrida xenogénica tal como SPAZ-4 mediante métodos bien conocidos. Por ejemplo, las células se tratan con un 40-50% de polietilén glicol de PM 1000-4000, a alrededor de 37 °C, durante alrededor de 5-10 min. Las células se separan de la mezcla de fusión y se propagan en medios selectivos para los híbridos deseados (p.ej., HAT o AH). Los clones que secretan los anticuerpos que tienen la especificidad de unión necesaria se identifican ensayando el medio de cultivo de triomas por la capacidad de unirse a alfa-SN o un fragmento de la misma. Los triomas que producen anticuerpos humanos que tienen la especificidad deseada se subclonan mediante la técnica de dilución limitante y se cultivan in vitro en medio de cultivo. Las líneas celulares de triomas obtenidas se ensayan después en función de la capacidad de unirse a alfa-SN o a un fragmento de la misma.

10 Aunque los triomas son genéticamente estables, no producen anticuerpos a niveles muy elevados. Los niveles de expresión se pueden incrementar clonando los genes de anticuerpos del trioma en uno o más vectores de expresión, y transformando el vector en líneas celulares habituales de mamífero, bacterianas o de levadura.

(2) Mamíferos transgénicos no humanos

Los anticuerpos humanos contra alfa-SN se pueden producir también a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de inmunoglobulina humana. Normalmente, el locus de inmunoglobulina endógena de tales mamíferos transgénicos está inactivado funcionalmente. Preferiblemente, el segmento del locus de inmunoglobulina humana incluye secuencias sin reordenar de componentes de las cadenas pesadas y ligeras. Tanto la inactivación de genes de inmunoglobulinas endógenas como la introducción de genes de inmunoglobulinas exógenas se puede conseguir mediante recombinación homóloga dirigida, o mediante introducción de cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos que resultan de este proceso son capaces de reordenar funcionalmente las secuencias de los componentes de inmunoglobulinas, y de expresar un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por los genes de inmunoglobulinas humanas, sin expresar los genes de las inmunoglobulinas endógenas. La producción y las propiedades de los mamíferos que tienen estas propiedades se describen con detalle, p.ej., en Lonberg *et al.*, documentos WO93/1222, US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, documento WO 91/10741. Los ratones transgénicos son especialmente adecuados. Los anticuerpos anti-alfa-SN se obtienen inmunizando a un mamífero no humano transgénico, tal como describieron Lonberg o Kucherlapati, anteriormente mencionados, con alfa-SN o un fragmento de la misma. Los anticuerpos monoclonales se preparan, p.ej., fusionando células B de tales mamíferos con líneas celulares de mieloma adecuadas mediante el uso de la tecnología convencional de Kohler-Milstein. También se pueden proporcionar anticuerpos policlonales humanos en forma de suero a partir de seres humanos inmunizados con un agente inmunógeno. Opcionalmente, tales anticuerpos policlonales se pueden concentrar mediante purificación por afinidad mediante el uso de alfa-SN u otro péptido amiloide como reactivo de afinidad.

(3) Métodos de expresión en fagos

40 Una aproximación adicional para obtener anticuerpos anti-alfa-SN humanos es cribar una biblioteca de ADN de células B humanas según el protocolo general resumido en Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989). Como se describió para la metodología de triomas, tales células B se pueden obtener de un ser humano inmunizado con alfa-SN, fragmentos, polipéptidos más largos que contienen alfa-SN o fragmentos o anticuerpos anti-idiotípicos. Opcionalmente, tales células B se obtienen de un paciente que finalmente va a recibir el tratamiento con anticuerpos. Se seleccionan los anticuerpos que se unen a alfa-SN o a un fragmento de la misma. Después se clonan y se amplifican las secuencias que codifican tales anticuerpos (o los fragmentos de unión). El protocolo descrito por Huse se hace más eficaz en combinación con la tecnología de expresión en fagos. Véase, p.ej., Dower *et al.*, documento WO 91/17271 y McCafferty *et al.*, documentos WO 92/01047, US 5.877.218, US 5.871.907, US 5.858.657, US 5.837.242, US 5.733.743 y US 5.565.332. En estos métodos, se producen bibliotecas de fagos en las que los miembros expresan diferentes anticuerpos en sus superficies externas. Los anticuerpos se expresan normalmente como fragmentos Fv o Fab. Los fagos que expresan anticuerpos con una especificidad deseada se seleccionan mediante enriquecimiento por afinidad hacia un péptido alfa-SN o un fragmento del mismo.

En una variación del método de expresión en fagos, se pueden producir anticuerpos humanos que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado. Véase Winter, documento WO 92/20791. En este método, se usa la región variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo murino seleccionado como material de partida. Si, por ejemplo, se selecciona una región variable de la cadena ligera como material de partida, se construye una biblioteca de fagos en la que los miembros expresan la misma región variable de la cadena ligera (es decir, el material de partida murino) y una región variable de la cadena pesada diferente. Las regiones variables de la cadena pesada se obtienen a partir de una biblioteca de regiones variables de la cadena pesada humanas reordenadas. Se selecciona un fago que muestra una unión específica intensa hacia alfa-SN (p.ej., al menos 10⁸ y preferiblemente al

menos 10^9 M^{-1}). La región variable de la cadena pesada humana de este fago sirve después como material de partida para la construcción de una biblioteca de fagos adicional. En esta biblioteca, cada fago expresa la misma región variable de la cadena pesada (es decir, la región identificada a partir de la primera biblioteca de expresión) y una región variable de la cadena ligera diferente. Las regiones variables de las cadenas ligeras se obtienen a partir de una biblioteca de regiones variables de la cadena ligera humanas reordenadas. De nuevo, se selecciona el fago que muestra una unión específica intensa hacia alfa-SN. Este fago expresa las regiones variables de anticuerpos anti-alfa-SN completamente humanos. Estos anticuerpos tienen normalmente la misma o similar especificidad por el epítipo que el material de partida murino.

v. Selección de la región constante

- 10 Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos se pueden unir a al menos una porción de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea una toxicidad mediada por el complemento dependiente de anticuerpos y/o una toxicidad celular. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad para el complemento, y los isotipos IgG2 e IgG4 no la tienen. La elección del isotipo también puede afectar al paso del anticuerpo al cerebro. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos se pueden expresar en forma de tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, en forma de cadenas pesadas distintas, cadenas ligeras, en forma de Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, o en forma de anticuerpos de cadena simple en los que los dominios variables de la cadena pesada y ligera se unen a través de un espaciador.

vi. Expresión de anticuerpos recombinantes

- 20 Los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos se producen en general mediante expresión recombinante. Las construcciones de polinucleótidos recombinantes incluyen en general una secuencia de control de la expresión unida de forma operable a las secuencias codificantes de las cadenas del anticuerpo, que incluyen las regiones promotoras asociadas de manera natural o heterólogas. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar las células hospedadoras eucarióticas. Una vez que el vector se ha incorporado en el hospedador adecuado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión a nivel elevado de las secuencias de nucleótidos, y la recogida y la purificación de los anticuerpos que reaccionan de manera cruzada.

- Estos vectores de expresión en general son replicables en los organismos hospedadores como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Normalmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección, p.ej., resistencia a ampicilina o resistencia a higromicina, para permitir la detección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

- 35 *E. coli* es un hospedador procariótico especialmente útil para la clonación de las secuencias de ADN de la presente invención. Los microbios, tales como levaduras, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un hospedador de levadura preferido, y los vectores adecuados tienen secuencias de control de la expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores inducibles de levadura incluyen, entre otros, los promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

- 40 Las células de mamífero son un hospedador preferido para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Se han desarrollado en la técnica varias líneas celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas celulares de CHO, diversas líneas celulares de COS, células HeLa, células L, célula renal embrionaria humana, y líneas celulares de mieloma. Preferiblemente, las células no son humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y los sitios necesarios de procesamiento de la información, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y empalme del ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras transcripcionales. Las secuencias de control de la expresión preferidas son los promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino, y similares. Véase Co *et al.*, *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

- 50 De manera alternativa, se pueden incorporar secuencias codificantes de anticuerpos en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico, y la expresión posterior en la leche del animal transgénico (véanse, p.ej., los documentos US 5.741.957, US 5.304.489, US 5.849.992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para las cadenas ligeras y/o pesadas en unión operable con un promotor y potenciador de un gen específico de las glándulas mamarias, tal como caseína o beta-lactoglobulina.

- 55 Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés se pueden transferir a la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos, dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, se utiliza habitualmente la transfección con cloruro cálcico para las células procarióticas, y se puede usar el tratamiento con fosfato cálcico, electroporación, lipofección, transfección biolística o basada en virus para otras células hospedadoras. Otros

métodos usados para transformar las células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación, y microinyección (véase en general, Sambrook *et al.*, anteriormente mencionado). Para la producción de animales transgénicos, se pueden microinyectar transgenes en ovocitos fertilizados, o se pueden incorporar en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de tales células se transfieren a ovocitos desnucleados.

Una vez expresados, los anticuerpos se pueden purificar según procedimientos habituales de la técnica, que incluyen purificación mediante HPLC, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

3. Conjugados

Algunos agentes para inducir una respuesta inmunitaria contienen el epítipo adecuado para inducir una respuesta inmunitaria contra LBs, pero son demasiado pequeños para ser inmunógenos. En esta situación, se puede unir un inmunógeno peptídico a una molécula portadora adecuada para formar un conjugado que ayuda a generar una respuesta inmunitaria. Los portadores adecuados incluyen albúminas de suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulinas, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, o un toxoide de otras bacterias patógenas, tales como difteria, *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado de toxina atenuado. Los epítipos de las células T también son moléculas portadoras adecuadas. Se pueden formar conjugados uniendo los agentes de la invención a una molécula polimérica inmunoestimuladora (p.ej., tripalmitoil-S-glicerina cisteína (Pam₃Cys), manano (un polímero de manosa), o glucano (un polímero beta 1→2)), citocinas (p.ej., péptidos IL-1, IL-1 alfa y beta, IL-2, gamma-INF, IL-10, GM-CSF), y quimiocinas (p.ej., MIP1 alfa y beta, y RANTES). Los agentes inmunógenos también se pueden unir a péptidos que aumentan el transporte a través de los tejidos, como se describe en O'Mahony, documentos WO 97/17613 y WO 97/17614. Los inmunógenos se pueden unir al portador con o sin aminoácidos espaciadores (p.ej., gly-gly).

Se pueden formar conjugados uniendo los agentes de la invención a al menos un epítipo de células T. Algunos epítipos de células T son promiscuos, mientras otros epítipos de células T son universales. Los epítipos de células T promiscuos son capaces de potenciar la inducción de la inmunidad de células T en una amplia diversidad de sujetos que expresan diversos tipos de HLA. En contraste con los epítipos de células T promiscuos, los epítipos de células T universales son capaces de potenciar la inducción de la inmunidad de células T en un gran porcentaje, p.ej., al menos un 75%, de sujetos que expresan diversas moléculas de HLA codificadas por diferentes alelos de HLA-DR.

Existe un gran número de epítipos de células T que se dan de manera natural, tales como el toxoide tetánico (p.ej., los epítipos P2 y P30), antígeno de superficie de la hepatitis B, tos ferina, toxoide, proteína F del virus del sarampión, proteína principal de la membrana externa de *Chlamydia trachomatis*, toxoide de la difteria, circumporozoito T de *Plasmodium falciparum*, antígeno CS de *Plasmodium falciparum*, isómeros de fosfatos de triosa de *Schistosoma mansoni*, TraT de *Escherichia coli*, y hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Los péptidos inmunógenos de la invención se pueden conjugar también a los epítipos de células T descritos en Sinigaglia F. *et al.*, *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz R.M. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer J. *et al.*, *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. *et al.*, *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; y Southwood S. *et al.* *J. Immunology*, 160:3363-3373 (1998). Los ejemplos adicionales incluyen:

Hemaglutinina de la gripe: HA₃₀₇₋₃₁₉ PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID N°: 4)

CS de la malaria: epítipo T3 EKKIAMEKASSVFNV (SEQ ID N°: 5)

Antígeno de superficie de la hepatitis B: HBsAg₁₉₋₂₈ FLLTRILTI (SEQ ID N°: 6)

Proteína de choque térmico 65: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ DQSIGDLIAEAMDKVNEG (SEQ ID N°: 7)

Bacilo de Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID N°: 8)

Toxoide tetánico: TT₈₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID N°: 9)

Toxoide tetánico: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE (SEQ ID N°: 10)

gp120 T1 de HIV: KQIINMWQEVGKAMYA (SEQ ID N°: 11)

De manera alternativa, los conjugados se pueden formar uniendo agentes de la invención a al menos un epítipo de células T artificial capaz de unirse a una gran proporción de moléculas de Clase II del MHC, tal como el epítipo pan DR ("PADRE"). PADRE se describe en los documentos US 5.736.142, WO 95/07707, y Alexander J. *et al.*, *Immunity*, 1:751-761 (1994). Un péptido PADRE preferido es **AKXVAAWTLKAAA** (SEQ ID N°: 12), (residuos comunes en negrita), en el que X es preferiblemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, y ciclohexilalanina es el más preferido.

Los agentes inmunógenos se pueden unir a portadores mediante entrecruzamiento químico. Las técnicas para unir un inmunógeno a un portador incluyen la formación de uniones disulfuro mediante el uso de 3-(2-piridil-tio)

propionato de N-succinimidilo (SPDP) y 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, este se puede proporcionar mediante la adición de un residuo de cisteína). Estos reactivos crean una unión disulfuro entre ellos y los residuos peptídicos de cisteína de una proteína, y una unión amida a través del épsilon-amino de una lisina, u otro grupo amino libre de otros aminoácidos. Se describe una diversidad de tales agentes formadores de disulfuro/amida en *Immun. Rev.* 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman una unión tioéter en vez de una unión disulfuro. Muchos de estos agentes de formación de tio-éteres están disponibles comercialmente, e incluyen los ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético, y ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxilo se pueden activar combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, sal sódica.

La inmunogenicidad se puede mejorar por medio de la adición de residuos espaciadores (p.ej., Gly-Gly) entre el epítipo de T_h y el inmunógeno peptídico de la invención. Además de separar físicamente el epítipo de T_h del epítipo de células B (es decir, el inmunógeno peptídico), los residuos de glicina pueden alterar cualquier estructura secundaria artificial creada por la unión del epítipo de T_h con el inmunógeno peptídico, y de ese modo eliminan la interferencia entre las respuestas de las células T y/o B. La separación conformacional entre el epítipo auxiliar y el dominio que genera anticuerpos permite así interacciones más eficaces entre el inmunógeno presentado y las células T_h y B adecuadas.

Para aumentar la inducción de la inmunidad de células T en un gran porcentaje de sujetos que expresan diversos tipos de HLA hacia un agente de la presente invención, se puede preparar una mezcla de conjugados con diferentes epítopos de células T_h. La mezcla puede contener una mezcla de al menos dos conjugados con diferentes epítopos de células T_h, una mezcla de al menos tres conjugados con diferentes epítopos de células T_h, o una mezcla de al menos cuatro conjugados con diferentes epítopos de células T_h. La mezcla se puede administrar con un adyuvante.

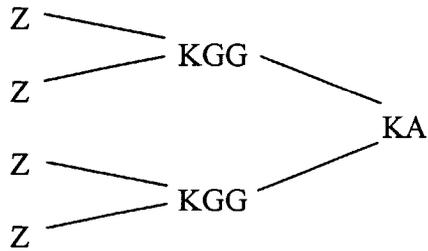
Los péptidos inmunógenos se pueden expresar también en forma de proteínas de fusión con portadores (es decir, péptidos heterólogos). El péptido inmunógeno se puede unir en su extremo aminoterminal, su extremo carboxiterminal, o ambos, a un portador. Opcionalmente, puede haber múltiples repeticiones del péptido inmunógeno en la proteína de fusión. Opcionalmente, se puede unir un péptido inmunógeno a múltiples copias de un péptido heterólogo, por ejemplo, en ambos extremos N y C del péptido. Algunos péptidos portadores sirven para inducir una respuesta de células T auxiliares contra el péptido portador. Las células T auxiliares inducidas a su vez inducen una respuesta de células B contra el péptido inmunógeno unido al péptido portador.

Algunos agentes de la invención comprenden una proteína de fusión en la que un fragmento N-terminal de alfa-SN está unido en su extremo C-terminal a un péptido portador. En tales agentes, el residuo N-terminal del fragmento de alfa-SN constituye el residuo N-terminal de la proteína de fusión. Por lo tanto, tales proteínas de fusión son eficaces para inducir anticuerpos que se unen a un epítipo que requiere que el residuo N-terminal de alfa-SN esté en forma libre. Algunos agentes de la invención comprenden una diversidad de repeticiones de NAC unidas al extremo C-terminal en una o más copias de un péptido portador. Algunas proteínas de fusión comprenden segmentos diferentes de alfa-SN en tándem.

En algunas proteínas de fusión, NAC se fusiona en su extremo N-terminal a un péptido portador heterólogo. Se puede usar NAC con fusiones C-terminales. Algunas proteínas de fusión comprenden un péptido heterólogo unido al extremo N-terminal o al extremo C-terminal de NAC, que está unido a su vez a uno o más segmentos de NAC adicionales de alfa-SN en tándem.

Algunos ejemplos de las proteínas de fusión adecuadas para el uso en la invención se muestran más adelante. Algunas de estas proteínas de fusión comprenden segmentos de alfa-SN unidos a epítopos de toxoide tetánico tal como se describió en los documentos US 5.196.512, EP 378.881 y EP 427.347. Algunas proteínas de fusión comprenden segmentos de alfa-SN unidos a al menos un PADRE. Algunos péptidos heterólogos son epítopos de células T promiscuos, mientras otros péptidos heterólogos son epítopos de células T universales. En algunos métodos, el agente para la administración es simplemente una única proteína de fusión con un segmento de alfa-SN unido a un segmento heterólogo en una configuración lineal. Los agentes terapéuticos de la invención se pueden representar mediante el uso de una fórmula. Por ejemplo, en ciertos métodos, el agente es un multímero de proteínas de fusión representado mediante la fórmula 2^x, en la que x es un número entero de 1-5. Preferiblemente, x es 1, 2, o 3, y 2 es el más preferido. Cuando x es dos, tal multímero tiene cuatro proteínas de fusión unidas en una configuración preferida denominada MAP4 (véase el documento US 5.229.490).

La configuración MAP4 se muestra más adelante, en la que se producen estructuras ramificadas iniciando la síntesis del péptido en las aminas del extremo N-terminal y de las cadenas laterales de lisina. Dependiendo del número de veces que se incorpore la lisina en la secuencia y que se deje ramificar, la estructura resultante presentará múltiples extremos N-terminales. En este ejemplo, se han producido cuatro extremos N-terminales idénticos en el núcleo que contiene la lisina ramificada. Tal multiplicidad aumenta enormemente la sensibilidad de las células B afines.



Z se refiere al péptido NAC, un fragmento del péptido NAC, u otro fragmento activo de alfa-SN como se describió en la Sección I.2 anterior. Z puede representar más de un fragmento activo, por ejemplo:

Z = péptido alfa-SN 60-72 (región NAC) = NH₂-KEQVTNVCGGAVVT-COOH (SEQ ID N°: 13)

5 Z = péptido alfa-SN 73-84 (región NAC) = NH₂-GVTAVAQKTVECG-COOH (SEQ ID N°: 14)

Z = péptido alfa-SN 102-112 = NH₂-C-ácido amino-heptanoico-KNEEGAPCQEG-COOH (SEQ ID N°: 15)

péptido alfa-SN 128-140

Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

Z-Toxide tetánico 830-844 en una configuración MAP4:

10 Z-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID N°: 16)

Z-Toxide tetánico 947-967 en una configuración MAP4:

Z-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID N°: 17)

Z-Toxide tetánico₈₃₀₋₈₄₄ en una configuración MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID N°: 18)

15 Z-Toxide tetánico₈₃₀₋₈₄₄ + toxide tetánico₉₄₇₋₉₆₇ en una configuración lineal:

Z-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID N°: 19)

Péptido PADRE (todo en configuraciones lineales), en el que X es preferiblemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, y ciclohexilalanina es el más preferido-Z:

AKXVAAWTLKAAA-Z (SEQ ID N°: 20)

20 3Z-péptido PADRE:

Z-Z-Z-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID N°: 21)

Los ejemplos adicionales de proteínas de fusión incluyen:

AKXVAAWTLKAAA-Z-Z-Z (SEQ ID N°: 22)

Z-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID N°: 23)

25 Z-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID N°: 24)

PKYVKQNTLKLAT-Z-Z-Z (SEQ ID N°: 25)

Z-PKYVKQNTLKLAT-Z (SEQ ID N°: 26)

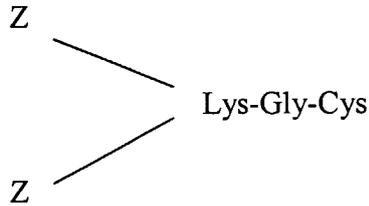
Z-Z-Z-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID N°: 27)

Z-Z-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID N°: 28)

30 Z-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z-Z-Z-QYIKAN
SKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID N°: 29)

Z-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z
(SEQ ID N°: 30)

Z-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID N°: 31) en una resina de 2 ramificaciones:



EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID N°: 32)

(proteína de fusión de fragmentos de sinucleína en configuración MAP-4)

- 5 Se pueden usar las mismas o similares proteínas portadoras y métodos de unión para generar inmunógenos para usarlos en la generación de anticuerpos contra alfa-SN para el uso en una inmunización pasiva. Por ejemplo, se puede administrar alfa-SN o un fragmento unido a un portador a un animal de laboratorio en la producción de anticuerpos monoclonales hacia alfa-SN.

4. Ácido nucleico que codifica los agentes terapéuticos

- 10 Las respuestas inmunitarias contra los cuerpos de Lewy se pueden inducir también mediante la administración de ácidos nucleicos que codifican segmentos de un péptido alfa-SN, y los fragmentos del mismo, otros inmunógenos peptídicos, o anticuerpos y sus cadenas componentes usados para la inmunización pasiva. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno se une en general a elementos reguladores, tales como un promotor y un potenciador, que permiten la expresión del segmento de ADN en las
- 15 células objetivo deseadas de un paciente. Para la expresión en las células sanguíneas, como es deseable para la inducción de una respuesta inmunitaria, son adecuados para la expresión directa los elementos promotores y potenciadores de los genes de inmunoglobulinas de la cadena ligera o pesada o el promotor y potenciador temprano intermedio principal de CMV. Los elementos reguladores y las secuencias codificantes unidas se clonan a menudo en un vector. Para la administración de anticuerpos de cadena doble, las dos cadenas se pueden clonar en los
- 20 mismos vectores o en vectores diferentes. El ácido nucleico que codifica los agentes terapéuticos de la invención puede codificar también al menos un epítipo de células T. Las descripciones de la presente memoria que se refieren al uso de adyuvantes son aplicables *mutatis mutandis* a su uso con el ácido nucleico que codifica los agentes terapéuticos de la presente invención.

- 25 Hay disponibles varios sistemas de vectores virales, que incluyen los sistemas retrovirales (véase, p.ej., Lawrie y Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); vectores adenovirales (véase, p.ej., Bett *et al.*, *J. Virol.* 67, 5911 (1993)); vectores de virus adeno-asociados (véase, p.ej., Zhou *et al.*, *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), vectores virales de la familia de la viruela, que incluyen el virus vaccinia y el virus de la viruela aviar, vectores virales del género de alfa virus tales como los derivados de los virus del bosque Semliki y Sindbis (véase, p.ej., Dubensky *et al.*, *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), el virus de la encefalitis equina venezolana (véase el documento US 5.643.576) y rhabdovirus, tales como el virus de la estomatitis vesicular (véase el documento WO 96/34625) y papilomavirus (Ohe *et al.*, *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo *et al.*, documento WO 94/12629 y Xiao y Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

- 30 El ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que contiene el mismo, se puede empaquetar en liposomas. Los lípidos adecuados y los análogos relacionados se describen en los documentos US 5.208.036, US 5.264.618, US 5.279.833, y US 5.283.185. Los vectores y el ADN que codifica un inmunógeno también se pueden adsorber o asociar con vehículos particulados, cuyos ejemplos incluyen polímeros de poli(metacrilato de metilo) y polilactidas y poli(lactida-co-glicolidas), (véase, p.ej., McGee *et al.*, *J. Micro Encap.* 1996).

- 35 Los vectores de terapia génica o el ADN desnudo se pueden administrar *in vivo* mediante administración a un paciente individual, en general mediante administración sistémica (p.ej., intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica, o infusión intracraneal) o aplicación tópica (véase p.ej., el documento US 5.399.346). Tales vectores pueden incluir además agentes facilitadores tales como bupivacina (véase p.ej., el documento US 5.593.970). El ADN se puede administrar también mediante el uso de una pistola de genes. Véase Xiao y Brandsma, anteriormente mencionados. El ADN que codifica un inmunógeno se precipita en la superficie de microesferas metálicas microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda de choque o gas helio en expansión, y penetran en los tejidos hasta una profundidad de varias capas celulares. Por ejemplo, es adecuado el dispositivo de administración génica Accel™ fabricado por Agacetus, Inc. Middleton, WI. De manera alternativa, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel hasta el torrente sanguíneo simplemente aplicando el ADN sobre la
- 40 piel con irritación química o mecánica (véase el documento WO 95/05853).

- 45 En una variación adicional, los vectores que codifican los inmunógenos se pueden administrar a las células *ex vivo*, tal como células extraídas de un paciente individual (p.ej., linfocitos, aspirados de médula ósea, y biopsia de tejidos) o células madre hematopoyéticas donantes universales, seguido de la reimplantación de las células en un paciente,

normalmente tras la selección de las células que han incorporado el vector.

III. Agentes para inducir una respuesta inmunógena contra A β

A β , también conocido como péptido β -amiloide, o péptido A4 (véase el documento US 4.666.829; Glenner y Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)), es un péptido de 39-43 aminoácidos, que es el componente principal de las placas características de la enfermedad de Alzheimer. A β se genera mediante el procesamiento de una proteína APP mayor mediante dos enzimas, denominadas β y γ secretasas (véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Las mutaciones conocidas de APP asociadas a la enfermedad de Alzheimer se dan cerca del sitio de la β o γ secretasa, o dentro de A β . Por ejemplo, la posición 717 está cerca del sitio de escisión de la γ -secretasa de APP en su procesamiento hasta A β , y las posiciones 670/671 están cerca del sitio de escisión de la β -secretasa. Se cree que las mutaciones provocan AD interaccionando con las reacciones de escisión mediante las cuales se forma A β para incrementar la cantidad de la forma de 42/43 aminoácidos del A β generado.

A β tiene la propiedad poco habitual de que puede fijar y activar las cascadas del complemento clásicas y alternativas. En particular, se une a C1q y finalmente a C3bi. Esta asociación facilita la unión a macrófagos, lo que conduce a la activación de las células B. Además, posteriormente C3bi se descompone y después se une a CR2 de las células B de una manera dependiente de las células T, lo que conduce a un incremento de 10.000 en la activación de estas células. Este mecanismo provoca que A β genere una respuesta inmunitaria superior a la de otros antígenos.

A β tiene varias formas que se dan de manera natural. Las formas humanas de A β se denominan A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43. Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor APP se ilustran mediante la Fig. 1 de Hardy *et al.*, TINS 20, 155-158 (1997). Por ejemplo, A β 42 tiene la secuencia:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT (SEQ ID N°: 33)

A β 41, A β 40 y A β 39 difieren de A β 42 por la omisión de Ala, Ala-Ile, y Ala-Ile-Val, respectivamente, del extremo C-terminal. A β 43 difiere de A β 42 por la presencia de un residuo de Thr en el extremo C-terminal.

Los agentes análogos a los descritos anteriormente para alfa-SN se han descrito previamente para A β (véanse los documentos WO 98/25386 y WO 00/72880). Estos agentes incluyen A β y los fragmentos activos del mismo, conjugados de A β , y los conjugados de los fragmentos activos de A β , anticuerpos hacia A β y los fragmentos activos de los mismos (p.ej., anticuerpos de ratón, humanizados, humanos, y quiméricos), y ácidos nucleicos que codifican las cadenas de anticuerpos. Se prefieren los fragmentos activos de la mitad N-terminal de A β . Los fragmentos inmunógenos preferidos incluyen A β 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 3-7, 1-3, y 1-4. La denominación A β 1-5, por ejemplo, indica un fragmento que incluye los residuos 1-5 de A β y que carece de otros residuos de A β . Se prefieren en particular los fragmentos que comienzan en los residuos 1-3 de A β y que terminan en los residuos 7-11 de A β .

Las descripciones de la presente memoria que se refieren a los agentes que inducen una respuesta inmunitaria activa, los agentes para inducir una respuesta inmunitaria pasiva, los conjugados, y los ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos (véanse las Secciones II. 1, 2, 3, y 4, anteriormente) son aplicables *mutatis mutandis* al uso de A β y los fragmentos del mismo. Las descripciones de la presente memoria que se refieren a los agentes que inducen una respuesta inmunitaria activa, los agentes para inducir una respuesta inmunitaria pasiva, los conjugados, y los ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos (véanse las Secciones II. 1, 2, 3, y 4, anteriormente) son aplicables *mutatis mutandis* al uso de A β y los fragmentos del mismo. Las descripciones de la presente memoria que se refieren a los pacientes susceptibles al tratamiento, y a los regímenes de tratamiento (véanse las Secciones IV y V, más adelante) son aplicables *mutatis mutandis* al uso de A β y los fragmentos del mismo.

El A β desagregado o los fragmentos del mismo significan unidades peptídicas monoméricas. El A β desagregado o los fragmentos del mismo en general son solubles, y son capaces de autoagregarse hasta formar oligómeros solubles. Los oligómeros de A β y los fragmentos de los mismos normalmente son solubles y existen de manera predominante en forma de hélices alfa o cadenas aleatorias. El A β agregado o los fragmentos del mismo significan oligómeros de alfa-SN o los fragmentos de la misma que se han asociado hasta estructuras de láminas beta insolubles. El A β agregado o los fragmentos del mismo también significan polímeros fibrilares. Las fibrillas normalmente son insolubles. Algunos anticuerpos se unen a A β soluble o a los fragmentos del mismo, o A β agregado o los fragmentos del mismo. Algunos anticuerpos se unen tanto a A β soluble o los fragmentos del mismo, como a A β agregado o los fragmentos del mismo.

Algunos ejemplos de conjugados incluyen:

AN90549 (A β 1-7-toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4): (SEQ ID N°: 34)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL

AN90550 (A β 1-7-toxoide tetánico 947-967 en una configuración MAP4):

cuerpo de Lewy o cualquier otro antígeno, o entidad biológica asociada, para la que se desea la actividad de eliminación. Para cribar en función de la actividad contra un cuerpo de Lewy, una muestra de tejido de un cerebro de un paciente de PD o de un modelo animal que tiene la patología característica del Parkinson se pone en contacto con células fagocíticas que albergan un receptor de Fc, tal como células microgliales, y el anticuerpo de ensayo en un medio *in vitro*. Las células fagocíticas pueden ser un cultivo primario o una línea celular, tal como BV-2, C8-B4, o THP-1. En ciertos métodos, los componentes se combinan sobre un portaobjetos de microscopio para facilitar la monitorización microscópica. En ciertos métodos, se llevan a cabo múltiples reacciones en paralelo en los pocillos de una placa de microtitulación. En tal formato, se puede montar un portaobjetos de microscopio en miniatura distinto en los distintos pocillos, o se puede usar un formato de detección no microscópico, tal como la detección mediante ELISA de alfa-SN. Preferiblemente, se hace una serie de medidas de la cantidad de cuerpos de Lewy en la mezcla de reacción *in vitro*, partiendo de un valor inicial antes de que se haya desarrollado la reacción, y uno o más valores de ensayo durante la reacción. El antígeno se puede detectar mediante tinción, por ejemplo, con un anticuerpo marcado con fluorescencia hacia alfa-SN u otro componente de las placas amiloides. El anticuerpo usado para la tinción puede o no ser el mismo que el anticuerpo que se está ensayando en función de la actividad de eliminación. Una reducción respecto del valor inicial durante la reacción de los LBS indica que el anticuerpo de ensayo tiene actividad de eliminación. Es probable que tales anticuerpos sean útiles para prevenir o tratar la PD y otras LBD.

Se pueden usar métodos análogos para cribar anticuerpos en función de la actividad de eliminación de otros tipos de entidades biológicas. El ensayo se puede usar para detectar la actividad de eliminación contra prácticamente cualquier tipo de entidad biológica. En general, la entidad biológica tiene cierto papel en una enfermedad humana o animal. La entidad biológica se puede proporcionar en forma de una muestra de tejido o en forma aislada. Si se proporciona en forma de una muestra de tejido, la muestra de tejido está preferiblemente sin fijar para permitir un acceso fácil a los componentes de la muestra de tejido y para evitar la alteración de la conformación de los componentes inherente al fijado. Los ejemplos de muestras de tejidos que se pueden ensayar en este ensayo incluyen tejido canceroso, tejido precanceroso, tejido que contiene crecimientos benignos tales como verrugas o lunares, tejido infectado con microorganismos patógenos, tejido infiltrado con células inflamatorias, tejido que alberga matrices patológicas entre las células (p.ej., pericarditis fibrinosa), tejido que alberga antígenos anormales, y tejido cicatricial. Los ejemplos de entidades biológicas aisladas que se pueden usar incluyen alfa-SN, antígenos virales o virus, proteoglicanos, antígenos de otros microorganismos patógenos, antígenos tumorales, y moléculas de adhesión. Tales antígenos se pueden obtener a partir de fuentes naturales, expresión recombinante o síntesis química, entre otros medios. La muestra de tejido o la entidad biológica aislada se pone en contacto con células fagocíticas que albergan receptores de Fc, tales como monocitos o células microgliales, y un anticuerpo a ensayar en un medio. El anticuerpo se puede dirigir hacia la entidad biológica de ensayo o hacia un antígeno asociado a la entidad. En esta última situación, el objetivo es ensayar si la entidad biológica se fagocita indirectamente con el antígeno. Normalmente, aunque no necesariamente, el anticuerpo y la entidad biológica (a veces con un antígeno asociado) se ponen en contacto entre sí antes de añadir las células fagocíticas. Después se monitoriza la concentración de la entidad biológica y/o del antígeno asociado, si está presente, que queda en el medio. Una reducción de la cantidad o la concentración de antígeno o de la entidad biológica asociada en el medio indica que el anticuerpo tiene una respuesta de eliminación contra el antígeno y/o la entidad biológica asociada junto con las células fagocíticas.

Los anticuerpos u otros agentes también se pueden cribar en función de la actividad en la eliminación de los cuerpos de Lewy mediante el uso del ensayo *in vitro* descrito en el Ejemplo II. Las células neuronales transfectadas con un vector de expresión que expresan sinucleína forman inclusiones de sinucleína que se pueden visualizar microscópicamente. Se puede determinar la actividad de un anticuerpo o de otro agente en la eliminación de tales inclusiones comparando el aspecto o el nivel de sinucleína en las células transfectadas tratadas con el agente con un aspecto o nivel de sinucleína en las células de control sin tratar con el agente. Una reducción del tamaño o de la intensidad de las inclusiones de sinucleína o una reducción del nivel de sinucleína señala una actividad en la eliminación de sinucleína. La actividad se puede monitorizar visualizando las inclusiones de sinucleína microscópicamente o analizando extractos celulares en un gel y visualizando una banda de sinucleína. Como se indica en el Ejemplo 1, Sección 2, el cambio del nivel de sinucleína es más notable si los extractos se fraccionan en fracciones citosólicas y de membrana, y se analiza la fracción de membrana.

V. Pacientes susceptibles al tratamiento

Los pacientes susceptibles al tratamiento incluyen los individuos en riesgo de padecer una enfermedad sinucleinopática pero que no muestran síntomas, así como los pacientes que ya muestran síntomas. Los pacientes susceptibles al tratamiento también incluyen los individuos en riesgo de padecer una enfermedad con LBD pero que no muestran síntomas, así como los pacientes que ya muestran síntomas. Tales enfermedades incluyen la enfermedad de Parkinson (que incluye la enfermedad de Parkinson idiopática), DLB, DLBD, LBVAD, disautonomía pura, disfagia con cuerpos de Lewy, LBD incidental, LBD hereditaria (p.ej., mutaciones del gen de alfa-SN, PARK3 y PARK4) y atrofia de múltiples sistemas (p.ej., atrofia olivopontocerebelosa, degeneración nigroestriatal y síndrome de Shy-Drager). Por lo tanto, los presentes métodos se pueden administrar de manera profiláctica a individuos que tienen un riesgo genético conocido de LBD. Tales individuos incluyen aquellos que tienen familiares que han experimentado esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina mediante un análisis genético o marcadores bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia PD incluyen las mutaciones de la sinucleína o de los genes Parkin, UCHL1, y CYP2D6; en particular las mutaciones en la posición 53 del gen de sinucleína. Los individuos que

ya padecen la enfermedad de Parkinson se pueden reconocer por sus manifestaciones clínicas, que incluyen temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural.

5 En ciertos métodos, el paciente no tiene síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de ninguna enfermedad amiloidogénica, y padece al menos una enfermedad sinucleinopática. En ciertos métodos, el paciente no tiene
 10 síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de ninguna enfermedad caracterizada por depósitos de amiloide extracelulares. En ciertos métodos, el paciente no tiene enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides de péptido A β . En ciertos métodos, el paciente no tiene síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. En ciertos métodos, el paciente no tiene síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo
 15 de la enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo, deterioro cognitivo leve y síndrome de Down. En ciertos métodos, el paciente tiene una enfermedad de Alzheimer concurrente y una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy. En ciertos métodos, el paciente tiene una enfermedad de Alzheimer concurrente y una enfermedad caracterizada por la acumulación de sinucleína. En ciertos métodos, el paciente tiene una enfermedad de Alzheimer concurrente y la enfermedad de Parkinson.

15 En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (p.ej., 10, 20, o 30 años). Normalmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcanza los 40, 50, 60, o 70 años. El tratamiento implica en general múltiples dosis a lo largo de un periodo de tiempo. El tratamiento se puede monitorizar ensayando el anticuerpo, o activado las respuestas de células T o células B hacia el agente terapéutico (p.ej., péptido alfa-SN o A β , o ambos) a lo largo del tiempo. Si la respuesta decae, está indicada una dosis de refuerzo.

20 Opcionalmente, se determina la presencia o ausencia de síntomas, signos o factores de riesgo de una enfermedad antes de comenzar el tratamiento.

VI. Regímenes de tratamiento

25 En general, los regímenes de tratamiento implican administrar a un paciente un agente eficaz para inducir una respuesta inmunógena hacia alfa-SN y/o un agente eficaz para inducir una respuesta inmunógena hacia A β . En las aplicaciones profilácticas, se administran las composiciones farmacéuticas o medicamentos a un paciente susceptible, o de otra manera en riesgo de padecer una LBD en un régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición o medicamento suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retrasar el comienzo de la enfermedad, lo que incluye los síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se
 30 presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicamentos se administran a un paciente en el que se sospecha, o que ya padece tal enfermedad en un régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o conductuales), que incluyen sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. Una cantidad adecuada para llevar a cabo un tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o
 35 profilácticamente eficaz. Una combinación de cantidad y frecuencia de dosis adecuada para llevar a cabo un tratamiento profiláctico o terapéutico se define como un régimen terapéuticamente o profilácticamente eficaz. En los regímenes profilácticos y terapéuticos, los agentes se administran normalmente en varias dosis hasta que se ha alcanzado una respuesta inmunitaria suficiente. En general, se monitoriza la respuesta inmunitaria, y se administran dosis repetidas si la respuesta inmunitaria comienza a decaer.
 40

45 En ciertos métodos, la administración de un agente da como resultado la reducción de los niveles intracelulares de sinucleína agregada. En ciertos métodos, la administración de un agente da como resultado la mejora de un síntoma clínico de una LBD, tal como la función motora en el caso de la enfermedad de Parkinson. En ciertos métodos, la reducción de los niveles intracelulares de sinucleína agregada o la mejora de un síntoma clínico de la enfermedad se monitoriza a intervalos tras la administración de un agente.

50 Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas, varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen el medio de administración, el sitio seleccionado como objetivo, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, que incluyen los mamíferos transgénicos. Es necesario titular las dosis de tratamiento para optimizar la seguridad y la eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si también se administra un adyuvante, y son necesarias dosis más elevadas en ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunógeno para la administración varía a veces de 1-500 μg por paciente, y más normalmente de 5-500 μg por inyección para la administración a seres humanos. Ocasionalmente, se usa una dosis mayor de 1-2
 55 mg por inyección. En general, se usan alrededor de 10, 20, 50 ó 100 μg para cada inyección a seres humanos. La masa de inmunógeno también depende de la proporción en masa del epítipo inmunógeno en el inmunógeno respecto de la masa de inmunógeno en conjunto. En general, se usan 10^{-3} a 10^{-5} micromoles de epítipo inmunógeno por microgramo de inmunógeno. El ritmo de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, a una vez al año, a una vez por década. En cualquier día determinado que se administra una dosis de
 60 inmunógeno, la dosis es mayor de 1 μg /paciente, y normalmente mayor de 10 μg /paciente si además se administra

un adyuvante, y mayor de 10 µg/paciente y normalmente mayor de 100 µg/paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos de tiempo, tales como intervalos de 6 semanas. Otro régimen consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen implica una inyección cada dos meses de por vida. De manera alternativa, las inyecciones de refuerzo se pueden administrar de manera irregular, tal como se indica mediante la monitorización de la respuesta inmunitaria.

Para la inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosis oscila de alrededor de 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg o, en otras palabras, 70 mgs o 700 mgs o dentro del intervalo de 70-700 mgs, respectivamente, para un paciente de 70 kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En ciertos métodos, se administran de manera simultánea dos o más anticuerpos monoclonales con especificidades de unión diferentes, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado se halla dentro del intervalo indicado. El anticuerpo se administra normalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, tal como se indica midiendo los niveles sanguíneos del anticuerpo hacia alfa-SN en el paciente. En ciertos métodos, la dosis se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 µg/ml, y en ciertos métodos 25-300 µg/ml. De manera alternativa, el anticuerpo se puede administrar en forma de una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso es necesaria una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguido de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos, y los anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes a lo largo de un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, a veces es necesaria una dosis relativamente elevada a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican los inmunógenos oscilan de alrededor de 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para los vectores virales infecciosos varían de 10-100, o más, viriones por dosis.

Los agentes para inducir una respuesta inmunitaria se pueden administrar mediante medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intratecales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía más típica de administración de un agente inmunógeno es la subcutánea, aunque las otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más habitual es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se lleva a cabo más generalmente en el brazo o en los músculos de la pierna. En ciertos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular en el que se han acumulado depósitos, por ejemplo mediante inyección intracraneal. Se prefiere la inyección intramuscular o la infusión intravenosa para la administración del anticuerpo. En ciertos métodos, los anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En ciertos métodos, los anticuerpos se administran en forma de una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad™.

Como se indicó anteriormente, se pueden administrar agentes que inducen una respuesta inmunógena contra alfa-SN y Aβ, respectivamente, en combinación. Los agentes se pueden combinar en una única preparación o equipo para el uso simultáneo, secuencial o por separado. Los agentes pueden ocupar viales distintos en la preparación o equipo, o se pueden combinar en un único vial. Estos agentes de la invención se pueden administrar opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de LBD. En el caso de la enfermedad de Parkinson y el síndrome de Down, en los que se dan LBs en el cerebro, los agentes de la invención se pueden administrar también junto con otros agentes que incrementan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera hematoencefálica.

Los agentes inmunógenos de la invención, tales como los péptidos, a veces se administran en combinación con un adyuvante. Se puede usar una diversidad de adyuvantes en combinación con un péptido, tal como alfa-SN, para generar una respuesta inmunitaria. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca hacia un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil lípido A (MPL™) 3 des-O-acilado (véase el documento GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, actualmente parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un glucósido de triterpeno o saponina aislado de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina hallado en Sudamérica (véase Kensil *et al.*, en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell y Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente de EE.UU. n° 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunitarios, tales como monofosforil lípido A (véase Stoute *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), polímeros de Pluronic, y micobacterias muertas. Otro adyuvante es CpG (documento WO 98/40100). De manera alternativa, se puede acoplar alfa-SN o Aβ a un

adyuvante. Sin embargo, tal acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación de alfa-SN para afectar a la naturaleza de la respuesta inmunitaria hacia ella. Los adyuvantes se pueden administrar en forma de un componente de una composición terapéutica con un agente activo, o se pueden administrar por separado, antes, de manera concurrente con, o después de la administración del agente terapéutico.

5 Una clase preferida de adyuvantes son las sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. Tales adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos, tales como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos, tales como poli(ácido glutámico) o polilisina. Otra clase de adyuvantes son las formulaciones de emulsiones aceite en agua. Tales adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos, tales como péptidos de
10 muramilo (p.ej., N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) theramide™), u otros componentes de la pared de las células bacterianas. Las emulsiones aceite en agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837), que contiene un 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85 (opcionalmente que contiene diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas mediante el uso de un microfluidificador tal como el microfluidificador modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene un 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero bloqueado de Pluronic L121, y thr-MDP, microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partículas, y (c)
15 el sistema de adyuvante Ribit™ (RAS), (Ribit ImmunoChem, Hamilton, MT) que contiene un 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared de las células bacterianas del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoX™).

Otra clase de adyuvantes preferidos son los adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (QS-21, Aquila, Framingham, MA) o las partículas generadas a partir de ellos, tales como ISCOMs (complejos inmunoestimuladores) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen RC-529, GM-CSF y el Adyuvante Completo de Freund (CFA) y el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como las interleucinas (p.ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL13, e IL-15), el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y el factor de necrosis tumoral (TNF). Otra clase de adyuvantes son los análogos de glucolípidos, que incluyen N-glucosilamidas, N-glucosilureas y N-glucosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el residuo de carbohidrato con un aminoácido, como inmunomoduladores o adyuvantes (véase la pat. de EE.UU. nº 4.855.283). También se pueden usar proteínas de choque térmico, p.ej., HSP70 y HSP90, como adyuvantes.
25

Se puede administrar un adyuvante con un inmunógeno en forma de una composición individual, o se puede administrar antes, de manera concurrente con, o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y el adyuvante se pueden envasar y suministrar en el mismo vial, o se pueden envasar en viales diferentes y mezclarlos antes del uso. El inmunógeno y el adyuvante se envasan en general con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica prevista. Si el inmunógeno y el adyuvante se envasan por separado, el envase incluye en general las instrucciones para mezclarlos antes del uso. La elección de un adyuvante y/o vehículo depende de la estabilidad de la formulación inmunógena que contiene el adyuvante, la vía de administración, el calendario de dosificación, la eficacia del adyuvante para la especie a vacunar, y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido aprobado o es aprobable para la administración a seres humanos por parte de los organismos regulatorios pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para la administración a seres humanos. Se prefiere el alumbre, MPL y QS-21. Opcionalmente, se pueden usar simultáneamente dos o más adyuvantes diferentes. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21, MPL o RC-529 con GM-CSF, y alumbre, QS-21 y MPL juntos. Además, se puede usar el adyuvante incompleto de Freund (Chang *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS-21, y MPL, y todas las combinaciones de los mismos.
35
40
45

Los agentes de la invención se administran a menudo en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo y una diversidad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase *Remington's Pharmaceutical Science* (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). La forma preferida depende del modo deseado de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones pueden incluir además, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes atóxicos, farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos usados habitualmente para formular composiciones farmacéuticas para la administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona para que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, disoluciones de Ringer, disolución de dextrosa, y disolución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede incluir también otros vehículos, adyuvantes, o estabilizantes atóxicos, no terapéuticos, no inmunógenos, y similares.
50
55

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos) y copolímeros (tales como Sefarosa™) funcionalizada con látex, agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros
60

de aminoácidos, y agregados de lípidos (tales como gotículas de aceite o liposomas). Además, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores (es decir, adyuvantes).

5 Para la administración parenteral, los agentes de la invención se puede administrar en forma de dosis inyectables de una disolución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceites, solución salina, glicerol, o etanol. Además, en las composiciones puede haber presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponadoras del pH, y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de petróleo, origen animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilen glicol o polietilen glicol son vehículos líquidos preferidos, en particular para las disoluciones inyectables. Los anticuerpos se pueden administrar en forma de una inyección de liberación lenta o una preparación para implante, que se puede formular de tal manera que permita una liberación sostenida del ingrediente activo. Una composición ejemplar comprende el anticuerpo monoclonal a 5 mg/mL, formulado en un tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl. Las composiciones para administración parenteral en general son sustancialmente estériles, sustancialmente isotónicas y fabricadas en condiciones GMP de la FDA o de un organismo similar. Por ejemplo, las composiciones que contienen productos biológicos se esterilizan en general mediante esterilización por filtración. Las composiciones se pueden formular para la administración en una única dosis.

20 En general, las composiciones se preparan en forma de productos inyectables, como disoluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la disolución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida, o copolímero para un efecto adyuvante incrementado, tal como se discutió anteriormente (véase Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997)). Los agentes de esta invención se pueden administrar en forma de una inyección de liberación lenta o una preparación para implante, que se puede formular de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo.

Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen las formulaciones orales, intranasales y pulmonares, los supositorios, y las aplicaciones transdérmicas.

30 Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilen glicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferiblemente 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como los grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, y carbonato magnésico. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos, y contienen un 10%-95% de ingrediente activo, preferiblemente un 25%-70%.

35 La aplicación tópica puede dar como resultado la administración transdérmica o intradérmica. La administración tópica se puede facilitar mediante la co-administración del agente con la toxina del cólera o derivados destoxificados o subunidades de la misma, u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn *et al.*, *Nature* 391, 851 (1998)). La co-administración se puede conseguir mediante el uso de los componentes en forma de una mezcla o en forma de moléculas unidas obtenidas mediante entrecruzamiento químico o expresión en forma de una proteína de fusión.

40 De manera alternativa, la administración transdérmica se puede conseguir mediante el uso de un parche cutáneo o de transferosomas (Paul *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998)).

VII. Métodos de monitorización y métodos de diagnóstico

45 La invención proporciona métodos para detectar una respuesta inmunitaria contra un péptido alfa-SN y/o un péptido A β en un paciente que padece o que es susceptible a una LBD. Los métodos son especialmente útiles para la monitorización de un curso de tratamiento que se está administrando a un paciente. Los métodos se pueden usar para monitorizar tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. Los métodos son útiles para monitorizar tanto la inmunización activa (p.ej., el anticuerpo producido en respuesta a la administración de un inmunógeno) como la inmunización pasiva (p.ej., midiendo el nivel del anticuerpo administrado).

50 1. Inmunización activa

Algunos métodos implican determinar un valor inicial de una respuesta inmunitaria en un paciente antes de administrar una dosis del agente, y comparar esto con un valor para la respuesta inmunitaria después del tratamiento. Un incremento significativo (es decir, mayor que el margen típico de error experimental en las medidas repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales medidas) del valor de la respuesta inmunitaria indica un resultado positivo del tratamiento (es decir, esa administración del agente ha alcanzado o aumentado una respuesta inmunitaria). Si el valor de la respuesta inmunitaria no cambia de manera significativa, o disminuye, indica un resultado negativo del tratamiento. En general, se espera que los pacientes que se someten a un curso inicial de tratamiento con un agente inmunógeno muestren un incremento de la respuesta

inmunitaria con las dosis sucesivas, que finalmente alcanza una meseta. La administración del agente continúa en general mientras la respuesta inmunitaria se incrementa. La obtención de la meseta es un indicador de que la administración del tratamiento se puede interrumpir o reducir en dosis o frecuencia.

5 En otros métodos, se determina un valor de control (es decir, una media y desviación estándar) de la respuesta inmunitaria para una población de control. En general, los individuos de la población de control no han recibido un tratamiento anterior. Los valores medidos de la respuesta inmunitaria en un paciente después de administrar un agente terapéutico se comparan después con el valor de control. Un incremento significativo respecto del valor de control (p.ej., mayor de una desviación estándar de la media) indica un resultado positivo del tratamiento. La ausencia de un incremento significativo o una disminución indica un resultado negativo del tratamiento. La administración del agente continúa en general mientras la respuesta inmunitaria se esté incrementando respecto del valor de control. Como antes, la obtención de una meseta respecto de los valores de control es un indicador de que la administración del tratamiento se puede interrumpir o reducir en dosis o frecuencia.

15 En otros métodos, se determina un valor de control de la respuesta inmunitaria (p.ej., una media y desviación estándar) de una población de control de individuos que se han sometido al tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas inmunitarias han alcanzado una meseta en respuesta al tratamiento. Los valores medidos de la respuesta inmunitaria en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (p.ej. más de una desviación estándar) del valor de control, el tratamiento se puede interrumpir. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor de control, se justifica la administración continuada del agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control, puede estar indicado un cambio en el régimen de tratamiento, por ejemplo, el uso de un adyuvante diferente.

20 En otros métodos, en un paciente que no está recibiendo en la actualidad tratamiento, pero que se ha sometido a un curso de tratamiento previo, se monitoriza la respuesta inmunitaria para determinar si es necesaria la reanudación del tratamiento. El valor medido de la respuesta inmunitaria en el paciente se puede comparar con un valor de la respuesta inmunitaria previamente alcanzada en el paciente después de un curso de tratamiento previo. Una disminución significativa respecto de la medida previa (es decir, más de un margen típico de error en las medidas repetidas de la misma muestra) es una indicación de que se puede reanudar el tratamiento. De manera alternativa, el valor medido en un paciente se puede comparar con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de someterse a un curso de tratamiento. De manera alternativa, el valor medido en un paciente se puede comparar con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados de manera profiláctica que permanecen sin síntomas de enfermedad, o en poblaciones de pacientes tratados de manera terapéutica que muestran una mejora de las características de la enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa respecto del nivel de control (es decir, más de una desviación estándar) es un indicador de que se debería reanudar el tratamiento en un paciente.

25 La muestra de tejido para el análisis en general es sangre, plasma, suero, mucosa o líquido cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza en busca de una indicación de una respuesta inmunitaria hacia cualquier forma de alfa-SN, en general NAC, o A β . La respuesta inmunitaria se puede determinar a partir de la presencia, p.ej., de anticuerpos o células T que se unen de manera específica a alfa-SN o A β . Los métodos de ELISA para detectar anticuerpos específicos hacia alfa-SN se describen en la sección de Ejemplos. Los métodos para detectar células T reactivas se han descrito anteriormente (véanse las Definiciones). En ciertos métodos, la respuesta inmunitaria se determina mediante el uso de un ensayo de eliminación, tal como se describió en la Sección III anterior. En tales métodos, se pone en contacto una muestra de tejido o sangre de un paciente que se está ensayando con LBs (p.ej., de un ratón transgénico para sinucleína/hAPP) y células fagocíticas que albergan receptores de Fc. Después se monitoriza la eliminación subsiguiente de los LBs. La existencia y el grado de respuesta de eliminación proporciona una indicación de la existencia y el nivel de anticuerpos eficaces para eliminar la alfa-SN en la muestra de tejido del paciente en ensayo.

2. Inmunización pasiva

En general, los procedimientos para monitorizar la inmunización pasiva son similares a los descritos anteriormente para monitorizar la inmunización activa. Sin embargo, el perfil de anticuerpos tras la inmunización pasiva muestra en general un máximo inmediato de la concentración de anticuerpo, seguido por una disminución exponencial. Sin una dosis adicional, la disminución se aproxima a los niveles pretratamiento en un periodo de días a meses, dependiendo de la semivida del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la semivida de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

En ciertos métodos, se hace una medida del valor inicial del anticuerpo hacia alfa-SN en el paciente antes de la administración, se hace una segunda medida poco después para determinar el nivel de anticuerpo máximo, y se hacen una o más medidas adicionales a intervalos para monitorizar la desintegración de los niveles de anticuerpo. Cuando el nivel del anticuerpo ha disminuido hasta el valor inicial o un porcentaje predeterminado del pico menor del valor inicial (p.ej., 50%, 25% o 10%), se administra una dosis adicional del anticuerpo. En ciertos métodos, los niveles medidos del máximo o los posteriores menos el fondo se comparan con los niveles de referencia que previamente se ha determinado que constituyen un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico beneficioso en otros pacientes. Si el nivel del anticuerpo medido es significativamente menor que un nivel de referencia (p.ej.,

menor que la media menos una desviación estándar del valor de referencia en la población de pacientes que se benefician del tratamiento), está indicada la administración de una dosis adicional de anticuerpo.

VIII. Formación de imágenes *in vivo*

5 La descripción describe métodos de formación de imágenes *in vivo* de LBs en un paciente. Tales métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de PD, u otra enfermedad asociada a la presencia de LBs en el cerebro, o la susceptibilidad a ella. Por ejemplo, se pueden usar los métodos en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene LBs, es probable que el paciente padezca, p.ej., PD. Los métodos también se pueden usar en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos anormales de amiloide indica la susceptibilidad a una futura enfermedad sintomática. Los métodos también son útiles para monitorizar la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes a los que previamente se les ha diagnosticado la enfermedad de Parkinson.

10 Los métodos funcionan administrando un reactivo, tal como un anticuerpo que se une a alfa-SN en el paciente, y después detectando el agente después de que se haya unido. Los anticuerpos preferidos se unen a los depósitos de alfa-SN en un paciente sin unirse al polipéptido NACP de longitud completa. Se prefieren especialmente los anticuerpos que se unen a un epítipo de alfa-SN en NAC. Si se desea, la respuesta de eliminación se puede evitar mediante el uso de fragmentos del anticuerpo que carecen de una región constante de longitud completa, tal como Fab. En ciertos métodos, el mismo anticuerpo puede servir como tratamiento y como reactivo de diagnóstico. En general, los anticuerpos que se unen a epítipos N-terminales de alfa-SN no muestran una señal tan fuerte como los anticuerpos que se unen a epítipos C-terminales, supuestamente porque los epítipos N-terminales son inaccesibles en los LBs (Spillantini *et al.*, PNAS, 1998). Por lo tanto, tales anticuerpos se prefieren menos.

15 Los reactivos de diagnóstico se pueden administrar mediante inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro mediante inyección intracraneal o taladrando un orificio a través del cráneo. La dosis del reactivo debería estar en el mismo intervalo que para los métodos de tratamiento. En general, el reactivo está marcado, aunque en ciertos métodos, el reactivo primario con afinidad hacia alfa-SN está sin marcar, y se usa un agente marcador secundario para que se una al reactivo primario. La elección del marcador depende del medio de detección. Por ejemplo, un marcador fluorescente es adecuado para la detección óptica. El uso de marcadores paramagnéticos es adecuado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Los marcadores radiactivos también se pueden detectar mediante el uso de PET o SPECT.

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

35 Ejemplos

I. La inmunización de ratones transgénicos para alfa-sinucleína humana con alfa-sinucleína humana da como resultado la producción de un título elevado de anticuerpos anti-alfa-sinucleína que atraviesan la barrera hematoencefálica

40 Se resuspendió alfa-SN humana recombinante de longitud completa a una concentración de 1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X. Para cada inyección, se usaron 50 µl de alfa-SN; lo que proporcionó una concentración final de 50 µg por inyección, a la que se le añadieron 150 µl de PBS 1X. Después se añadió adyuvante completo de Freund (CFA) 1:1 a alfa-SN o PBS solo (control), se agitó en vórtex y se sometió a sonicación para resuspender completamente la emulsión. Para las inyecciones iniciales, ocho ratones de 4-7 meses de edad transgénicos (tg) simples para alfa-SN humana de la línea D (Masliah, *et al. Science* 287:1265-1269 (2000)) recibieron inyecciones de alfa-SN humana en CFA y, como control, cuatro ratones tg de alfa-SN humana de la línea D recibieron inyecciones de PBS en CFA. Los ratones recibieron un total de 6 inyecciones. Tres inyecciones se llevaron a cabo a intervalos de dos semanas, y después 3 inyecciones a intervalos de un mes. Los animales se sacrificaron mediante el uso de las directrices del NIH para el tratamiento humano de animales 5 meses después del inicio del experimento. Después de recoger muestras de sangre para la determinación de los títulos de anticuerpos, los cerebros se fijaron mediante inmersión durante 4 días en un 4% de paraformaldehído en PBS. Los niveles de anticuerpos contra alfa-SN humana mediante ELISA se muestran en la Tabla 1. Los ratones tratados se dividen en dos grupos por el título. El primer grupo desarrolló un título moderado de 2-8.000. El segundo grupo desarrolló un título elevado de 12000-30000. No se halló título en los ratones de control. El análisis neuropatológico mostró que los ratones que produjeron títulos elevados tuvieron una disminución notable del tamaño de las inclusiones de sinucleína. Los ratones que produjeron títulos moderados mostraron una disminución más pequeña. La Fig. 2 (paneles a-d) muestra inclusiones de sinucleína en (a) un ratón no transgénico, (b) un ratón transgénico tratado con CFA solamente, (c) un ratón transgénico inmunizado con alfa sinucleína y CFA que desarrolló un título moderado, y (d) un ratón transgénico inmunizado con alfa sinucleína y CFA que desarrolló un título más elevado. Las muestras se visualizaron mediante inmunotinción con un anticuerpo anti-alfa-SN humana. La Fig. 2 muestra inclusiones de

sinucleína en el panel (b), pero no en el panel (a). En el panel (c), ratón tratado, títulos moderados, las inclusiones tienen una intensidad un poco reducida. En el panel (d), las inclusiones tienen una intensidad notablemente reducida. Los paneles (e)-(h) muestran los niveles de anti-IgG en los cerebros de los mismos cuatro ratones de los paneles (a) a (d), respectivamente. Se puede observar que IgG está presente en el panel (g), y en un grado mayor en el panel (h). Los datos muestran que los anticuerpos administrados de manera periférica hacia alfa-SN atraviesan la barrera hematoencefálica y alcanzan el cerebro. Los paneles (i) a (l) muestran la tinción para GAP, un marcador de células astrogliales, de nuevo para los mismos cuatro ratones de las dos primeras filas de la figura. Se puede observar que los paneles (k) y (l) muestran una tinción moderadamente incrementada en comparación con (i) y (j). Estos datos muestran que la eliminación de los depósitos de sinucleína va acompañada por una reacción astrogliar y microglial moderada.

Tabla 1

Grupo	Genotipo	n =	Edad al sac.	Tratamiento/Duración	Títulos	Inclusiones de Sin (+)/mm ²
I	Tg Sin	4	10-13 meses	a-sin + CFA 50 µg/inj. durante 3 meses, sac. 3 meses después	2.000 - 8.000	15-29
II	Tg Sin	4	10-13 meses	a-sin + CFA 50 µg/inj. durante 3 meses, sac. 3 meses después	12,000 - 30,000	10-22
III	Tg Sin	4	10-13 meses	PBS + CFA durante 3 meses, sac. 3 meses después	0	18-29

II. Cribado *in vitro* en busca de anticuerpos que eliminan las inclusiones de sinucleína

Se transfectaron neuronas GT1-7 (Hsue *et al.* Am. J. Pathol. 157:401-410 (2000)) con un vector de expresión pCR3.1-T (Invitrogen, Carlsbad, CA) que expresaba alfa-SN murina y se compararon con las células transfectadas con el vector de expresión solo (Fig. 3, paneles B y A, respectivamente). Las células transfectadas con vector solo (panel A) tienen un aspecto fibroblástico, mientras las células transfectadas con alfa-SN son redondeadas, con cuerpos de inclusión en la superficie celular visibles por medio de microscopía óptica y de barrido confocal. Las células transfectadas se trataron después con suero preinmune de conejo (panel C) o 67-10, un anticuerpo policlonal de conejo purificado mediante afinidad contra los residuos 131-140 C-terminales de alfa-SN murina (Iwai, *et al.*, Neuron 14:467 (1995)) (panel D). Se puede observar que los cuerpos de inclusión se tiñen menos intensamente en el panel D que en el panel C, lo que indica que el anticuerpo contra alfa sinucleína fue eficaz para eliminar o prevenir el desarrollo de las inclusiones. La Fig. 4 muestra un análisis en gel de las fracciones particuladas y citosólicas de las células transfectadas con GT1-7 tratadas con el suero preinmune de conejo y el anticuerpo policlonal 67-10. Se puede observar que los niveles de sinucleína en la fracción citosólica son iguales en gran medida mediante el tratamiento con suero preinmune o anticuerpo hacia alfa-SN. No obstante, la banda de alfa-SN desaparece en la fracción de membrana de las células GT1-7 tratadas con el anticuerpo hacia alfa-SN. Estos datos indican que la actividad del anticuerpo hacia alfa-sinucleína da como resultado la eliminación de la sinucleína asociada a la membrana celular.

Las células GT1-7 transfectadas se pueden usar para cribar anticuerpos en función de la actividad en la eliminación de las inclusiones de sinucleína con detección mediante análisis inmunohistoquímico, microscopía óptica como en la Fig. 3 o mediante análisis en gel como en la Fig. 4.

III. Eficacia profiláctica y terapéutica de la inmunización con alfa-sinucleína

i. Inmunización de ratones tg para alfa-sinucleína humana

Para este estudio, se usan ratones transgénicos (tg) para alfa-SN humana heterocigotos (Línea D) (Masliah *et al.*, Am. J. Pathol (1996) 148:201-10) y controles no transgénicos (no tg). Los animales experimentales se dividen en 3 grupos. Para el grupo I, se ensayan los efectos preventivos de la inmunización temprana inmunizando a los ratones durante 8 meses comenzando a los 2 meses de edad. Para el grupo II, se vacunan ratones adultos jóvenes durante 8 meses comenzando a la edad de 6 meses para determinar si la inmunización puede reducir la progresión de la enfermedad una vez que se ha establecido una patología moderada. Para el grupo III, se inmunizan ratones de mayor edad durante 4 meses comenzando a la edad de 12 meses para determinar si la inmunización puede reducir la gravedad de los síntomas una vez que se ha establecido una patología intensa. Para todos los grupos, los ratones se inmunizan con alfa-SN humana recombinante más CFA o CFA solo, y para cada experimento se usan 20 ratones tg y 10 no tg. De ellos, se inmunizan 10 ratones tg con alfa-SN humana+CFA y otros 10 tg con CFA solo. De forma similar, se inmunizan 5 ratones no tg con alfa-SN humana+CFA y los otros 5 con CFA solo. Brevemente, el protocolo de inmunización consiste en una inyección inicial de alfa-SN humana recombinante purificada (2 mg/ml) en CFA, seguida de una reinyección 1 mes más tarde de alfa-SN humana en combinación con IFA. A los ratones se les reinyecta después esta mezcla una vez al mes. En un pequeño subgrupo de ratones tg para alfa-SN humana (n=3/cada uno; 6 meses de edad) y no tg (n=3/cada uno; 6 meses de edad), se llevan a cabo experimentos

adicionales que consisten en la inmunización con alfa-SN murina (m), beta sinucleína humana o alfa-SN humana mutante (A53T).

Los niveles de anticuerpos hacia alfa-SN se determinan mediante el uso de placas de microtitulación de 96 pocillos revestidas con 0,4 µg por pocillo de alfa-SN de longitud completa purificada mediante incubación durante la noche a 4 °C en tampón de carbonato sódico, pH 9,6. Los pocillos se lavan 4X con 200 µL cada uno de PBS que contiene un 0,1% de Tween, y se bloquean durante 1 hora en PBS-1% de BSA a 37 °C. Las muestras de suero se diluyen en serie "en el pocillo", 1:3, comenzando en la fila A, oscilando de una dilución 1:150 a 1:328.050. Para los experimentos de control, se analiza una muestra de anticuerpo monoclonal de ratón con alfa-SN, sin proteína, y con blancos de tampón solamente. Las muestras se incuban durante la noche a 4 °C, seguido de una incubación de 2 horas con anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina anti-IgG de ratón de cabra (1:7500, Promega, Madison, WI). El sustrato fluorescente de fosfatasa alcalina Atto-phos® se añade después durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lee a una longitud de onda de excitación de 450 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. Los resultados se representan en un gráfico semi-logarítmico con las unidades relativas de fluorescencia en el eje de ordenadas y la dilución del suero en el eje de abscisas. El título del anticuerpo se define como la dilución a la que hubo una reducción del 50% desde la unión máxima del anticuerpo.

Para cada grupo, al final del tratamiento, se somete a los ratones a una evaluación motora en Rotarod, como se describió (Masliah, *et al.* (2000)). Tras el análisis, se sacrifican los ratones y se extraen los cerebros para realizar un análisis neuroquímico y neuropatológico detallado como se describe más adelante. Brevemente, se congela el hemisferio derecho y se homogeneiza para las determinaciones de la inmunorreactividad de alfa-SN humana agregada y sin agregar mediante transferencia de Western (Masliah, *et al.* (2000)). El hemisferio izquierdo se fija en un 4% de paraformaldehído, se corta en serie en el vibratomo para el análisis inmunocitoquímico y ultraestructural.

ii. Análisis inmunocitoquímico y neuropatológico.

Para determinar si la inmunización disminuye, se inmunotiñen cortes de agregación de alfa-SN humana con un anticuerpo policlonal de conejo contra alfa-SN humana (1:500). Después de una incubación durante la noche a 4 °C, los cortes se incuban con un anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado seguido de complejo avidina D-peroxidasa de rábano (HRP) (1:200, ABC Elite, Vector). Los cortes también se inmunotiñen con anticuerpo secundario anti-conejo, ratón o humano biotinilado solo. Los experimentos con el anticuerpo secundario anti-ratón determinan si los anticuerpos contra alfa-SN humana entran en el cerebro. La reacción se visualiza con un 0,1% de tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencidina (DAB) en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) con un 0,001% de H₂O₂, y después los cortes se montan en portaobjetos con Entellan. Los niveles de inmunorreactividad se estudian de manera semicuantitativa mediante densitometría óptica con el uso del dispositivo Quantimet 570C. Estos cortes se estudian también mediante análisis de imagen para determinar el número de inclusiones inmunorreactivas de alfa-SN, y esta medida fiable de la agregación de alfa-SN actúa como un índice valioso del efecto anti-agregación de la vacunación (Masliah, *et al.* (2000)).

El análisis de los patrones de la neurodegeneración se realiza analizando las densidades sinápticas y dendríticas en el hipocampo, la corteza frontal, la corteza temporal y los ganglios basales mediante la utilización de cortes de vibratomo inmunomarcados doblemente para sinaptofisina y la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), y se visualiza con LSCM. El análisis adicional de la neurodegeneración se realiza determinando la inmunorreactividad de tirosina hidroxilasa (TH) en el caudoputamen y la sustancia negra (SN) como se describió previamente (Masliah, *et al.* (2000)). Se formarán imágenes de los cortes con LSCM, y a cada imagen individual se le aplica un umbral de manera interactiva, de forma que se incluyen las terminaciones inmunorreactivas para TH que exhiben una intensidad de píxeles dentro de un intervalo lineal. Se establece una escala para determinar la proporción píxel/µm. Después, esta información se usa para calcular el % de área de neuropilo cubierto por terminaciones inmunorreactivas para TH. Estos mismos cortes se utilizan también para determinar el número de neuronas TH en la SN.

Para estudiar los patrones de la respuesta inmunitaria a la inmunización, se llevan a cabo análisis inmunocitoquímicos y ultraestructurales con anticuerpos contra GFAP, MHC de clase II, Mac 1, TNF-alfa, IL1-beta e IL6 humanas en los cortes de cerebro de ratones no tg y tg para alfa-SN inmunizados con alfa-SN humana recombinante e inmunógenos de control.

iii. Análisis conductual.

Para la actividad locomotora, los ratones se analizan durante 2 días en el dispositivo Rotarod (San Diego Instruments, San Diego, CA), como se describió previamente (Masliah, *et al.* (2000)). El primer día, se adiestra a los ratones en 5 ensayos: El primero a 10 rpm, el segundo a 20 rpm y del tercero al quinto a 40 rpm. El segundo día, los ratones se ensayan en 7 ensayos a 40 rpm cada uno. Los ratones se colocan individualmente sobre el cilindro y se incrementa la velocidad de rotación de 0 a 40 rpm a lo largo de un periodo de 240 seg. Se registra el tiempo que los ratones permanecen sobre el rodillo (latencia de caída) y se usa como medida de la función motora.

IV. Inmunización con fragmentos de alfa-sinucleína

Se inmunizan ratones transgénicos para alfa-SN humana de 10-13 meses de edad con 9 regiones diferentes de

5 alfa-SN para determinar qué epítomos producen la respuesta eficaz. Se inyectan i.p. los 9 inmunógenos diferentes y un control como se describió anteriormente. Los inmunógenos incluyen cuatro conjugados de péptidos alfa-SN humanos, todos acoplados a anti-IgG de ratón de oveja por medio de un enlace de cistina. Se usa alfa-SN y PBS como controles positivos y negativos, respectivamente. Los títulos se monitorizan como se describió anteriormente, y los ratones se sacrifican al final de los 3-12 meses de inyecciones. Tras la muerte se determina la histoquímica, los niveles de alfa-SN, y el análisis de toxicología.

i. Preparación de inmunógenos

10 Preparación de péptidos alfa-SN acoplados: Los conjugados de péptido alfa-SN H se preparan acoplando a través de una cisteína artificial añadida al péptido alfa-SN mediante el uso del reactivo de entrecruzamiento sulfo-EMCS. Se sintetizan los derivados de los péptidos alfa-SN con las secuencias de aminoácidos finales siguientes. En cada caso, la localización del residuo de cisteína insertado se indica mediante subrayado.

péptido 60-72 de alfa-sinucleína (región NAC):

NH₂-KEQVTNVCGGAVVT-COOH (SEQ ID N°: 54)

péptido 73-84 de alfa-sinucleína (región NAC):

15 NH₂-GVTAVAQKTVECG-COOH (SEQ ID N°: 55)

péptido 102-112 de alfa-sinucleína:

NH₂-C-ácido amino-heptanoico- KNEEGAPCQEG-COOH (SEQ ID N°: 56)

péptido 128-140 de alfa-sinucleína:

Ac-NH-PSEEGYQDYEPEDA-COOH (SEQ ID N°: 57)

20 Para preparar la reacción de acoplamiento, se dializan diez mg de anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante la noche con tampón borato sódico 10 mM, pH 8,5. El anticuerpo dializado se concentra después hasta un volumen de 2 mL mediante el uso de un tubo Amicon Centriprep.

25 Se disuelven diez mg de sulfo-EMCS [N (ε-maleimidocaproiloxi)succinimida] (Molecular Sciences Co.) en un mL de agua desionizada. Se añade un exceso molar de 40 veces de sulfo-EMCS gota a gota con agitación al anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja y después se agita la disolución durante otros diez min. El anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja activado se purifica y se intercambia el tampón haciéndolo pasar a través de una columna de filtración en gel de 10 mL (Pierce Presto Column, obtenida de Pierce Chemicals) equilibrada con NaPO₄ 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpo, identificadas mediante absorbancia a 280 nm, se mezclan y se diluyen hasta una concentración de aproximadamente 1 mg/mL, mediante el uso de 1,4 mg por DO como coeficiente de extinción. Se disuelve un exceso molar de 40 veces de péptido alfa-SN en 20 mL de NaPO₄ 10 mM, pH 8,0, con la excepción de que se disuelven primero 10 mg del péptido alfa-SN en 0,5 mL de DMSO y después se diluye hasta 20 mL con el tampón de NaPO₄ 10 mM. Las disoluciones de péptido se añaden cada una a 10 mL de anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja activado y se agitan a temperatura ambiente durante 4 hr. Los conjugados resultantes se concentran hasta un volumen final de menos de 10 mL mediante el uso de un tubo Amicon Centriprep, y después se dializan con PBS para intercambiar el tampón y eliminar el péptido libre. Los conjugados se hacen pasar a través de filtros de un tamaño de poro de 0,22 μm para la esterilización, y después se alícuotan en fracciones de 1 mg y se almacenan congelados a -20 °C. Las concentraciones de los conjugados se determinan mediante el uso del ensayo de proteínas BCA (Pierce Chemicals) con IgG de caballo para la curva patrón. La conjugación se documenta mediante el incremento del peso molecular de los péptidos conjugados respecto del anticuerpo anti-IgG de ratón de oveja activado.

30
35
40

V. Inmunización pasiva con anticuerpos hacia alfa-sinucleína

Se inyecta a ratones de alfa-SN humana 0,5 mg de anticuerpos monoclonales anti-alfa-SN en PBS como se muestra más adelante. Todas las preparaciones de anticuerpos se purifican para que tengan niveles bajos de endotoxinas. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales contra un fragmento inyectando el fragmento o la forma más larga de alfa-SN en un ratón, preparando hibridomas y cribando los hibridomas en busca del anticuerpo que se une de manera específica a un fragmento deseado de alfa-SN sin unirse a otros fragmentos no solapantes de alfa-SN.

45

Se inyecta ip a los ratones según sea necesario a lo largo de un periodo de 4 meses para mantener una concentración de anticuerpos circulantes medida mediante el título de ELISA mayor de 1:1000 definido mediante ELISA hacia alfa-SN u otro inmunógeno. Los títulos se monitorizan como se describió anteriormente, y los ratones se sacrifican al final de los 6 meses de inyecciones. La histoquímica, los niveles de alfa-SN y la toxicología se llevan a cabo tras la muerte.

50

VI. Inmunización con Aβ de ratones transgénicos Sin/APP

5 Este experimento compara los efectos de la inmunización con A β sobre tres tipos de ratones transgénicos: ratones transgénicos con un transgén de alfa sinucleína (SIN), ratones APP con un transgén de APP (Games *et al.*), y ratones SIN/APP doblemente transgénicos producidos cruzando los transgénicos simples. Los ratones doblemente transgénicos se describen en Masliah *et al.*, PNAS USA 98:12245-12250 (2001). Estos ratones representan un modelo de individuos que tienen tanto la enfermedad de Alzheimer como la enfermedad de Parkinson. La Tabla 2 muestra los diferentes grupos, la edad de los ratones usados en el estudio, el procedimiento de tratamiento y el título de anticuerpos hacia A β . Se puede observar que se generó un título significativo en los tres tipos de ratones. La Fig. 5 muestra el % de área cubierto por placas amiloides de A β en el cerebro determinado mediante el examen de microscopía de los cortes de cerebro de los sujetos tratados. Se acumulan depósitos sustanciales en los ratones APP y SIN/APP, pero no en los ratones SIN o en los controles no transgénicos. Los depósitos son mayores en los ratones doblemente transgénicos SIN/APP. La inmunización con A β 1-42 reduce los depósitos en los ratones APP y SIN/APP. La Fig. 6 muestra los depósitos de sinucleína en los diversos grupos de ratones tal como se detecta mediante microscopía de barrido láser confocal y microscopía óptica. Se acumulan depósitos de sinucleína en los ratones SIN y SIN/APP tratados con CFA solamente. Sin embargo, en los mismos tipos de ratones tratados con A β 1-42 y CFA, existe una reducción notable del nivel de depósito de sinucleína. Estos datos indican que el tratamiento con A β es eficaz no solamente en la eliminación de los depósitos de A β , sino también en la eliminación de los depósitos de sinucleína. Por lo tanto, el tratamiento con A β o anticuerpos hacia él es útil para tratar no solamente la enfermedad de Alzheimer, sino también la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson combinadas, y la enfermedad de Parkinson en pacientes sin la enfermedad de Alzheimer. El título de los anticuerpos anti-A β en los ratones SIN/APP se correlaciona con la formación disminuida de inclusiones de sinucleína ($r=-0,71$, $p<0,01$).

Tabla 2

Grupo	n=	Edad	Tratamiento/Duración	Títulos de Ab
SIN	4	12-20 meses	Ab iny. 50 μ g/inj. durante 6 meses	10.000-58.000
SIN	2	12-20 meses	Sol. sal. iny. durante 6 meses	0
APP	2	12-20 meses	Ab iny. 50 μ g/inj. durante 6 meses	25.000
APP	2	12-20 meses	Sol. sal. iny. durante 6 meses	0
SIN/APP	4	12-20 meses	Ab iny. 50 μ g/inj. durante 6 meses	1.000-50.000
SIN/APP	2	12-20 meses	Sol. sal. iny. durante 6 meses	0

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un agente que induce una respuesta inmunógena contra alfa-sinucleína, para el uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por los cuerpos de Lewy o la agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, en la que el agente es alfa-sinucleína o un fragmento inmunógeno de la misma o un anticuerpo hacia alfa-sinucleína o un fragmento inmunógeno de la misma, y en la que la enfermedad es la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad con cuerpos de Lewy difusos, disautonomía pura, disfagia con cuerpos de Lewy, enfermedad con cuerpos de Lewy incidentales, enfermedad con cuerpos de Lewy hereditaria o atrofia de múltiples sistemas.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en la que la respuesta inmunógena comprende anticuerpos hacia alfa-sinucleína.
3. La composición de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en la que el agente es alfa-sinucleína o un fragmento inmunógeno de alfa-sinucleína, opcionalmente, en la que el fragmento comprende los aminoácidos 35-65 de alfa-sinucleína (SEQ ID N°: 1).
- 15 4. La composición de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en la que el fragmento inmunógeno comprende los aminoácidos 130-140 de alfa-sinucleína (SEQ ID N°: 1) y tiene menos de 40 aminoácidos.
5. La composición de la reivindicación 4, para el uso de la reivindicación 4, en la que el aminoácido C-terminal del fragmento es el aminoácido C-terminal de alfa-sinucleína.
- 20 6. La composición de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en la que la composición es para la administración a un paciente sin síntomas clínicos de una enfermedad caracterizada por los depósitos de amiloide de A β .
7. La composición de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en la que la alfa-sinucleína o el fragmento inmunógeno de alfa-sinucleína se administra con un adyuvante.
8. La composición de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en la que la alfa-sinucleína o el fragmento se une a una molécula portadora para formar un conjugado, opcionalmente en el extremo N-terminal de la alfa-sinucleína o del fragmento.
- 25 9. La composición de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en la que el agente es un anticuerpo hacia alfa-sinucleína o el fragmento inmunógeno de la misma, opcionalmente, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano, preferiblemente del isotipo IgG1 humano.
- 30 10. La composición de la reivindicación 9, para el uso de la reivindicación 9, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
11. La composición de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo se une a un epítipo dentro de los residuos 130-140 de alfa-sinucleína.
- 35 12. La composición de la reivindicación 9, para el uso de la reivindicación 9, en la que el anticuerpo se administra a una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg de anticuerpo/kg de peso corporal, opcionalmente, en dosis múltiples a lo largo de un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses, o en forma de una composición de liberación sostenida.
- 40 13. La composición de la reivindicación 9, para el uso de la reivindicación 9, en la que el anticuerpo se interioriza dentro de las neuronas que tienen cuerpos de Lewy, por lo que se disipan los cuerpos de Lewy, o en la que el anticuerpo se une a la superficie externa de las neuronas que tienen cuerpos de Lewy, por lo que se disipan los cuerpos de Lewy.
14. La composición de cualquier reivindicación precedente, para el uso de esa reivindicación, en la que la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.
15. La composición de cualquier reivindicación precedente, para el uso de esa reivindicación, en la que el paciente no tiene la enfermedad de Alzheimer y no tiene factores de riesgo de la misma.
- 45 16. La composición de cualquier reivindicación precedente, para el uso de esa reivindicación, en la que la composición se administra de manera periférica.
17. Un método de cribado de un agente para determinar si el agente tiene una actividad útil en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por los cuerpos de Lewy, que comprende:
 - 50 poner en contacto el agente con un animal transgénico no humano predispuesto a desarrollar una característica de una enfermedad por cuerpos de Lewy;

determinar si el agente afecta al grado o la velocidad de desarrollo de la característica respecto de un animal transgénico no humano de control;

5 en el que el agente es un fragmento inmunógeno de alfa-sinucleína o un anticuerpo hacia alfa-sinucleína, y en el que la enfermedad es la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad con cuerpos de Lewy difusos, disautonomía pura, disfagia con cuerpos de Lewy, enfermedad con cuerpos de Lewy incidentales, enfermedad con cuerpos de Lewy hereditaria o atrofia de múltiples sistemas.

18. El método de la reivindicación 17, en el que el animal transgénico no humano comprende un transgén que expresa la alfa-sinucleína, y opcionalmente un transgén que expresa la proteína precursora de amiloide.

Residuo nº 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
(SEQ ID N°:1) MDVFMKGLSKAKKEGVVAAAEKTKQGVAAEAGKTKEGVLVYVGSKTKEGVVHGVATVAAE

Residuo nº 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110
(SEQ ID N°:1) KTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQE

(SEQ ID N°:2) EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVGAGSIAAATGFV (residuos 61-95)

(SEQ ID N°:3) KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVGAGS (residuos 60-87)

Residuo nº 115 120 125 130 135 140
(SEQ ID N°:1) GILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (residuos 1-140)

Fig. 1

La inmunización con α -sinucleína reduce la formación de inclusiones de SIN (+)

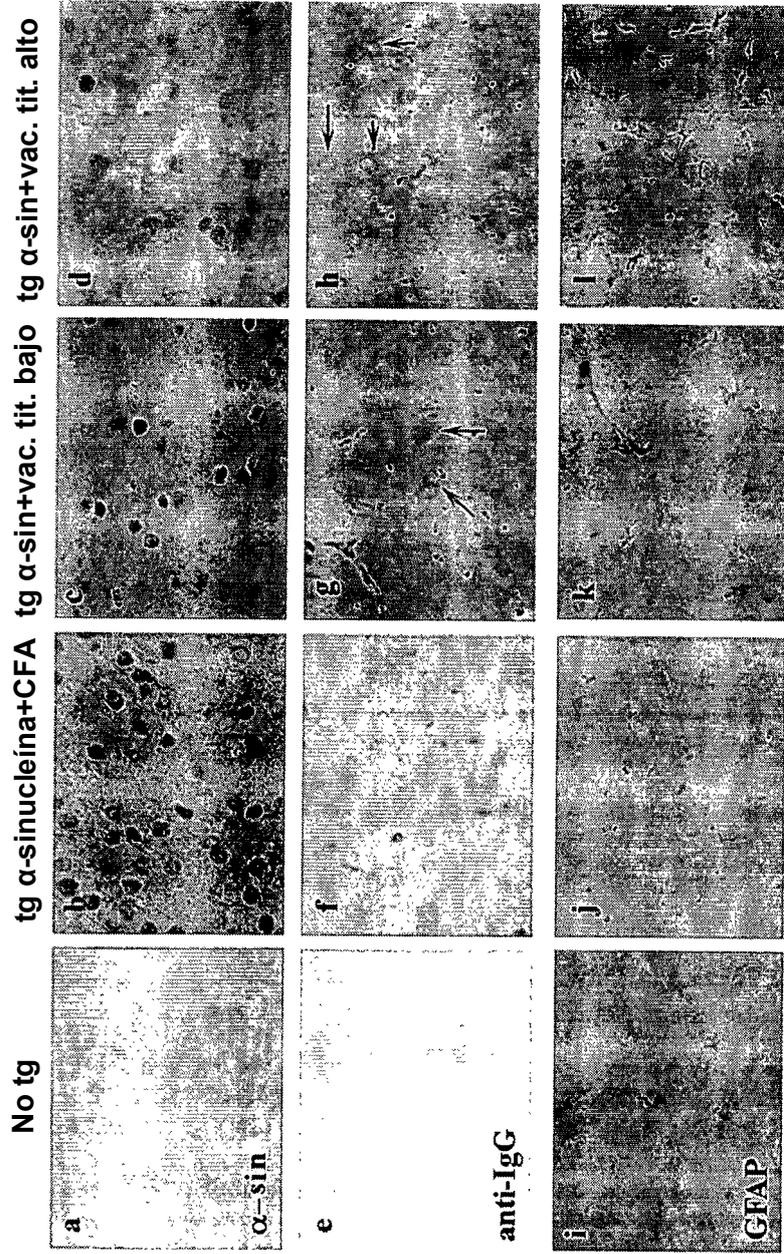


Fig. 2

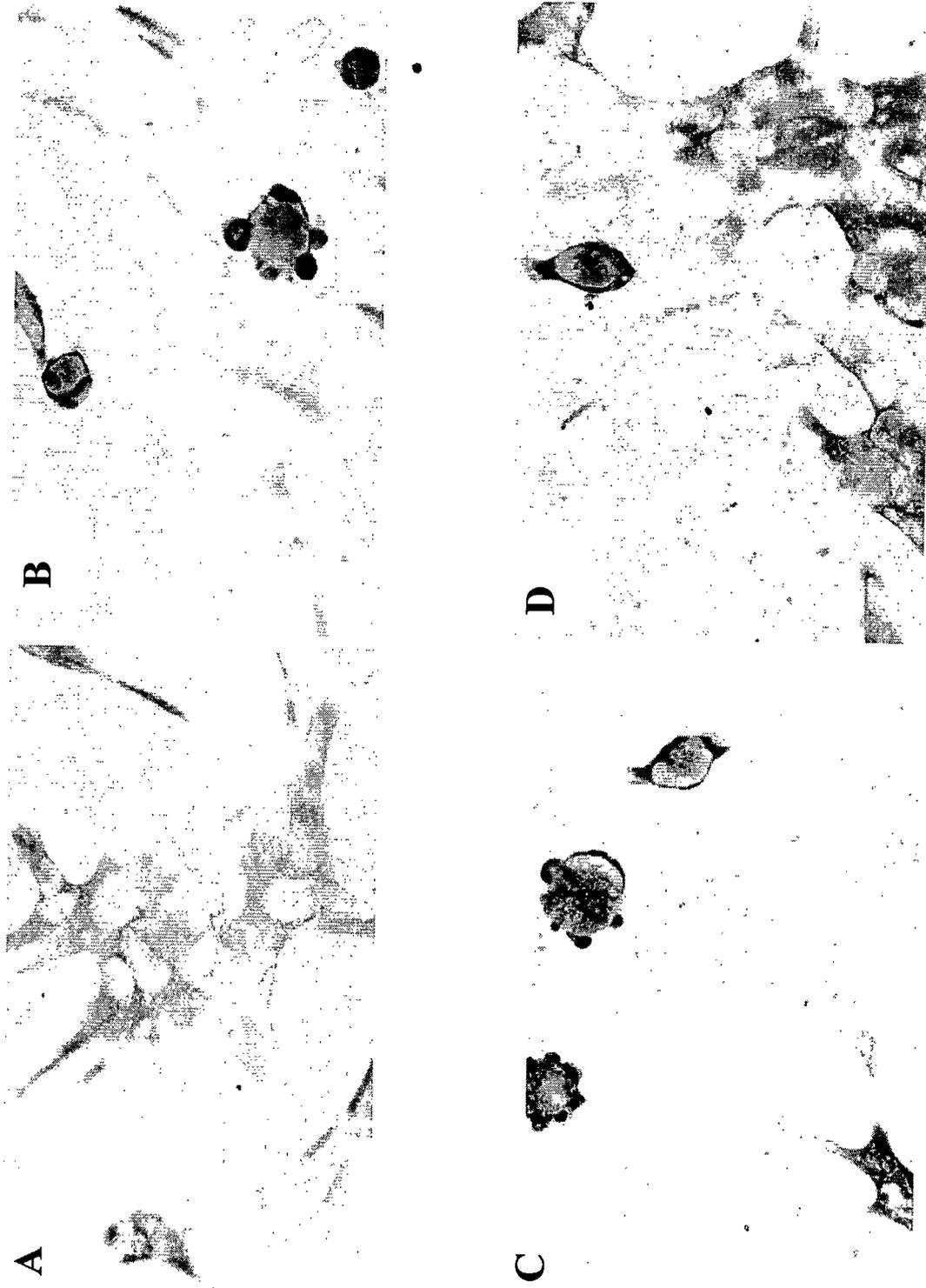
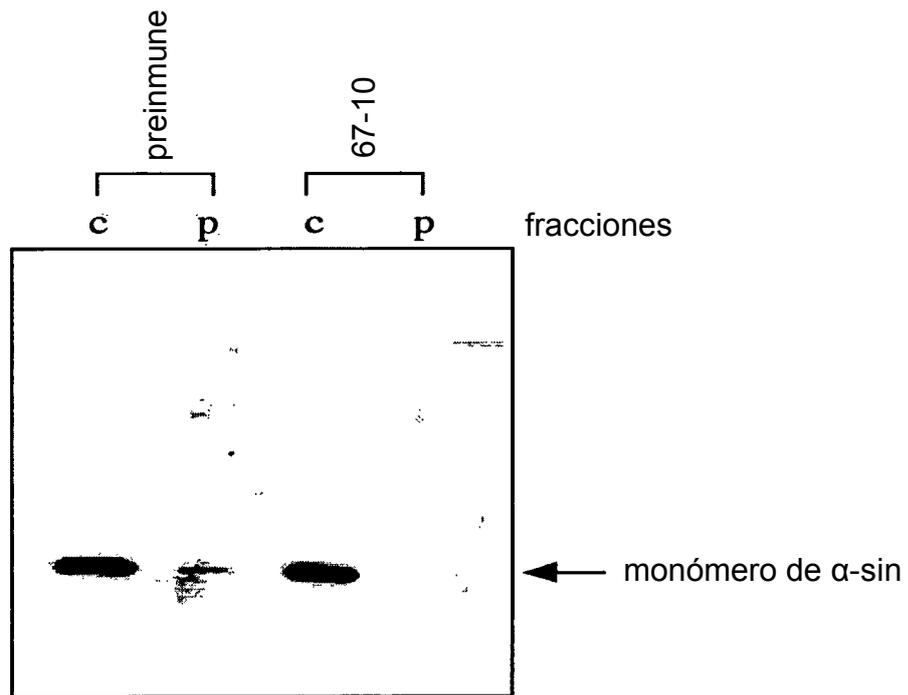


Fig. 3



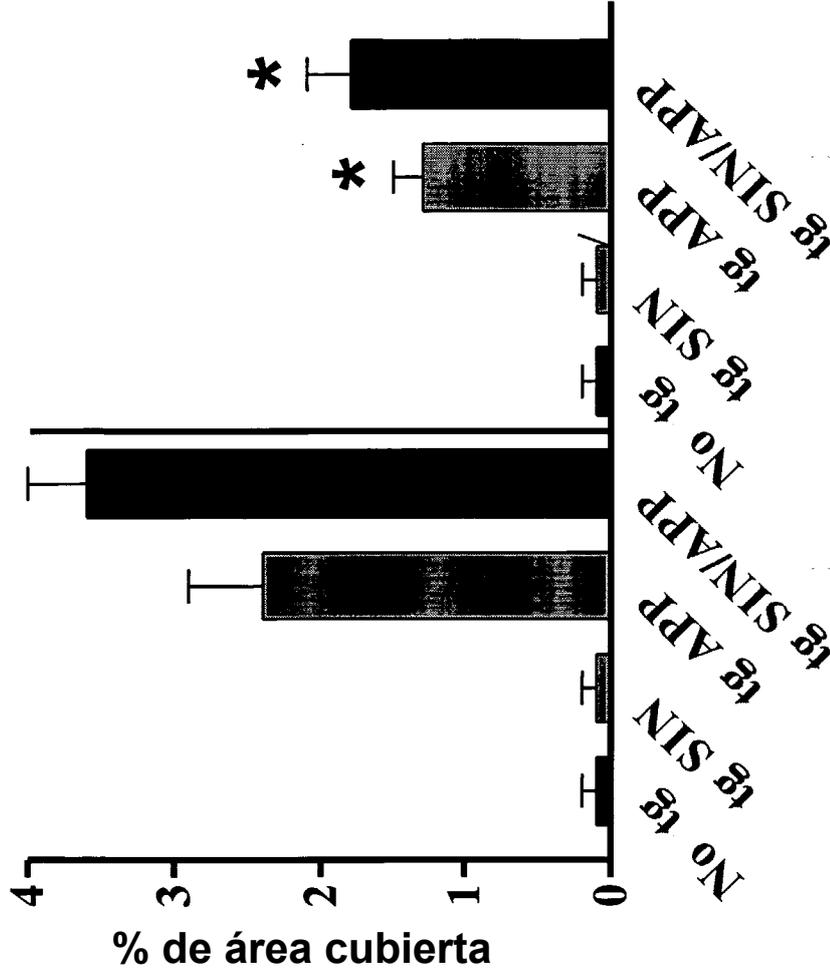
Las células GT1-7 que sobreexpresan α -sin se incubaron con suero anti- α -sin de ratón o suero preimmune (1:50) durante 48 h.

-Resultado-

1. La proliferación celular se inhibió ligeramente en las células tratadas con suero (67-10) anti- α -sin de ratón en comparación con las células tratadas con el suero preimmune (no mostrado).
2. En las células tratadas con suero anti- α -sin de ratón, la inmunorreactividad de α -sin disminuyó en la fracción particulada.

Fig. 4

Proteína β -amiloide



A β 1-42

CFA

Fig. 5

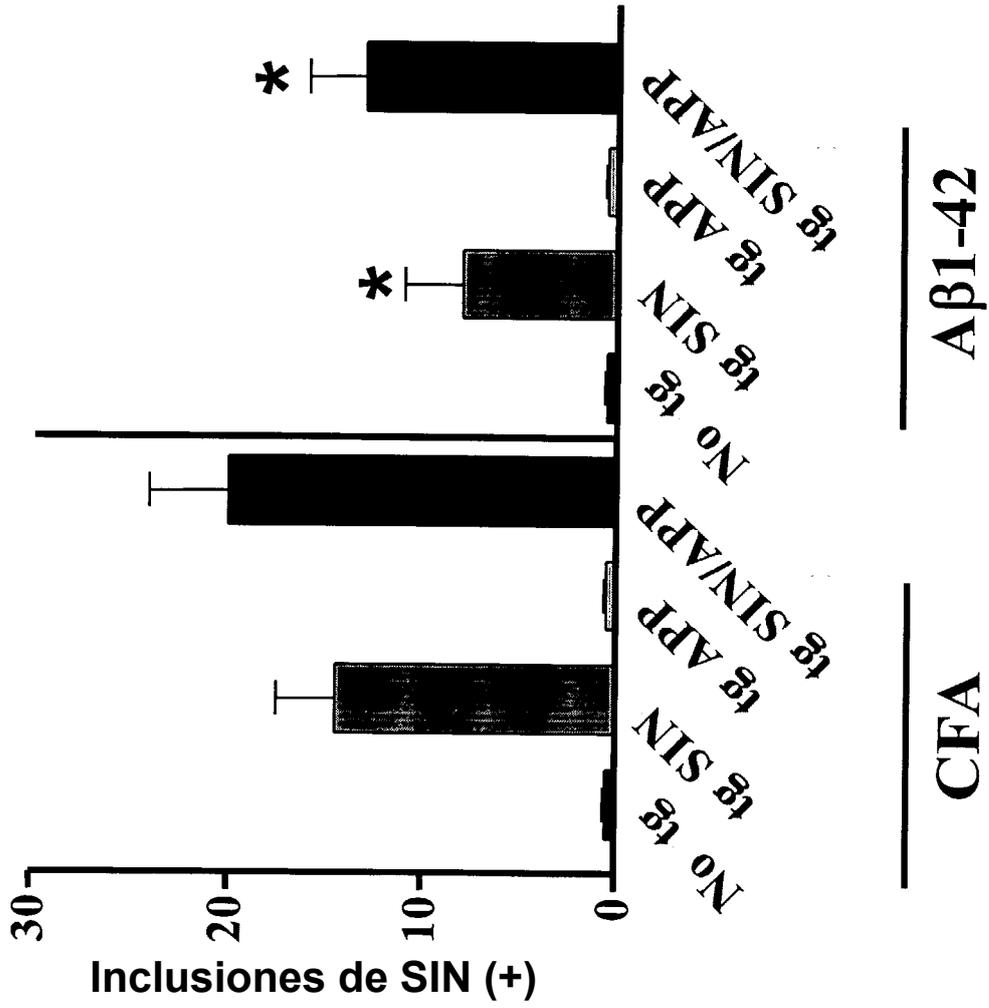


Fig. 6

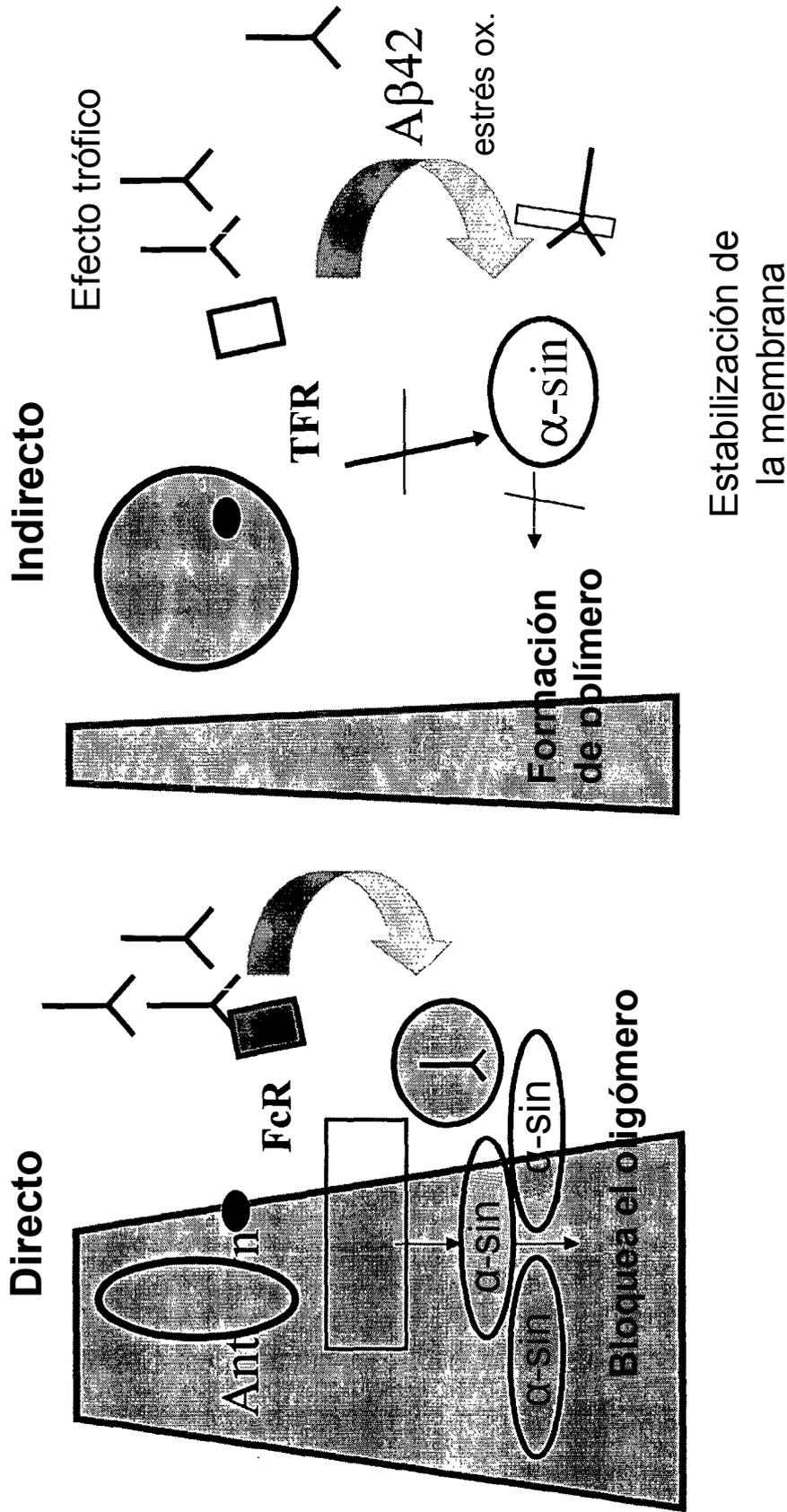


Fig. 7