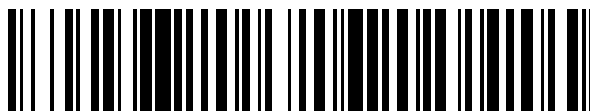


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 182**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2008 E 12188562 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2583978**

54 Título: **Prevención y tratamiento de la enfermedad sinucleinopática y amiloidogénica**

30 Prioridad:

**23.02.2007 US 710248**

**06.04.2007 US 697646**

**01.11.2007 US 984721 P**

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

**17.05.2016**

73 Titular/es:

**PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (50.0%)  
Adelphi Plaza, Upper George's Street  
Dun Laoghaire, Co. Dublin, IE y  
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
CALIFORNIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHENK, DALE B.;  
MASLIAH, ELIEZER;  
BUTTINI, MANUEL J.;  
CHILCOTE, TAMIE J.;  
ROCKENSTEIN, EDWARD y  
GAMES, KATE DORA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 570 182 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 la enfermedad sinucleinopática y amiloidogénica

**Antecedentes de la invención**

La patología cerebral de la alfa-sinucleína (alfa-SN) es una característica conspicua de varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Parkinson (PD; del inglés, *Parkinson's disease*), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB; del inglés, *dementia with Lewy bodies*), la variante de la enfermedad de Alzheimer con cuerpos de Lewy (LBVAD; del inglés, *Lewy body variant of Alzheimer's disease*), la atrofia multisistémica (MSA; del inglés, *multiple systems atrophy*) y la neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo 1 (NBIA-1; del inglés, *neurodegeneration with brain iron accumulation type-1*). Son comunes a todas estas enfermedades, denominadas sinucleinopatías, las inclusiones proteicas insolubles en las neuronas y la glía que están esencialmente compuestas de alfa-SN.

Los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy son inclusiones intraneuronales que están esencialmente compuestas de alfa-SN. Los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewis son los distintivos neuropatológicos de la enfermedad de Parkinson (PD). A la PD y otras enfermedades sinucleinopáticas se hace colectivamente referencia como enfermedad de cuerpos de Lewy (LBD; del inglés, *Lewy body disease*). La LBD se caracteriza por degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deterioro cognitivo y formación de cuerpos de Lewy (LBs) (McKeith et al., *Clinical and pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the CDLB International Workshop*, *Neurology* (1996) 47: 1113-24). Otras LBDs incluyen la enfermedad de cuerpos de Lewy difusos (DLBD; del inglés, *diffuse Lewy body disease*), la variante de la enfermedad de Alzheimer con cuerpos de Lewy (LBVAD), la PD y la enfermedad de Alzheimer (AD; del inglés, *Alzheimer's disease*) combinadas, y la atrofia multisistémica. La demencia con cuerpos de Lewy (DLB) es una expresión acuñada para conciliar diferencias en la terminología de las LBDs.

Los trastornos con LBs continúan siendo una causa común de trastornos del movimiento y de deterioro cognitivo en la población en envejecimiento (Galasko et al., *Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias*, *Arch. Neurol.* (1994) 51: 888-95). Aunque su incidencia continúa aumentando, creándose un grave problema de salud pública, hasta la fecha estos trastornos no son curables ni evitables, y el conocimiento de las causas y la patogénesis de la PD es un elemento crítico para el desarrollo de nuevos tratamientos (Tanner et al., *Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes*, *Curr. Opin. Neurol.* (2000) 13: 427-30). La causa de la PD es controvertida, y se han propuesto múltiples factores que desempeñan un papel, incluyendo diversas neurotoxinas y factores de susceptibilidad genética.

En los últimos años han surgido nuevas esperanzas en cuanto a la comprensión de la patogénesis de la PD. Específicamente, diversos estudios han mostrado que la proteína sináptica alfa-SN desempeña un papel crucial en la patogénesis de la PD ya 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) mutaciones en el gen de alfa-SN cosegregan con formas familiares raras 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) remeda diversos aspectos patológicos de la PD. De este modo, el hecho de que la acumulación de alfa-SN en el cerebro esté asociada con alteraciones morfológicas y neurológicas similares en especies tan diversas como seres humanos, ratones y moscas sugiere que esta molécula contribuye al desarrollo de la PD.

Un fragmento de alfa-SN, del que previamente se determinó que era un componente de las placas de amiloide de la AD, fue denominado componente no beta-amiloide (non-Aβ) (NAC; del inglés, *non-amyloid-beta component*) del amiloide de la AD (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: 11.282-6). Aunque no se conoce la función exacta del NAC, puede desempeñar un papel crítico en procesos sinápticos, tales como la plasticidad neural durante el desarrollo y el aprendizaje y la degeneración de terminales nerviosos bajo estados patológicos en la LBD, AD y otras enfermedades (Hasimoto et al., *Alpha-Synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease*, *Brain Pathol.* (1999) 9: 707-20; Masliah, et al., (2000).

La AD, la PD y la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) son los trastornos neurodegenerativos más comúnmente hallados en las personas mayores. Aunque su incidencia continúa creciendo, creándose un grave problema de salud pública, hasta la fecha estos trastornos no son curables ni evitables. Recientes estudios epidemiológicos han demostrado una estrecha relación clínica entre AD y PD, ya que aproximadamente el 30% de los pacientes con enfermedad de Alzheimer también presentan PD. De este modo, es más probable que, en comparación con el resto de la población en envejecimiento, los pacientes con AD desarrollen una PD concomitante. Además, los pacientes con PD que se vuelven dementes han desarrollado normalmente una AD clásica. Aunque parece que cada enfermedad neurodegenerativa presenta una predilección por regiones cerebrales y poblaciones celulares específicas, dando lugar a distintas características patológicas, la PD, la AD, la DLB y la LBD también comparten distintivos patológicos comunes. Los pacientes con AD familiar, síndrome de Down o AD esporádica desarrollan LBs en la amígdala cerebral, que son los distintivos neuropatológicos clásicos de la PD. Además, cada enfermedad está

asociada con la degeneración de neuronas, conexiones sinápticas interneuronales y, finalmente, muerte celular, el agotamiento de neurotransmisores y la acumulación anormal de proteínas mal plegadas, cuyos precursores participan en la función normal del sistema nervioso central. Estudios bioquímicos han confirmado el vínculo entre AD, PD y DLB.

5 Las placas neuríticas, que son el distintivo patológico clásico de la AD, contienen péptido beta-amiloide (A $\beta$ ) y péptido componente no beta-amiloide (NAC). El A $\beta$  procede de una proteína precursora más grande denominada proteína precursora de amiloide (APP; del inglés, *amyloid precursor protein*). El NAC procede de una proteína precursora más grande denominada componente no beta-amiloide de la APP, al que ahora se hace más comúnmente referencia como alfa-SN. El NAC comprende los restos de aminoácido 60-87 o 61-95 de la alfa-SN. 10 Tanto el A $\beta$  como el NAC fueron identificados por vez primera en placas de amiloide como fragmentos proteolíticos de sus respectivas proteínas de longitud completa, para las cuales se identificaron y clonaron los cDNAs de longitud completa.

La alfa-SN es parte de una gran familia de proteínas que incluye beta-y gamma-sinucleína y sinorretina. La alfa-SN se expresa en el estado normal asociado con sinapsis y se cree que desempeña un papel en la plasticidad neural, el aprendizaje y la memoria. Se han identificado mutaciones (Ala30Pro y Ala53Thr) en la alfa-SN humana (h) que potencian la agregación de alfa-SN, mutaciones que están asociadas con formas raras de formas dominantes autosómicas de PD. Se desconoce el mecanismo por el cual estas mutaciones aumentan la propensión de la alfa-SN a agregarse. 15

A pesar del hecho de que se pueden hallar diversas 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 con una acumulación anormal de A $\beta$  y alfa-SN, respectivamente. Sin embargo, se desconocen las razones para la sobreacumulación de estas proteínas. El A $\beta$  es secretado por neuronas y se acumula en placas de amiloide extracelulares. Además, se puede detectar A $\beta$  dentro de neuronas. La alfa-SN se acumula en inclusiones intraneuronales llamadas LBs. Aunque las dos proteínas se encuentran típicamente juntas en placas neuríticas extracelulares en la AD, también se encuentran ocasionalmente juntas en inclusiones intracelulares. 20 25

No están claros los mecanismos por los cuales la acumulación de alfa-SN conduce a neurodegeneración y a los característicos síntomas de la PD. Sin embargo, identificar el papel de factores que promueven y/o bloquean la agregación de alfa-SN es crítico para la comprensión de la patogénesis de la LBD y el desarrollo de nuevos tratamientos para sus trastornos asociados. La investigación para identificar tratamientos ha sido dirigida hacia la búsqueda de compuestos que reduzcan la agregación de alfa-SN (Hashimoto et al.) o el análisis de factores de crecimiento que promuevan la regeneración y/o la supervivencia de neuronas dopaminérgicas, que son las células esencialmente 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). Recientes estudios en un modelo de ratón transgénico de AD han mostrado que anticuerpos contra A $\beta$  1-42 facilitan y estimulan la eliminación de amiloide del cerebro, mejoran la patología de tipo AD y dan lugar a una mejora de la función cognitiva (Schenk et al., *Immunization with amyloid- $\beta$  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). 30 35 40

Sorprendentemente, dada la naturaleza intracelular de los LBs en tejido cerebral, los inventores han tenido éxito en cuanto a reducir el número de inclusiones en ratones transgénicos inmunizados con sinucleína. La presente descripción se dirige, *inter alia*, al tratamiento de la PD y otras enfermedades asociadas con LBs mediante la administración de sinucleína, fragmentos de sinucleína, antígenos que remedan sinucleína o fragmentos de los mismos, o anticuerpos hacia ciertos epítomos de sinucleína a un paciente bajo condiciones que generan una respuesta inmune beneficiosa en el paciente. Los inventores han tenido también sorprendentemente éxito a la hora de reducir el número de inclusiones en ratones transgénicos inmunizados con A $\beta$ . La presente descripción se dirige, *inter alia*, al tratamiento de la PD y otras enfermedades asociadas con LBs mediante la administración de A $\beta$ , fragmentos de A $\beta$ , antígenos que remedan A $\beta$  o fragmentos de los mismos, o anticuerpos hacia ciertos epítomos de A $\beta$  a un paciente bajo condiciones que generan una respuesta inmune beneficiosa en el paciente. La invención satisface la antigua necesidad de regímenes terapéuticos para prevenir o mejorar la neuropatología y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado con la PD y otras enfermedades asociadas con LBs. En los Documentos WO 2007/012061 y WO 2005/047860 se describen fragmentos de alfa-sinucleína y su uso con fines terapéuticos o diagnósticos. 45 50

Esta solicitud está relacionada con la Solicitud de EE.UU. n.º 11/710.248, presentada el 23 de febrero de 2006, la Solicitud de EE.UU. n.º 11/660.015, presentada el 9 de febrero de 2006, la Publicación PCT n.º WO/2006/02058, presentada el 9 de agosto de 2005, las Solicitudes de Patente de EE.UU. números 11/185.907, presentada el 19 de julio de 2005, y 10/915.214, presentada el 9 de agosto de 2004, las Patentes de EE.UU. números 6.787.523 y 6.923.964, las Solicitudes de Patente de EE.UU. números 60/423012, 10/699517 y 10/698099, y la Solicitud PCT n.º PCT/US03/34527. 55 60

**Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal 1H7 anti-sinucleína, o 1H7 humanizado o quimérico, en donde el anticuerpo 1H7 es producido por el hibridoma JH17.1H7.4.24.34, depositado como número de acceso PTA-8220 de la ATCC. La invención también proporciona usos terapéuticos, como se definen en la Reivindicación 5.

5 La invención también proporciona un método para humanizar el anticuerpo monoclonal 1H7 producido por el hibridoma depositado como número de acceso PTA-8220 de la ATCC, método que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de regiones CDR del anticuerpo monoclonal; seleccionar un anticuerpo aceptor; y producir un anticuerpo humanizado que comprende las CDRs del anticuerpo monoclonal y armazones de región variable del anticuerpo aceptor.

10 La invención también proporciona un método para producir una forma quimérica del anticuerpo monoclonal 1H7 producido por el hibridoma depositado como número de acceso PTA-8220 de la ATCC, método que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal; seleccionar la región constante de las cadenas pesada y ligera; y producir un anticuerpo quimérico que comprenda una cadena ligera que comprende la región variable de cadena ligera fusionada con la región constante de cadena ligera, y una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada fusionada con la región constante de cadena pesada.

La invención también proporciona una célula del hibridoma JH17.1H7.4.24.34, depositado como número de acceso PTA-8220 de la ATCC.

20 En un aspecto, la descripción proporciona métodos para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro. Dichos métodos acarrearán inducir una respuesta inmunogénica contra alfa-SN. Dicha inducción puede ser llevada a cabo mediante la administración activa de un inmunógeno o pasivamente mediante la administración de un anticuerpo o un derivado de un anticuerpo hacia sinucleína. En algunos métodos, el paciente es asintomático. En algunos métodos, el paciente tiene la enfermedad y es asintomático. En algunos métodos, el paciente presenta un factor de riesgo para la enfermedad y es asintomático. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson y la administración del agente mejora características motoras del paciente. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson y la administración del agente previene el deterioro de características motores del paciente. En algunos métodos, el paciente está exento de la enfermedad de Alzheimer.

30 Para el tratamiento de pacientes que padecen cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro, un régimen de tratamiento acarrea administrar una dosis de alfa-SN o un fragmento activo de la misma al paciente para inducir la respuesta inmune. En algunos métodos, se administra la alfa-SN o un fragmento activo de la misma en múltiples dosis a lo largo de un periodo de al menos seis meses. La alfa-SN o un fragmento activo de la misma se pueden administrar, por ejemplo, periférica, intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosamente. En algunos métodos, se administra la alfa-SN o un fragmento activo de la misma con un agente adyuvante que potencia la respuesta inmune hacia la alfa-SN o un fragmento activo de la misma. En algunos métodos, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos hacia alfa-SN o un fragmento activo de la misma.

40 En algunos métodos, el agente es los aminoácidos 35-65 de alfa-SN. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 130-140 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos en total, o menos de 30 aminoácidos en total. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 130-136 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos en total, o menos de 30 aminoácidos en total. En algunos métodos, los aminoácidos C-terminales del agente son los aminoácidos C-terminales de alfa-SN. En algunos de los métodos anteriores, la alfa-SN o un fragmento activo están unidos a un portador por el extremo N de la alfa-SN o el fragmento activo.

45 En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 91-99 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos en total, o menos de 30 aminoácidos en total. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 118-126 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos en total, o menos de 30 aminoácidos en total. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 1-10 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos en total, o menos de 30 aminoácidos en total. En algunos métodos, los aminoácidos N-terminales del agente son los aminoácidos N-terminales de alfa-SN. En algunos de los métodos anteriores, la alfa-SN o un fragmento activo están unidos a un portador por el extremo C de alfa-SN o el fragmento activo. En algunos de los métodos anteriores, la alfa-SN o un fragmento activo están unidos a una molécula portadora para formar un producto de conjugación.

50 En algunos métodos, el agente se administra a un paciente administrando un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un fragmento de alfa-SN.

55 Para el tratamiento de pacientes que padecen cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro, un régimen de tratamiento acarrea administrar una dosis de un anticuerpo hacia alfa-SN o un fragmento activo del mismo al paciente para inducir la respuesta inmune. El anticuerpo utilizado puede ser humano, humanizado, quimérico o policlonal y puede ser monoclonal o policlonal. En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es una IgG1 humana. En algunos métodos, el anticuerpo se prepara a partir de un ser humano inmunizado con péptido de alfa-SN, y el ser

humano puede ser el paciente que se va a tratar con el anticuerpo. En algunos métodos, el anticuerpo se une a la superficie exterior de células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipándose por ello los cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el anticuerpo se internaliza en células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipándose por ello los cuerpos de Lewy.

5 En algunos métodos, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica. En algunos métodos, el anticuerpo se administra en una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferiblemente de al menos 1 mg de anticuerpo/kg de peso corporal. En algunos métodos, el anticuerpo se administra en dosis múltiples a lo largo de un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. En algunos métodos, se pueden administrar anticuerpos como una composición de liberación ininterrumpida. El anticuerpo puede ser administrado, por ejemplo, periférica, intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosamente. En algunos métodos, el paciente es controlado en cuanto al nivel de anticuerpo administrado en su sangre.

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

15 Esta invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden cualesquiera de los anticuerpos hacia alfa-SN descritos en esta solicitud y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro, que comprende administrar un agente que induce una respuesta inmunogénica contra alfa-SN y que comprende además administrar al paciente un segundo agente que induce una respuesta inmunogénica contra Aβ. En algunos métodos, el agente es Aβ o un fragmento activo del mismo. En algunos métodos, el agente es un anticuerpo contra Aβ.

25 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro, que comprende administrar a un paciente un agente que induce una respuesta inmunogénica contra Aβ. En algunos métodos, el agente es Aβ o un fragmento activo del mismo. En algunos métodos, el agente es un anticuerpo contra Aβ. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, el paciente está exento de enfermedad de Alzheimer y no presenta factores de riesgo para la misma. En algunos métodos, comprende además controlar un indicio o síntoma de enfermedad de Parkinson en el paciente. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson y la administración del agente da lugar a una mejora en un indicio o síntoma de la enfermedad de Parkinson.

30 Se proporcionan además composiciones farmacéuticas que comprenden un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica contra un componente de un cuerpo de Lewy en un paciente, tal como se describió anteriormente, y un agente adyuvante farmacéuticamente aceptable. En algunos compuestos, el agente es alfa-SN o un fragmento activo, por ejemplo, NAC, o cualquiera de los fragmentos descritos en la solicitud. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo específico para un componente de un cuerpo de Lewy.

35 También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un agente eficaz para provocar una respuesta inmune contra un componente de sinucleína-NAC de una placa de amiloide en un paciente. En algunos compuestos, el agente es alfa-SN o un fragmento activo, por ejemplo, NAC, o cualquiera de los fragmentos de alfa-sinucleína descritos en la solicitud, y, opcionalmente, un agente adyuvante. En otros compuestos, el agente es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a alfa-SN o un fragmento de la misma, y, opcionalmente, un vehículo farmacéutico.

40 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para explorar un anticuerpo en cuanto a su actividad para prevenir o tratar una enfermedad asociada con cuerpos de Lewy. Dichos métodos acarrear poner una célula neuronal que expresa sinucleína en contacto con el anticuerpo. Luego se determina si la puesta en contacto reduce los depósitos de sinucleína en las células en comparación con unas células testigo que no han entrado en contacto con el anticuerpo.

45 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para explorar un anticuerpo en cuanto a su actividad para tratar o prevenir una enfermedad de cuerpos de Lewy en el cerebro de un paciente. Dichos métodos acarrear poner el anticuerpo en contacto con un polipéptido que comprende al menos cinco aminoácidos contiguos de alfa-SN. Luego se determina si el anticuerpo se une específicamente al polipéptido, proporcionando la unión específica una indicación de que el anticuerpo presenta actividad para tratar la enfermedad.

50 Se proporcionan además métodos para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. El método comprende administrar, a un paciente que tiene la enfermedad o presenta riesgo de tenerla, un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de

acuerdo con la ID. SEC. nº 1, efectuándose de este modo la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad.

Opcionalmente, el fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína está exento de los restos 1-69 de la alfa-sinucleína, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa-sinucleína humana dentro de un epítipo seleccionado del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128 y SN124-140, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica está exenta de anticuerpos que se unen específicamente a restos de la alfa-sinucleína humana situados fuera del epítipo seleccionado. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene 5-20, 5-25 o 5-30 aminoácidos contiguos entre las posiciones 70-140 de la alfa-sinucleína, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene 5-20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 120-140 de la alfa-sinucleína, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN87-97, SN111-121, SN114-124 y SN128-136, y contiene no más de 40 o no más de 30 restos contiguos en total de alfa-sinucleína, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN124-134, SN91-99 y SN118-126 y contiene no más de 40 o no más de 30 restos contiguos en total de alfa-sinucleína, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende SN125-140 y contiene no más de 40 o no más de 30 restos contiguos en total de alfa-sinucleína, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende SN130-140 y contiene no más de 40 o no más de 30 restos contiguos en total de alfa-sinucleína, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende SN83-140, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.

Opcionalmente, el fragmento inmunogénico es seleccionado del grupo que consiste en SN124-140, SN125-140, SN126-140, SN127-140, SN128-140, SN129-140, SN130-140, SN131-140, SN132-140, SN133-140, SN134-140, SN135-140, SN136-140, SN137-140, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN129-139, SN130-139, SN131-139, SN132-139, SN133-139, SN134-139, SN135-139, SN136-139, SN137-139, SN124-138, SN124-138, SN125-138, SN126-138, SN127-138, SN128-138, SN129-138, SN130-138, SN131-138, SN132-138, SN133-138, SN134-138, SN135-138, SN136-138, SN124-137, SN125-137, SN126-137, SN127-137, SN128-137, SN129-137, SN130-137, SN131-137, SN132-137, SN133-137, SN134-137, SN135-137, SN124-136, SN125-136, SN126-136, SN127-136, SN128-136, SN129-136, SN130-136, SN131-136, SN132-136, SN133-136 y SN134-136, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.

Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa-sinucleína humana dentro de un epítipo seleccionado del grupo que consiste en SN1-20, SN2-21, SN2-23 y SN1-40, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica está exenta de anticuerpos que se unen específicamente a restos de alfa-sinucleína humana dentro de la región SN25-69, SN25-140, SN40-69, SN40-140 o SN70-140. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene 5-20, 5-25 o 5-30 aminoácidos contiguos entre las posiciones 1-40 de la alfa-sinucleína, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.

Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene 5-20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 1 y 20 y 5-20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 120 y 140 de la alfa-sinucleína, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico contiene no más de 40 o no más de 30 restos contiguos en total de alfa-sinucleína, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.

Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa-sinucleína humana dentro de un epítipo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y dentro de un epítipo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa-sinucleína humana dentro de un epítipo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y dentro de un epítipo dentro de los restos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica no comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa-sinucleína humana dentro de un epítipo dentro de los restos 41 y 119 de la alfa-sinucleína humana.

Opcionalmente, el fragmento inmunogénico está unido a un portador para formar un producto de conjugación. Opcionalmente, el polipéptido comprende el fragmento inmunogénico fusionado con el portador. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico está unido a la molécula portadora por el extremo C del fragmento de alfa-sinucleína. Opcionalmente, múltiples copias del fragmento están entrelazadas con múltiples copias del portador. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico se administra con un agente adyuvante. Opcionalmente, la operación de administración efectúa una supresión al menos parcial de cuerpos de Lewy. Opcionalmente, la operación de administración desagrega cuerpos de Lewy. Opcionalmente, la operación de administración reduce los niveles de oligómeros de alfa-sinucleína en sinapsis. Opcionalmente, la operación de administración suprime sinucleína por activación de una ruta lisosómica.

Opcionalmente, la respuesta inmunogénica es inducida por administración de un único polipéptido o proteína de fusión. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica es inducida por la administración de más de un polipéptido (por

ejemplo, dos polipéptidos). Opcionalmente, la respuesta inmunogénica es inducida por la administración de un primer polipéptido que comprende un primer fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20 de alfa-sinucleína humana, y la administración de un polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140, y preferiblemente los restos 120-140, de alfa-sinucleína humana.

Opcionalmente, la respuesta inmunogénica es inducida por administración de dos o más polipéptidos en combinación. Opcionalmente, los dos o más polipéptidos son conjuntamente administrados y/o conjuntamente formulados.

En otro aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un primer polipéptido que comprende un primer fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína y un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína, en donde el primer fragmento inmunogénico es eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y el segundo fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína es eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, la composición está exenta de un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína que comprende los restos 25-69 de alfa-sinucleína. Los fragmentos inmunogénicos primero y segundo pueden estar físicamente unidos (por ejemplo, como un producto de conjugación o una proteína de fusión). Los fragmentos inmunogénicos primero y segundo pueden ser conjuntamente formulados.

La descripción proporciona además métodos para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. En una realización, los métodos comprenden administrar, a un paciente que tiene la enfermedad o presenta riesgo de desarrollar la enfermedad, un régimen eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, cuando el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 83-140 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente dentro de un epítipo dentro de un segmento de la alfa-sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128, SN118-126, SN91-99, SN124-134 y SN124-140, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.

En otra realización, los métodos comprenden administrar, a un paciente que tiene la enfermedad o presenta riesgo de desarrollarla, un régimen eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-40 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, cuando el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-40 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20 o dentro de los restos 1-10, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.

En aún otra realización, los métodos comprenden administrar, a un paciente que tiene la enfermedad o presenta riesgo de desarrollarla, un régimen eficaz de un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-40 de la alfa-sinucleína humana y un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.

Opcionalmente, cuando un primer anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-40 de la alfa-sinucleína humana y un segundo anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, el segundo anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se administran simultáneamente. Opcionalmente, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se administran en el mismo curso de tratamiento.

Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Opcionalmente, el anticuerpo es una población policlonal de anticuerpos que carecen de unión específica a restos de alfa-sinucleína situados fuera del epítipo. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG1 humana. Opcionalmente, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica. Opcionalmente, el anticuerpo se administra en una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferiblemente de al menos 1 mg de anticuerpo/kg de peso corporal. Opcionalmente, el anticuerpo se administra en múltiples dosis a lo largo de al menos seis meses. Opcionalmente, el anticuerpo se administra como una composición de liberación ininterrumpida. Opcionalmente, el anticuerpo se administra intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosamente. Opcionalmente, el anticuerpo se internaliza en células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipándose por ello los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, el anticuerpo se une a la superficie externa de células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipándose por ello los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, el anticuerpo se une a alfa-sinucleína

- 5 en la superficie externa de células neuronales que promueven el entrecruzamiento de la alfa-sinucleína, en donde la operación de administración desagrega cuerpos de Lewy. Opcionalmente, la operación de administración reduce los niveles de oligómeros de alfa-sinucleína humana en sinapsis. Opcionalmente, la operación de administración suprime alfa-sinucleína humana por activación de una ruta lisosómica. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a alfa-sinucleína humana desnaturalizada, según se determina por inmunotransferencia. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a alfa-sinucleína humana desnaturalizada con una afinidad de al menos  $10^9 M^{-1}$ . Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a sinapsis, según se determina por inmunocitoquímica.
- 10 La descripción también proporciona una composición para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, que comprende un primer anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y un segundo anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140 (y preferiblemente los restos 120-140) de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.
- 15 La descripción también proporciona un kit para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, que comprende un primer recipiente que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y un segundo recipiente que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140 (y preferiblemente los restos 120-140) de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.
- 20 La descripción proporciona además métodos para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. Los métodos comprenden administrar, a un paciente que padece la enfermedad o presenta riesgo de desarrollarla, un régimen eficaz de un agente que induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, efectuándose por ello la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica está exenta de anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-69 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente dentro de un segmento de la alfa-sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128, SN118-126, SN91-99, SN124-134 y SN124-140, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.
- 25 La descripción proporciona además métodos de exploración para un agente que tenga actividad útil en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy. Los métodos comprenden poner el agente en contacto con un animal transgénico no humano predispuesto a desarrollar una característica de una enfermedad de cuerpos de Lewy; y determinar si el agente afecta al grado o la velocidad de desarrollo de la característica con respecto a un animal transgénico no humano testigo. El agente es (i) un fragmento de alfa-sinucleína que induce anticuerpos que se unen específicamente a al menos un epítipo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana o (ii) un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo con los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1.
- 30 Opcionalmente, el animal transgénico no humano comprende un transgén que expresa alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, el método comprende además explorar una pluralidad de anticuerpos de ensayo en cuanto a la unión a alfa-sinucleína humana desnaturalizada y seleccionar como agente el anticuerpo de máxima unión. Opcionalmente, el método comprende además explorar una pluralidad de anticuerpos de ensayo en cuanto a la unión a depósitos de sinucleína en un corte tisular por inmunocitoquímica y seleccionar como agente el anticuerpo de máxima unión.
- 35 La descripción proporciona además un método para humanizar un anticuerpo monoclonal seleccionado de entre 8A5, 6H7, 9E4, 1H7 y 11A5, que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de regiones CDR del anticuerpo monoclonal; seleccionar un anticuerpo aceptor; y producir un anticuerpo humanizado que comprenda las CDRs del anticuerpo monoclonal y armazones de región variable del anticuerpo aceptor.
- 40 La descripción proporciona además un método para producir una forma quimérica de un anticuerpo monoclonal seleccionado de entre 8A5, 6H7, 9E4, 1H7 y 11A5, que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal; seleccionar la región constante de las cadenas pesada y ligera; y producir un anticuerpo quimérico que comprenda una cadena ligera que comprenda la región variable de cadena ligera fusionada con la región constante de cadena ligera, y una cadena pesada que comprenda la región variable de cadena pesada fusionada con la región constante de cadena pesada.
- 45 La descripción proporciona métodos para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, método que comprende administrar, a un paciente que tiene la enfermedad o presenta riesgo de desarrollarla, un régimen eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 110-130 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de



- acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, el anticuerpo se une a un epítipo dentro de los restos 118-126 de la alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. Opcionalmente, el anticuerpo compete con el anticuerpo monoclonal 9E4 de ratón (número de acceso PTA-8221 de la ATCC) por unirse a la alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 9E4 (número de acceso PTA-8221 de la ATCC) o 9E4 humanizado o quimérico. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG1 humana. Opcionalmente, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica. Opcionalmente, el anticuerpo se administra en una dosis de 0,0001 a 100 mg de anticuerpo/kg de peso corporal. Opcionalmente, el anticuerpo se administra en múltiples dosis a lo largo de al menos seis meses. Opcionalmente, el anticuerpo se administra intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosamente. Opcionalmente, el anticuerpo se administra por una vía periférica. Opcionalmente, el anticuerpo se administra en una dosis de 1-10 mg/kg.
- La descripción proporciona un anticuerpo monoclonal 9E4 (número de acceso PTA-8221 de la ATCC) o 9E4 humanizado o quimérico.
- La descripción también proporciona un método para humanizar el anticuerpo monoclonal 9E4 (número de acceso PTA-8221 de la ATCC), que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de regiones CDR del anticuerpo monoclonal; seleccionar un anticuerpo aceptor; y producir un anticuerpo humanizado que comprenda las CDRs del anticuerpo monoclonal y armazones de región variable del anticuerpo aceptor.
- La descripción proporciona además un método para producir una forma quimérica del anticuerpo monoclonal 9E4 (número de acceso PTA-8221 de la ATCC), que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal; seleccionar la región constante de las cadenas pesada y ligera; y producir un anticuerpo quimérico que comprenda una cadena ligera que comprenda la región variable de cadena ligera fusionada con la región constante de cadena ligera, y una cadena pesada que comprenda la región variable de cadena pesada fusionada con la región constante de cadena pesada.
- La descripción proporciona además un anticuerpo monoclonal anti-sinucleína producido por el hibridoma JH17.9E4.3.37.1.14.2 (número de acceso PTA-8221 de la ATCC), el hibridoma JH17.1H7.4.24.34 (número de acceso PTA-8220 de la ATCC) o el hibridoma JH22.11A5.6.29.70.54.16.14 (número de acceso PTA-8222 de la ATCC).
- La descripción proporciona además un anticuerpo quimérico o humanizado de un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma JH17.1H7.4.24.34 (número de acceso PTA-8220 de la ATCC) o el hibridoma JH22.11A5.6.29.70.54.16.14 (número de acceso PTA-8222 de la ATCC).
- La descripción proporciona además un método para humanizar un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma JH17.1H7.4.24.34 (número de acceso PTA-8220 de la ATCC) o el hibridoma JH22.11A5.6.29.70.54.16.14 (número de acceso PTA-8222 de la ATCC), que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de regiones CDR del anticuerpo monoclonal; seleccionar un anticuerpo aceptor; y producir un anticuerpo humanizado que comprenda las CDRs del anticuerpo monoclonal y armazones de región variable del anticuerpo aceptor.
- La descripción proporciona además un método para producir una forma quimérica de un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma JH17.1H7.4.24.34 (número de acceso PTA-8220 de la ATCC) o el hibridoma JH22.11A5.6.29.70.54.16.14 (número de acceso PTA-8222 de la ATCC), que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal; seleccionar la región constante de las cadenas pesada y ligera; y producir un anticuerpo quimérico que comprenda una cadena ligera que comprenda la región variable de cadena ligera fusionada con la región constante de cadena ligera, y una cadena pesada que comprenda la región variable de cadena pesada fusionada con la región constante de cadena pesada.
- La descripción proporciona además una célula del hibridoma JH17.9E4.3.37.1.14.2 (número de acceso PTA-8221 de la ATCC), el hibridoma JH17.1H7.4.24.34 (número de acceso PTA-8220 de la ATCC) o el hibridoma JH22.11A5.6.29.70.54.16.14 (número de acceso PTA-8222 de la ATCC).
- La descripción proporciona además un uso de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 110-130 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína, mediante lo cual el anticuerpo se administra por una vía periférica y reduce los cuerpos de Lewy intracelulares o la agregación de alfa-sinucleína por una ruta lisosómica. Opcionalmente, el anticuerpo entra por endocitosis en una célula que contiene un cuerpo de Lewy o agregación de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el anticuerpo se une a alfa-sinucleína unida a membrana del exterior de la célula, y un complejo de anticuerpo y alfa-sinucleína es endocitado por la célula y se combina con un lisosoma dentro de la célula. Opcionalmente, el anticuerpo y la alfa-sinucleína son separadamente endocitados y se combinan con un lisosoma dentro de la célula.

La descripción proporciona además un método para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, método que comprende administrar, a un paciente que tiene la enfermedad o presenta riesgo de desarrollarla, un régimen eficaz de un agente que induce un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 110-130 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Opcionalmente, el agente es un fragmento de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el fragmento no tiene más de 30 restos contiguos en total de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el fragmento induce un anticuerpo hacia un epítipo dentro de los restos 118-126 de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el fragmento comprende los restos 118-126 de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el fragmento está unido a un portador.

10 **Breve descripción de los dibujos**

En la Figura 1 se muestra la secuencia de aminoácidos de alfa-SN (ID. SEC. nº 1) en alineamiento con dos secuencias de aminoácidos de NAC, la ID. SEC. nº 2 y la ID. SEC. nº 3, respectivamente.

En la Figura 2 se muestran cortes cerebrales inmunohistoteñidos de ratones no transgénicos (secciones A, E e I), ratones transgénicos alfa-SN inmunizados con adyuvante solo (secciones B, F y J) y ratones transgénicos alfa-SN inmunizados con alfa-SN que desarrollaban títulos bajos (secciones C, G y K) y títulos elevados (secciones D, H e I) de anticuerpos hacia alfa-SN. Los cortes fueron sometidos a tinción con un anticuerpo anti-alfa-sinucleína para detectar niveles de sinucleína (secciones A-D), un anticuerpo anti-IgG para determinar niveles de IgG totales presentes en el corte (secciones E-H) y para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; del inglés, glial fibrillary acidic protein), un marcador de células astrogiales.

En las Figuras 3A-D se muestran los efectos de un anticuerpo policlonal anti-mSYN sobre la agregación de sinucleína en células GT1-7 transfectadas, como se ve por microscopía óptica.

La Figura 4 es una transferencia Western de niveles de sinucleína en el citoplasma (C) y las membranas (P) de células GT1-7  $\alpha$ -syn tratadas con sueros preinmunes y con anticuerpo 67-10 en una concentración de 1:50 durante 48 horas antes del análisis.

En la Figura 5 se muestran los resultados de estudios del efecto de la inmunización con A $\beta$ 1-42 sobre el depósito de amiloide en los cerebros de ratones no transgénicos y ratones transgénicos SYN, APP y SYN/APP. Los niveles detectables de amiloide que se ven en ratones APP y SYN/APP resultan reducidos por la inmunización con A $\beta$ 1-42.

En la Figura 6 se muestran los resultados de estudios del efecto de la inmunización con A $\beta$ 1-42 sobre la formación de inclusiones de sinucleína en los cerebros de ratones no transgénicos y ratones transgénicos SYN, APP y SYN/APP. Las inclusiones de sinucleína detectadas en ratones SYN y SYN/APP resultan reducidas por la inmunización con A $\beta$ 1-42.

En la Figura 7 se muestran mecanismos directos e indirectos mediante los cuales los anticuerpos bloquean la agregación de alfa-SN.

En la Figura 8 se muestra el mapeo de epítipos de anticuerpos. Se mapearon anticuerpos de ratones que presentaban títulos elevados y anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína humana de alta afinidad utilizando una técnica ELISA. En la mayoría de las muestras de antisueros de ratones vacunados, los epítipos reconocidos estaban dentro de la región C-terminal de la  $\alpha$ -sinucleína humana. No se detectaron epítipos en los sueros de testigos tratados con CFA.

En la Figura 9 se muestra un análisis por imágenes de los niveles de inmunorreactividad para  $\alpha$ -sinucleína humana y de otros marcadores de neurodegeneración. (A) Número medio de inclusiones positivas para h $\alpha$ -sinucleína en la corteza temporal. La vacunación con  $\alpha$ -sinucleína humana dio lugar a una disminución significativa en el número de inclusiones en comparación con los testigos. Este efecto fue más acusado en los ratones del grupo II que en los del grupo I. (B) Área porcentual del neuropilo ocupada por terminales inmunorreactivos para sinaptofisina en la corteza frontal. En ratones transgénicos (tg) tratados con CFA solo, el número de terminales inmunomarcados con sinaptofisina disminuyó un 20%, mientras que los niveles de inmunorreactividad para sinaptofisina por sinapsis resultaron inalterados. (C) Los niveles de inmunorreactividad para CD45 (marcador microglial) en la corteza temporal fueron ligeramente mayores en los cerebros de ratones vacunados con  $\alpha$ -sinucleína humana. (D) Área porcentual del neuropilo ocupada por terminales inmunorreactivos para  $\alpha$ -sinucleína humana en la corteza temporal. En ratones tg vacunados con  $\alpha$ -sinucleína humana hubo una disminución en la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en terminales inmunorreactivos para sinaptofisina. \* = Diferencia significativa en comparación con ratones tg para  $\alpha$ -sinucleína humana tratados con CFA solo ( $p < 0,05$ , prueba T de Student).

En la Figura 10 se muestra un análisis por transferencia Western de los niveles de  $\alpha$ -sinucleína humana y de inmunorreactividad para sinaptofisina en animales vacunados. En comparación con los cerebros de ratones tg tratados con CFA solo (carriles 1-3), en los ratones tg vacunados con h $\alpha$ -sinucleína (carriles 4-6) los niveles tanto de oligómeros como de monómeros de  $\alpha$ -sinucleína humana resultaron disminuidos (sección superior), mientras que los niveles de inmunorreactividad para sinaptofisina aumentaron en el segundo grupo (sección inferior).

En la Figura 11 se muestra un análisis de agregados de  $\alpha$ -sinucleína intraneuronales después de la inyección

intracerebral de anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína. El anticuerpo C-terminal 8A5 y el anticuerpo N-terminal 6H7 tenían un efecto supresor. IgG1, IgG2a e IgG2b fueron testigos isotípicos. Las barras horizontales representan la mediana.

5 En la Figura 12 se muestran cortes de la cara contralateral (sección izquierda; los puntos marrones redondos dentro del corte son agregados de  $\alpha$ -sinucleína) y la cara ipsilateral (sección derecha) de un ratón al que se le ha inyectado el anticuerpo monoclonal 8A5. Se llevó a cabo la inmunotinción con un anticuerpo policlonal para  $\alpha$ -sinucleína. Los agregados de  $\alpha$ -sinucleína intraneuronales de la cara contralateral están señalados con un círculo.

En la Figura 13 se muestra la supresión de agregados de  $\alpha$ -sinucleína intraneuronales en el neocórtex de ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína humana, por los anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -sinucleína 8A5, 9E4 y 6H7.

10 En la Figura 14 se muestra la agregación de  $\alpha$ -sinucleína en la membrana y la localización de  $\alpha$ -sinucleína en lisosomas en ratones  $\alpha$ -sinucleína humana después de una sola inyección intravenosa de 9E4-FITC.

En la Figura 15 se muestra que se hallaron niveles reducidos de oligómeros de  $\alpha$ -syn y formas insolubles de  $\alpha$ -syn en los cerebros de ratones tg a los que se había inyectado intraperitonealmente 9E4 en una dosis de 1 mg/kg durante seis meses.

15 En la Figura 16 se muestra que los niveles de beclina-1, escisión de LC3, y Atg5 aumentaron y se localizaron conjuntamente con los agregados de  $\alpha$ -syn en las neuronas de ratones tg inmunizados.

En la Figura 17 se muestra cómo un anticuerpo contra un epítipo de, o cerca de, el extremo C de  $\alpha$ -syn se mueve en el CNS, reconoce agregados en neuronas afectadas y desencadena la supresión a través de una ruta lisosómica, tal como por autofagia.

## 20 Definiciones

La expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT empleando los pesos de hueco por omisión, comparten una identidad secuencial de al menos 65 por ciento, preferiblemente una identidad secuencial de al menos 80 o 90 por ciento, más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 95 por ciento o más (por ejemplo, una identidad secuencial de 99 por ciento o superior). Preferiblemente, las posiciones de resto que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácido conservativas.

30 Para la comparación de secuencias, una secuencia actúa típicamente como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se emplea un algoritmo para comparación de secuencias, se introducen las secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se especifican las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se especifican los parámetros del programa de algoritmo para secuencias. El algoritmo para comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad secuencial de la(s) secuencia(s) de ensayo con respecto a la secuencia de referencia basándose en los parámetros de programa especificados.

35 El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede ser llevado a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homologías locales de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homologías de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda por el método de similitudes de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, EE.UU.), o por inspección visual (véase, en general, Ausubel et al., *supra*). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar porcentajes de identidad secuencial y similitud secuencial es el algoritmo BLAST, que describen Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para llevar a cabo análisis por BLAST está públicamente disponible a través del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Típicamente, se pueden utilizar los parámetros del programa por omisión para llevar a cabo la comparación de secuencias, aunque también se pueden utilizar parámetros personalizados. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP emplea como valores por omisión 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: 10.915 (1989)].

50 Con fines de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan del modo siguiente: 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 (restos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el cambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

55 Típicamente, los agentes terapéuticos de la invención son sustancialmente puros en cuanto a contaminantes indeseados. Esto significa que un agente tiene típicamente una pureza de al menos aproximadamente 50% en

peso/peso (w/w) y está además sustancialmente exento de proteínas y contaminantes que interfieren. A veces los agentes tienen una pureza de al menos aproximadamente 80% en w/w y más preferiblemente de al menos 90 o aproximadamente 95% en w/w. Sin embargo, empleando técnicas convencionales para purificación de proteínas se pueden obtener péptidos homogéneos con una pureza de al menos 99% en w/w.

- 5 La frase que una molécula "se une específicamente" a una diana se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la molécula en presencia de una población heterogénea de otras sustancias biológicas. De este modo, bajo las condiciones de inmunoensayo especificadas, una molécula específica se une preferentemente a una diana particular y no se une en cantidad significativa alguna a otras sustancias biológicas presentes en la muestra. La unión específica de un anticuerpo a una diana bajo tales condiciones requiere que el  
10 anticuerpo sea seleccionado por su especificidad con respecto a la diana. Se puede utilizar una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se emplean rutinariamente inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, EE.UU., para una descripción  
15 de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden emplear para determinar una inmunoreactividad específica. La unión específica entre dos elementos significa una afinidad de al menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  o  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Se prefieren afinidades superiores a  $10^8$   $M^{-1}$ .

- Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan para incluir anticuerpos intactos y fragmentos ligantes de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del cual proceden para unirse  
20 específicamente a un antígeno. Los fragmentos incluyen cadenas pesadas, cadenas ligeras, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc y Fv separados. Los fragmentos se producen por técnicas de DNA recombinante o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye una o más cadenas inmunoglobulínicas que están químicamente conjugadas con, o expresadas como proteínas de fusión con, otras proteínas. El término "anticuerpo" también incluye un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o  
25 bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios ligantes diferentes. Se pueden producir anticuerpos biespecíficos mediante una diversidad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas y la unión de fragmentos Fab'. Véanse, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990); y Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992). El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos de cadena única en los que dominios variables de cadenas pesadas y ligeras están unidos por  
30 medio de un espaciador.

- APP<sup>695</sup>, APP<sup>751</sup> y APP<sup>770</sup> se refieren, respectivamente, a los polipéptidos largos de 695, 751 y 770 restos de aminoácido codificados por el gen APP humano. Véanse Kang et al., *Nature* 325, 773 (1987); Ponte et al., *Nature* 331, 525 (1988); y Kitaguchi et al., *Nature* 331, 530 (1988). Los aminoácidos de la proteína precursora de amiloide (APP) humana son números asignados de acuerdo con la secuencia de la isoforma APP770. Términos tales como  
35 Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 y Aβ43 se refieren a un péptido Aβ que contiene los restos de aminoácido 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 y 1-43.

Un "antígeno" es un elemento al que se une específicamente un anticuerpo.

- Las expresiones "epítipo" y "determinante antigénico" se refieren a un sitio de un antígeno al cual responden células B y/o T. Los epítipos de células B pueden estar formados tanto por aminoácidos contiguos como por aminoácidos  
40 no contiguos yuxtapuestos por la plegadura terciaria de una proteína. Los epítipos formados por aminoácidos contiguos se conservan típicamente tras la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por la plegadura terciaria se pierden típicamente tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, y más normalmente al menos 5 o 8-10, aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo,  
45 cristalografía por rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, volumen 66, redactado por Glenn E. Morris (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden ser identificados mediante un simple inmunoensayo que muestre la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. Las células T reconocen epítipos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para células CD8 o de aproximadamente 13-15 aminoácidos  
50 para células CD4. Las células T que reconocen el epítipo pueden ser identificadas mediante ensayos *in vitro* que permitan medir la proliferación dependiente de antígeno, según se determina mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, en respuesta a un epítipo, por células T estimuladas [Burke et al., *J. Inf. Dis.* 170, 1110-19 (1994)], mediante la muerte dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos; Tigges et al., *J. Immunol.* 156, 3901-3910) o mediante la secreción de citocinas.

- 55 La expresión respuesta "inmunológica" o "inmune" es el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos) y/o celular (mediada por células T específicas de antígeno o sus productos de secreción) beneficiosa dirigida contra un péptido amiloide en un paciente receptor. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de un inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de un anticuerpo o células T estimuladas. Se provoca una respuesta inmune celular mediante la presentación de epítipos polipeptídicos en asociación con moléculas del MHC de Clase I o Clase II para activar células T auxiliares CD4<sup>+</sup>  
60 específicas de antígeno y/o células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>. La respuesta puede también implicar la activación de

monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de microglía, eosinófilos u otros componentes de la inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células puede ser determinada mediante ensayos de proliferación (células T CD4<sup>+</sup>) o ensayos de linfocitos T citotóxicos (CTL; del inglés, cytotoxic T lymphocytes) (véanse Burke, *supra*, y Tigges, *supra*). Las contribuciones relativas de las respuestas humoral y celular al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno pueden ser distinguidas aislando separadamente anticuerpos y células T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

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

10 La expresión "todo D" se refiere a péptidos que tienen  $\geq 75\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 85\%$ ,  $\geq 90\%$ ,  $\geq 95\%$  y  $100\%$  de aminoácidos con configuración D.

La expresión "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido no complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos se clonan a veces en un vector plasmídico.

15 El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que, cuando se administra junto con un antígeno, aumenta la respuesta inmune al antígeno pero que, cuando se administra solo, no genera una respuesta inmune al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmune por diversos mecanismos que incluyen el reclutamiento de linfocitos, la estimulación de células B y/o T y la estimulación de macrófagos.

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

20 La competición entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que la inmunoglobulina bajo prueba 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, tales como, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA; del inglés, enzyme immunoassay) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competición de tipo sándwich [véase Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9: 242-253 (1983)]; EIA directo de biotina-avidina en fase sólida [véase Kirkland et al., *J. Immunol.* 137: 3614-3619 (1986)]; ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo de tipo sándwich marcado directo en fase sólida [véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)]; RIA con marcadores directo en fase sólida utilizando el marcador I-125 [véase Morel et al., *Molec. Immunol.* 25 (1): 7-15 (1988)]; EIA directo de biotina-avidina en fase sólida [Cheung et al., *Virology* 176: 546-552 (1990)]; y RIA marcado directo [Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82 (1990)].

25 Típicamente, dicho ensayo implica el uso de un antígeno purificado unido a una superficie sólida o unas células que llevan, cualquiera de estos, una inmunoglobulina de ensayo no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. Se mide la inhibición competitiva determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o las 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 competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia, y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo al que se une el anticuerpo de referencia para que se produzca impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos  $50\%$  o  $75\%$ .

30 El término "síntoma" o "síntoma clínico" se refiere a una evidencia subjetiva de una enfermedad, tal como un andar alterado, según es percibido por el paciente. Un "indicio" se refiere a una evidencia objetiva de una enfermedad, según es observada por un médico.

35 La frase "en combinación", cuando se hace referencia a la administración de dos o más anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana (es decir, cada uno reconoce un epítipo diferente) o a la administración de dos o más polipéptidos o inmunógenos que inducen una respuesta de anticuerpos contra la alfa-sinucleína humana, incluye la administración simultánea y la administración en el mismo curso de tratamiento. La administración "simultánea" de agentes abarca la administración de los agentes como una proteína de fusión o un producto de conjugación (por ejemplo, físicamente unidos entre sí), una formulación conjunta (por ejemplo, en la que los agentes están combinados o compuestos en una forma de dosificación, por ejemplo, una formulación de liberación ininterrumpida o una formulación en depósito), la administración como composiciones separadas unas de otras en un espacio de unos pocos minutos o dos horas (administración conjunta), y la administración como composiciones separadas el mismo día. La administración en el "mismo curso de tratamiento" significa que ambos agentes se administran a un paciente para el tratamiento o la profilaxis del mismo estado. Cada agente puede ser administrado una vez o múltiples veces. Por ejemplo, un agente podría ser administrado primero y el segundo agente ser administrado el día siguiente o la semana siguiente. Similarmente, cada uno de los dos agentes podría ser administrado más de una vez, por ejemplo, en días sucesivos, días alternos, semanas alternas o de acuerdo con otros programas (por ejemplo, de modo que se espere que el beneficio al paciente exceda del de la administración de cualquier agente solo).

Un fragmento denominado en forma SNx-y significa un fragmento de alfa-sinucleína que comienza en el aminoácido

X y acaba en el aminoácido Y. Dicho fragmento puede estar unido a un polipéptido heterólogo, pero no a otros aminoácidos de alfa-sinucleína humana de modo que el fragmento empiece antes de X o acabe después de Y.

Los restos de la alfa-sinucleína o un fragmento de la misma se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1 cuando la alfa-sinucleína o el fragmento están máximamente alineados con la ID. SEC. nº 1, como se describió anteriormente utilizando los parámetros por omisión.

Las composiciones o métodos "que comprenden" uno o más elementos citados pueden incluir otros elementos no específicamente citados. Por ejemplo, una composición que comprende un péptido de alfa-SN abarca tanto un péptido de alfa-SN aislado como un péptido de alfa-SN como componente de una secuencia polipeptídica más grande.

## 10 Descripción detallada de la invención

### I. General

La descripción proporciona métodos para prevenir o tratar diversas enfermedades y estados caracterizados por la presencia de depósitos de péptido de alfa-SN agregados a una masa insoluble en el cerebro de un paciente, en forma de cuerpos de Lewy. A dichas enfermedades se hace colectivamente referencia como enfermedades de cuerpos de Lewy (LBD), y dichas enfermedades incluyen la enfermedad de Parkinson (PD). Dichas enfermedades se caracterizan por agregados de alfa-SN que tienen una estructura de lámina  $\beta$  plegada y se tiñen con tioflavina S y rojo Congo (véase Hasimoto, *ibid.*). La descripción proporciona métodos para prevenir o tratar tales enfermedades utilizando un agente que puede generar una respuesta inmunogénica hacia alfa-SN. La respuesta inmunogénica actúa para prevenir la formación de, o suprimir, depósitos de sinucleína dentro de células del cerebro. Aunque la comprensión del mecanismo no es esencial para la práctica de la invención, la respuesta inmunogénica puede inducir la supresión como resultado de anticuerpos hacia sinucleína que se internalizan dentro de las células solos o con alfa-sinucleína. Los resultados presentados en los Ejemplos muestran que los anticuerpos hacia alfa-sinucleína administrados periféricamente atraviesan la barrera hematoencefálica y se internalizan, solos o con alfa-sinucleína, dentro de células que contienen depósitos de alfa-sinucleína. Los anticuerpos internalizados pueden promover la degradación de alfa-sinucleína por medio de la activación de rutas lisosómicas. Los anticuerpos internalizados con afinidad por alfa-sinucleína en forma desnaturalizada pueden también estabilizar la molécula en forma no agregada. Alternativa o adicionalmente, los anticuerpos pueden interferir en la agregación de sinucleína sobre la superficie exterior de la célula. Por ejemplo, anticuerpos hacia alfa-sinucleína pueden reconocer y entrecruzar proteínas anormalmente conformadas en la superficie de células neuronales. En algunos métodos, la respuesta de supresión puede ser efectuada al menos en parte por fagocitosis mediada por el receptor de Fc. La inmunización con sinucleína puede reducir la acumulación de sinucleína en sinapsis y cuerpos de células neuronales en el cerebro. Aunque la comprensión del mecanismo no es esencial para la práctica de la invención, este resultado puede ser explicado por anticuerpos hacia sinucleína que son incorporados por células neuronales (por ejemplo, por vesículas sinápticas).

Opcionalmente, se pueden emplear agentes que generan una respuesta inmunogénica contra alfa-SN en combinación con agentes que generan una respuesta inmunogénica hacia  $A\beta$ . La respuesta inmunogénica es útil en la supresión de depósitos de  $A\beta$  en individuos que tienen dichos depósitos (por ejemplo, individuos que tienen tanto la enfermedad de Alzheimer como la enfermedad de Parkinson); sin embargo, la respuesta inmunogénica también tiene actividad en cuanto a suprimir depósitos de sinucleína. De este modo, dichos agentes pueden ser utilizados solos, o en combinación con agentes que generan una respuesta inmunogénica hacia alfa-SN en individuos con LBD pero que no padecen ni presentan riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

La descripción proporciona además composiciones farmacéuticas y métodos para prevenir y tratar la enfermedad amiloideogénica. Se ha mostrado que las sinucleínas alfa y beta están implicadas en la nucleación de depósitos de amiloide en ciertas enfermedades amiloides, particularmente la enfermedad de Alzheimer (D. F. Clayton et al., TINS 21 (6): 249-255, 1998). Más específicamente, un fragmento del dominio NAC de sinucleínas alfa y beta (restos 61-95) ha sido aislado de placas de amiloide en pacientes con enfermedad de Alzheimer; de hecho, este fragmento comprende aproximadamente el 10% de la placa que permanece insoluble después de la solubilización con dodecilsulfato sódico (SDS) (J. M. George et al., Neurosci. News 1: 12-17, 1995). Además, se ha comunicado que tanto la alfa-SN de longitud completa como el fragmento NAC de la misma aceleran la agregación de péptido  $\beta$ -amiloide en amiloide insoluble *in vitro* (Clayton, *supra*). El componente NAC de las placas de amiloide sirve como una diana para tratamientos de base inmunológica de la presente descripción, como se detalla más adelante. De acuerdo con un aspecto, la descripción incluye composiciones farmacéuticas que comprenden agentes eficaces para provocar una respuesta inmune contra sinucleína-componente NAC de una placa de amiloide en un paciente. Dichas composiciones pueden ser eficaces en cuanto a prevenir, retardar o reducir el depósito de placas en la enfermedad amiloide.

### II. Agentes que generan una respuesta inmunogénica contra alfa-sinucleína

Una respuesta inmunogénica puede ser activa, como cuando se administra un inmunógeno a un paciente para inducir anticuerpos reactivos con alfa-SN, o pasiva, como cuando se administra a un paciente un anticuerpo que se

une por sí mismo a alfa-SN.

#### 1. Agentes que inducen una respuesta inmune activa

Los agentes terapéuticos inducen una respuesta inmunogénica específicamente dirigida a ciertos epítomos del péptido de alfa-SN. Los agentes preferidos son el propio péptido de alfa-SN y fragmentos del mismo. En la publicación de patente de EE.UU. US20060259986A1 y la publicación de patente PCT WO 05/013889 se describen nuevos fragmentos de alfa-sinucleína útiles en métodos para la prevención y el tratamiento de enfermedades sinucleinopáticas y amiloidogénicas. Opcionalmente, estos fragmentos pueden ser utilizados en combinación con un adyuvante.

La alfa-sinucleína fue originalmente identificada en cerebros humanos como la proteína precursora del componente no  $\beta$ -amiloide (NAC) de placas de la AD [Uéda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (23): 11.282-11.286 (1993)]. La alfa-SN, también denominada precursor del componente no A $\beta$  del amiloide de la AD (NACP), es un péptido de 140 aminoácidos. La alfa-SN tiene la secuencia de aminoácidos:

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTA  
VAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDKLGKNEEGAPQEGILEMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA (ID. SEC. nº 1)  
(Uéda et al., ibíd.; número de acceso de GenBank: P37840).

El componente no A $\beta$  del amiloide de la AD (NAC) procede de la alfa-SN. El NAC, un dominio muy hidrófobo de la alfa-sinucleína, es un péptido que consiste en al menos 28 restos de aminoácido (restos 60-87; ID. SEC. nº 3) y opcionalmente 35 restos de aminoácido (restos 61-95; ID. SEC. nº 2). Véase la Figura 1. El NAC presenta la tendencia a formar una estructura de lámina beta (Iwai et al., Biochemistry 34: 10.139-10.145). Jensen et al. han comunicado que el NAC tiene la secuencia de aminoácidos:

EQVTNVGGAVVTGVTAQAQKTVEGAGSIAAATGFV (ID. SEC. nº 2)  
[Jensen et al., Biochem. J. 310 (Pt 1): 91-94 (1995); número de acceso de GenBank: S56746].

Uéda et al. han comunicado que el NAC tiene la secuencia de aminoácidos:

KEQVTNVGGAVVTGVTAQAQKTVEGAGS (ID. SEC. nº 3)  
[Uéda et al., PNAS USA 90: 11.282-11.286 (1993)].

Alfa-SN desagregada o fragmentos de la misma, incluyendo NAC, significa unidades peptídicas monómeras. La alfa-SN desagregada o los fragmentos de la misma son generalmente solubles y son capaces de autoagregarse para formar oligómeros solubles. Los oligómeros de alfa-SN y fragmentos de la misma son normalmente solubles y existen predominantemente como hélices alfa. Se puede preparar *in vitro* alfa-SN monómera disolviendo el péptido liofilizado en DMSO neto con sonicación. La disolución resultante se centrifuga para eliminar toda materia corpuscular insoluble. Alfa-SN agregada o fragmentos de la misma, incluyendo NAC, significa oligómeros de alfa-SN o fragmentos de la misma que se han asociado en conjuntos beta-laminares insolubles. Alfa-SN agregada o fragmentos de la misma, incluyendo NAC, significa también polímeros fibrilares. Las fibrillas son normalmente insolubles. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN soluble o fragmentos de la misma o a alfa-SN agregada o fragmentos de la misma. Algunos anticuerpos se unen a oligómeros de alfa-sinucleína más fuertemente que a formas monómeras o formas fibrilares. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN tanto soluble como agregada o a fragmentos de las mismas, y opcionalmente también a formas oligómeras.

Se pueden utilizar alfa-SN, el componente principal de los cuerpos de Lewy característicos de la PD, y fragmentos epitópicos de la misma, tales como, por ejemplo, NAC, o fragmentos distintos de NAC, tales como fragmentos en, o cerca de, el extremo N o en, o cerca de, el extremo C, para inducir una respuesta inmunogénica. Preferiblemente, dichos fragmentos comprenden cuatro o más aminoácidos de alfa-SN o un compuesto análogo a la misma.

También se pueden utilizar otros componentes de cuerpos de Lewy, por ejemplo, sinfilina-1, parkina, ubiquitina, neurofilamento, beta-cristalina, y fragmentos epitópicos de los mismos, para inducir una respuesta inmunogénica.

Como se indicó, ciertos fragmentos preferidos de alfa-sinucleína son de la región C-terminal de la molécula. Dichos fragmentos carecen de los restos 1-69 de la alfa-sinucleína humana. La inmunización con dichos fragmentos genera una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos hacia uno o más epítomos dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana. Algunos fragmentos activos incluyen un epítomo en, o cerca de, el extremo C de la alfa-SN (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 70-140, 100-140, 120-140, 130-140 o 135-140). Algunos fragmentos activos incluyen un epítomo en, o cerca de, la región reconocida por el anticuerpo monoclonal 8A5. Algunos fragmentos activos incluyen un epítomo en, o cerca de, la región reconocida por el anticuerpo monoclonal 9E4 (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 90-140, 98-140, 108-136, 110-130 o 118-126). Algunos fragmentos activos incluyen un epítomo en, o cerca de, la región reconocida por el anticuerpo monoclonal 1H7 (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 70-119, 80-109, 88-101 o 91-99). En algunos fragmentos activos, el resto C-terminal del epítomo es el resto C-terminal de alfa-SN.

Algunos fragmentos de alfa-sinucleína generan anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de

uno o más de: SN83-101, SN107-125, SN110-128, SN124-140, SN110-130, SN85-105, SN118-126 y SN91-99 de la alfa-sinucleína humana. Algunos fragmentos generan anticuerpos que exclusivamente se unen específicamente dentro de uno de los fragmentos anteriores. Por ejemplo, el fragmento SN83-101 comienza en el resto 83 y acaba en el resto 101 de alfa-sinucleína y sólo genera anticuerpos que se unen específicamente a SN83-101. Los fragmentos inmunogénicos de la región C-terminal incluyen SN85-99, SN109-123, SN112-126 y SN126-138 (como se muestra en la Figura 8), SN110-130, SN85-105 y otros fragmentos que difieren de uno de estos en hasta dos aminoácidos adicionales o menos por cualquier extremo. Otro fragmento preferido es SN83-140, que incluye todos estos epítomos.

Algunos fragmentos tienen no más de 40, o no más de 30, restos contiguos en total de alfa-sinucleína. Algunos de dichos fragmentos comprenden SN125-140, SN130-140, SN87-97, SN111-121, SN114-124 o SN128-136. Algunos fragmentos tienen un total de 5-20, 5-25 o 5-30 aminoácidos contiguos de la mitad C-terminal de alfa-sinucleína (es decir, los restos 70-140). Algunos fragmentos tienen 5-20 aminoácidos contiguos de entre las posiciones 120-140 de alfa-sinucleína. Los fragmentos particularmente preferidos incluyen SN124-140, SN125-140, SN126-140, SN127-140, SN128-140, SN129-140, SN130-140, SN131-140, SN132-140, SN133-140, SN134-140, SN135-140, SN136-140, SN137-140, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN129-139, SN130-139, SN131-139, SN132-139, SN133-139, SN134-139, SN135-139, SN136-139, SN137-139, SN124-138, SN125-138, SN126-138, SN127-138, SN128-138, SN129-138, SN130-138, SN131-138, SN132-138, SN133-138, SN134-138, SN135-138, SN136-138, S SN124-137, SN125-137, SN126-137, SN127-137, SN128-137, SN129-137, SN130-137, SN131-137, SN132-137, SN133-137, SN134-137, SN135-137, SN124-136, SN125-136, SN126-136, SN127-136, SN128-136, SN129-136, SN130-136, SN131-136, SN132-136, SN133-136 y SN134-136.

Algunos fragmentos tienen 5-20 aminoácidos contiguos de entre las posiciones 118-126, 108-136 y 98-140 de alfa-sinucleína. Algunos fragmentos tienen 5-20 aminoácidos contiguos de entre las posiciones 70-99, 91-131, 136, o 91-99 de alfa-sinucleína.

Como se muestra en los Ejemplos IX y X, la administración de 6H7, un anticuerpo que reconoce el extremo amínico de alfa-sinucleína, o de 8A5, un anticuerpo que reconoce el extremo carboxílico de alfa-sinucleína, o de 9E4, un anticuerpo que reconoce un epítipo en la región C-terminal de sinucleína, reducen la agregación de alfa-sinucleína en el cerebro de ratones transgénicos que sobreexpresaban alfa-sinucleína humana. Se espera que la inmunización con fragmentos de alfa-sinucleína que comprenden secuencias de, o cerca de, las regiones terminales de alfa-sinucleína produzca resultados similares en cuanto a dicha supresión de agregados y/o evite la formación de agregados.

Otros fragmentos de alfa-sinucleína útiles para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro (por ejemplo, la enfermedad de Parkinson) son de la región N-terminal de la molécula. La inmunización con los fragmentos genera una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos hacia uno o más epítomos dentro de los restos 1-20 o, en algunos casos, uno o más epítomos dentro de los restos 1-10. Como se muestra en el Ejemplo IX, la administración de 6H7, un anticuerpo que reconoce el extremo amínico de alfa-sinucleína, reducía la agregación de alfa-sinucleína en el cerebro de ratones transgénicos que sobreexpresaban alfa-sinucleína humana. Se espera que la inmunización con fragmentos de alfa-sinucleína que comprenden la región terminal amínica de alfa-sinucleína produzca resultados similares en cuanto a dicha supresión de agregados y/o evite la formación de agregados.

De este modo, en un aspecto, la descripción proporciona un método para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro mediante la administración, a un paciente que tiene la enfermedad o presenta riesgo de desarrollarla, de un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-40, los restos 1-20 o los restos 1-10 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. En una realización, el fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína está exento de los restos 70-140 de alfa-sinucleína. En una realización, el fragmento inmunogénico está exento de los restos 41-140 de alfa-sinucleína. En una realización, el fragmento inmunogénico está exento de los restos 25-140 de alfa-sinucleína.

Los inmunógenos adecuados para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro incluyen, pero no se limitan a, fragmentos que comprenden de 5 a 20 restos de aminoácido contiguos del extremo amínico de alfa-sinucleína. En una realización preferida, el fragmento comprende el primer resto (amino-terminal) de alfa-sinucleína. De este modo, los fragmentos ejemplares incluyen la secuencia de restos 1 a  $N_a$  de la ID. SEC. nº 1, donde  $N_a$  es de 5 a 20 (por ejemplo, MDVFMKGLSKAKEGVVAAAE; MDVFMKGLSKAKEGVVAAA; MDVFMKGLSKAKEGVVAA; MDVFMKGLSKAKEGVVA; MDVFMKGLSKAKEGVV; MDVFMKGLSKAKEGV; MDVFMKGLSKAKEG; MDVFMKGLSKAK; MDVFMKGLSKA; MDVFMKGLSK; MDVFMKGLS; MDVFMKGL; MDVFMKG; MDVFMK; y MDVFM. En otras realizaciones preferidas, el fragmento no comprende el resto amino-terminal de alfa-sinucleína pero comprende el resto segundo y/o tercero de alfa-sinucleína. De este modo, los fragmentos ejemplares tienen las secuencias de restos 2 a  $N_b$  y 3 a  $N_c$  de la ID. SEC. nº 1, donde  $N_b$  es de 6 a 21 y  $N_c$  es de 7 a 22 (por ejemplo, DVFMKGLSKAKEGVVAAA; DVFMKGLSKAKEGVVAAAE; DVFMKGLSKAKEGVVAAA;



DVFMKGLSKAKEGVVAA; DVFMKGLSKAKEGVVA; DVFMKGLSKAKEGVV; DVFMKGLSKAKEGV;  
 DVFMKGLSKAKEG; DVFMKGLSKAK; DVFMKGLSKA; DVFMKGLSK; DVFMKGLS; DVFMKGL; DVFMKG; DVFMK;  
 VFMKGLSKAKEGVVAAAEKT; VFMKGLSKAKEGVVAAAEK; VFMKGLSKAKEGVVAAAE;  
 5 VFMKGLSKAKEGVVAAA; VFMKGLSKAKEGVVAA; VFMKGLSKAKEGVVA; VFMKGLSKAKEGVV;  
 VFMKGLSKAKEGV; VFMKGLSKAKEG; VFMKGLSKAK; VFMKGLSKA; VFMKGLSK; VFMKGLS; VFMKGL; y  
 VFMKG). Como se discute más adelante, los fragmentos anteriormente mencionados pueden estar unidos a una  
 molécula portadora [por ejemplo, un producto de conjugación o una proteína de fusión, véase la Sección II(3)].  
 Alternativamente, como se discute más adelante, se puede administrar un fragmento anteriormente mencionado por  
 vacunación del sujeto con un ácido nucleico que codifica el fragmento [véase la Sección II(4)].

10 Otros fragmentos de alfa-sinucleína útiles para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad  
 caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro (por ejemplo, la enfermedad de  
 Parkinson) son de la región próxima a la serina 129 de alfa-SN. La inmunización con fragmentos que incluyen este  
 resto en su forma fosforilada (por ejemplo, SN 124-134 con Ser129 fosforilada) genera una respuesta inmunogénica  
 15 que comprende anticuerpos hacia uno o más epítomos que incluyen fosfoSer129. Algunos fragmentos activos  
 inducen anticuerpos que reconocen un epítomo de, o cerca de, la región reconocida por el anticuerpo monoclonal  
 11A5.

Por facilidad de referencia, se puede hacer referencia a los fragmentos y epítomos de alfa-SN basándose en su  
 posición en la molécula, por ejemplo y sin limitación, fragmentos que contienen el aminoácido N-terminal de alfa-SN,  
 fragmentos que contienen el aminoácido C-terminal, fragmentos NAC como los anteriormente descritos, fragmentos  
 20 que no contienen el aminoácido N-terminal ni el aminoácido C-terminal, fragmentos de la mitad C-terminal de alfa-  
 SN, fragmentos de la mitad N-terminal de alfa-SN, y fragmentos dentro de los 40 restos N-terminales de alfa-SN. En  
 ciertas realizaciones, los fragmentos pueden contener de 5 a 100 restos contiguos de alfa-SN, por ejemplo, en el  
 intervalo abarcado por un límite inferior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30 o 40 restos contiguos y un límite  
 superior de 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o 100 restos contiguos, donde el límite superior es mayor que el límite  
 25 inferior. Preferiblemente, el fragmento contiene al menos 5, al menos ocho, al menos 10, al menos 15 o al menos 20  
 restos contiguos de alfa-SN.

La referencia a alfa-SN incluye las secuencias de aminoácidos humanas naturales anteriormente indicadas así como  
 compuestos análogos que incluyen variantes alélicas, de especie e inducidas, formas de longitud completa y  
 fragmentos inmunogénicos de las mismas. En todas las realizaciones se prefiere alfa-sinucleína humana, lo que  
 30 significa una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la ID. SEC. n° 1 o variantes alélicas de la  
 misma. Los compuestos análogos difieren típicamente de los péptidos de origen natural en una, dos o unas pocas  
 posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservativas. Los compuestos análogos presentan típicamente  
 una identidad secuencial de al menos 80 o 90% con respecto a los péptidos naturales. A las posiciones de los  
 35 aminoácidos en los compuestos análogos a la alfa-sinucleína natural se les asignan los números de los  
 correspondientes aminoácidos en la alfa-sinucleína natural cuando el compuesto análogo y la alfa-sinucleína natural  
 están máximamente alineados. Algunos compuestos análogos incluyen además aminoácidos artificiales o  
 modificaciones de aminoácidos N-terminales o C-terminales en una, dos o unas pocas posiciones. Por ejemplo, el  
 resto de ácido glutámico natural de la posición 139 de la alfa-SN puede ser sustituido por ácido isoaspártico. Son  
 40 ejemplos de aminoácidos artificiales: aminoácidos D, alfa, alfa-disustituidos, N-alquil-aminoácidos, ácido láctico, 4-  
 hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetil-lisina, épsilon-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-  
 acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, omega-N-metilarginina, beta-alanina, ornitina,  
 norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-aminobutírico, homoserina, citrulina y ácido isoaspártico.  
 Los agentes terapéuticos también incluyen compuestos análogos a fragmentos de alfa-SN. Algunos agentes  
 45 terapéuticos de la descripción son péptidos todo-D, por ejemplo, alfa-SN todo-D y NAC todo-D, y compuestos  
 peptídicos análogos todo-D. los compuestos análogos se unen específicamente a una población policlonal de  
 anticuerpos hacia alfa-sinucleína humana natural. Los fragmentos y los compuestos análogos pueden ser  
 explorados en cuanto a su eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos en comparación  
 con testigos no tratados o de placebo, como se describe más adelante.

La alfa-SN, sus fragmentos y sus compuestos análogos se pueden sintetizar por síntesis peptídica en fase sólida o  
 50 por expresión recombinante o se pueden obtener de fuentes naturales. Se dispone comercialmente de sintetizadores  
 peptídicos automáticos de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.  
 La expresión recombinante puede ser en bacterias, tal como en *E. coli*, levaduras, células de insecto o células de  
 mamífero. En Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H.P. Press, New York, EE.UU., 2ª  
 edición, 1989), se describen procedimientos para expresión recombinante. También se dispone comercialmente de  
 55 algunas formas de péptido de alfa-SN, por ejemplo, en BACHEM y American Peptide Company, Inc.

Los agentes terapéuticos también incluyen polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un fragmento activo  
 de péptido de alfa-SN junto con otros aminoácidos. Por ejemplo, los agentes preferidos incluyen proteínas de fusión  
 que comprenden un segmento de alfa-SN fusionado con una secuencia de aminoácidos heteróloga que induce una  
 respuesta de células T cooperadoras contra la secuencia de aminoácidos heteróloga y, por ello, una respuesta de  
 60 células B contra el segmento de alfa-SN. Dichos polipéptidos pueden ser explorados en cuanto a su eficacia  
 profiláctica o terapéutica en modelos animales en comparación con testigos no tratados o de placebo, como se

describe más adelante. El péptido-alfa SN, el compuesto análogo, el fragmento activo u otro polipéptido se pueden administrar en forma asociada o multimérica o en forma disociada. Los agentes terapéuticos también incluyen multímeros de agentes inmunogénicos monoméricos. Los agentes terapéuticos de la descripción pueden incluir secuencias de polilisina.

- 5 En otra variación, un péptido inmunogénico, tal como un fragmento de alfa-SN, puede ser presentado por un virus o una bacteria como parte de una composición inmunogénica. Se incorpora un ácido nucleico que codifica el péptido inmunogénico a un genoma o episoma del virus o la bacteria. Opcionalmente, el ácido nucleico se incorpora de tal manera que el péptido inmunogénico 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 transmembranal de una bacteria para que se presente el péptido. Los virus o las bacterias utilizados en dichos métodos deberían ser no patógenos o atenuados. Los virus adecuados incluyen adenovirus, HSV, virus de la encefalitis equina venezolana y otros alphavirus, virus de la estomatitis vesicular y otros rhabdovirus, virus vaccinia y virus de la viruela aviar. Las bacterias adecuadas incluyen los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Es particularmente adecuada la fusión de un péptido inmunogénico con HBsAg de HBV.
- 10
- 15 Los agentes terapéuticos también incluyen péptidos y otros compuestos que no tienen necesariamente una significativa similitud de secuencia de aminoácidos con alfa-SN pero que, no obstante, sirven como compuestos miméticos de alfa-SN e inducen una respuesta inmune similar. Por ejemplo, se pueden explorar péptidos y proteínas que forman láminas beta plegadas en cuanto a su idoneidad. También se pueden emplear anticuerpos anti-idiotípicos contra anticuerpos monoclonales hacia alfa-SN u otros componentes de los cuerpos de Lewy. Dichos anticuerpos anti-Id remedian el antígeno y generan una respuesta inmune hacia él (véase, *Essential Immunology*, redactado por Roit, Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, California, EE.UU., 6ª edición, página 181). Agentes distintos a alfa-SN inducirían una respuesta inmunogénica contra uno o más de los segmentos preferidos de alfa-SN anteriormente enumerados (por ejemplo, NAC). Preferiblemente, dichos agentes inducen una respuesta inmunogénica que está específicamente dirigida a uno de estos segmentos sin estar dirigida a otros segmentos de alfa-SN.
- 20
- 25

También se pueden explorar bancos aleatorios de péptidos u otros compuestos en cuanto a idoneidad. Se pueden producir bancos combinatorios para muchos tipos de compuestos que pueden ser sintetizados en modo de "paso por paso". Dichos compuestos incluyen polipéptidos, compuestos miméticos de giro beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicocolas N-sustituidas oligómeras y oligocarbamatos. Se pueden construir grandes bancos combinatorios de los compuestos mediante el método de los bancos sintéticos codificados (ESL; del inglés, *encoded synthetic libraries*) descrito en Affymax, documento WO 95/12608, Affymax, documento WO 93/06121, Columbia University, documento WO 94/08051, Farmacopea, documento WO 95/35503, y Scripps, documento WO 95/30642. También se pueden generar bancos peptídicos mediante métodos de presentación en fago. Véase, por ejemplo, Devlin, documento WO 91/18980.

30

35

Los bancos combinatorios y demás compuestos son inicialmente explorados en cuanto a idoneidad determinando su capacidad para unirse a anticuerpos o linfocitos (B o T) conocidos por ser específicos para alfa-SN u otros componentes de los cuerpos de Lewy. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo exploraciones iniciales con sueros policlonales o un anticuerpo monoclonal hacia alfa-SN o un fragmento de la misma. Los bancos son preferiblemente explorados en cuanto a la capacidad para unirse a anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20 o 70-140 de la alfa-sinucleína humana. Los compuestos pueden ser luego explorados en cuanto a su capacidad específica hacia un epítipo específico dentro de alfa-SN (por ejemplo, SN1-20, SN83-101, SN 107-125, SN110-128, SN124-140, SN118-126 y SN91-99 de alfa-sinucleína). Los compuestos pueden ser examinados mediante los mismos procedimientos descritos para mapear especificidades de epítipos de anticuerpos. Los compuestos identificados mediante tales exploraciones son luego adicionalmente analizados en cuanto a su capacidad para inducir anticuerpos o linfocitos reactivos hacia alfa-SN o fragmentos de la misma. Por ejemplo, se pueden examinar múltiples diluciones de sueros en placas de microtitulación que han sido previamente revestidas con alfa-SN o un fragmento de la misma y se puede llevar a cabo un ensayo ELISA estándar para examinar anticuerpos reactivos hacia alfa-SN o el fragmento. Los compuestos pueden ser luego examinados en cuanto a sus eficacias profiláctica y terapéutica en animales transgénicos predispuestos a una enfermedad asociada con la presencia de cuerpos de Lewy, como se describe en los Ejemplos. Dichos animales incluyen, por ejemplo, ratones transgénicos que sobreexpresan alfa-SN o un mutante de la misma (por ejemplo, sustitución de alanina por treonina en la posición 53) como se describe, por ejemplo, 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 dichos ratones transgénicos que sobreexpresan además APP o un mutante de la misma. Son particularmente preferidos dichos ratones transgénicos para sinucleína que portan una mutación 717 de APP descrita por Games et al., *Nature* 373, 523 (1995), y ratones que portan una mutación sueca 670/671 de APP, tales como los descritos por 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, 13.287-13.292 (1997); Sturchler-Pierrat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13.287-13.292 (1997); Borchelt et al., *Neuron* 19, 939-945 (1997). En el documento WO 01/60794 se proporcionan ejemplos de dichos animales transgénicos para sinucleína/APP. Modelos animales adicionales de PD incluyen modelos animales para 6-hidroxidopamina, rotenona y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) [M. Flint Beal, *Nature Reviews Neuroscience* 2: 325-334 (2001)].

40

45

50

55

60

Se puede utilizar el mismo planteamiento de exploración sobre otros posibles compuestos análogos a alfa-SN y péptidos más largos que incluyen fragmentos de alfa-SN, descritos anteriormente, y otros componentes de cuerpos de Lewy y compuestos análogos o fragmentos de los mismos.

5 Como se describe en esta memoria, la administración de anticuerpos que reconocen epítomos en las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal de alfa-sinucleína (es decir, 8A5 y 6H7) reducían los agregados de alfa-sinucleína en los cerebros de ratones transgénicos que sobreexpresaban alfa-sinucleína humana (véase, por ejemplo, el Ejemplo IX). Basándose en parte en este descubrimiento, se contempla que inducir una respuesta inmune contra epítomos en ambos extremos de alfa-sinucleína tendrá ventajas en la profilaxis y la terapia. De este modo, en un aspecto, la descripción proporciona un método para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro al inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 1-20, o alternativamente los restos 1-10, de la alfa-sinucleína humana y un epítopo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana. En una realización preferida, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y los restos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. A una respuesta inmune que comprende anticuerpos contra epítomos en ambas regiones terminales de la proteína se puede hacer referencia como respuesta inmune "dual". Se puede inducir una respuesta inmune dual de diversas maneras, y la presente descripción no se limita a ningún método particular para iniciar dicha respuesta.

20 Se puede inducir una respuesta inmune dual mediante la vacunación con un único polipéptido que es eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana. En realizaciones preferidas, los anticuerpos se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 1-10 y/o dentro de los restos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Se puede utilizar un polipéptido que carezca de al menos los restos 25-69 de la alfa-sinucleína humana, al menos los restos 30-110 de la alfa-sinucleína humana o al menos los restos 21-119 de la alfa-sinucleína humana. Cuando se emplean dichos polipéptidos, la respuesta inmunogénica no incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 25-69 de la alfa-sinucleína humana.

30 Se puede también inducir una respuesta inmune dual mediante la vacunación con dos (o más) polipéptidos en combinación, donde un polipéptido induce una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana. En realizaciones preferidas, los anticuerpos se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 1-10 y/o dentro de los restos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. De esta manera, se puede efectuar el tratamiento o la profilaxis administrando un primer fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína que induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y un segundo fragmento inmunogénico que induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 70-140 (o 120-140) de la alfa-sinucleína humana. Se pueden administrar fragmentos de alfa-sinucleína humana en combinación, como se discutió anteriormente (por ejemplo, administrándolos como una proteína de fusión o un producto de conjugación en una formulación conjunta o en el mismo curso de terapia).

45 La descripción proporciona composiciones útiles para iniciar una respuesta inmune contra epítomos en cualquier extremo o en ambos extremos de la alfa-sinucleína. Las composiciones incluyen formulaciones y formas de dosificación que contienen dos o más polipéptidos, tales como las anteriormente descritas, donde un polipéptido induce una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana. En realizaciones preferidas, los polipéptidos inducen anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 1-10 y/o dentro de los restos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Las formulaciones ejemplares (adecuadas para polipéptidos en formulación conjunta) son conocidas en la técnica e incluyen las descritas más adelante en la Sección VII ("Regímenes de tratamiento").

50 La descripción también proporciona kits para iniciar una respuesta inmune contra epítomos en ambos extremos de la alfa-sinucleína. Los kits incluyen dos o más agentes que inducen una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana. Los agentes pueden ser combinados en una sola preparación para uso simultáneo. Los agentes pueden ocupar recipientes separados (por ejemplo, viales, jeringas, tubos o similares), conteniendo cada uno un polipéptido diferente para uso simultáneo, sucesivo o separado. Estos agentes pueden ser opcionalmente administrados en combinación con otros agentes que sean al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de la enfermedad de cuerpos de Lewy. Los kits pueden incluir además agentes que aumenten el paso de los agentes de la descripción a través de la barrera hematoencefálica, otros adyuvantes y materiales para administración al paciente.

60

## 2. Agentes para respuesta inmune pasiva

Los agentes terapéuticos de la descripción también incluyen anticuerpos que se unen específicamente a alfa-SN u otros componentes de los cuerpos de Lewy. Esta descripción también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a un componente de sinucleína-NAC de una placa de amiloide. Se conocen anticuerpos inmunorreactivos para alfa-SN [véanse, por ejemplo, Arima et al., Brain Res. 808: 93-100 (1998); Crowther et al., Neuroscience Lett. 292: 128-130 (2000); y Spillantini et al., Nature 388: 839-840 (1997)]. Dichos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Algunos de dichos anticuerpos se unen específicamente a agregados insolubles de alfa-SN sin unirse específicamente a la forma monomérica soluble. Algunos se unen específicamente a la forma monomérica soluble sin unirse a la forma agregada insoluble. Algunos se unen específicamente tanto a la forma agregada como a la forma monomérica soluble. Algunos de dichos anticuerpos se unen específicamente a una forma corta de origen natural de alfa-SN (por ejemplo, NAC) sin unirse a alfa-SN de longitud completa y origen natural. Algunos anticuerpos se unen específicamente a una forma larga sin unirse a una forma corta. Algunos anticuerpos se unen específicamente a alfa-SN sin unirse a otros componentes de los LBs. Algunos anticuerpos se unen específicamente a alfa-SN sin unirse específicamente a otros componentes de las placas de amiloide. En la publicación de patente de EE.UU. US20060259986A1 y la publicación de patente PCT WO 05/013889 se proporcionan anticuerpos terminalmente específicos que se unen específicamente a fragmentos de alfa-sinucleína sin unirse específicamente a la alfa-sinucleína intacta *per se*. Estos anticuerpos son útiles en métodos para la prevención y el tratamiento de enfermedades sinucleinopáticas y amiloidogénicas.

En experimentos llevados a cabo en apoyo de la invención, se empleó un ensayo de predicción *ex vivo* (Ejemplo VII) para examinar la supresión de un anticuerpo que se une específicamente a sinucleína-NAC. Se puso un anticuerpo hacia NAC en contacto con una muestra de tejido cerebral que contenía placas de amiloide y células microgliales. Se utilizó suero de conejo como testigo. El control subsiguiente mostró una acusada reducción en el número y el tamaño de las placas, indicativa de la actividad supresora del anticuerpo.

A partir de estos datos, resulta evidente que la carga de placas de amiloide asociada con la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades amiloides puede ser disminuida en gran medida mediante la administración de reactivos inmunes dirigidos contra epítomos de NAC, que son eficaces para reducir la carga de placas de amiloide. Se entiende además que en dichas composiciones se puede emplear una gran variedad de anticuerpos. Como se discutió anteriormente, en la publicación de patente de EE.UU. US20060259986A1 y la publicación de patente PCT WO 05/013889 se proporcionan anticuerpos terminalmente específicos que se unen específicamente a fragmentos de alfa-sinucleína sin unirse específicamente a la alfa-sinucleína intacta *per se*.

Los anticuerpos usados en métodos terapéuticos tienen normalmente una región constante intacta o al menos parte suficiente de la región constante para interactuar con un receptor de Fc. Se prefiere el isotipo humano IgG1 ya que tiene la máxima afinidad de los isotipos humanos por el receptor FcRI sobre células fagocíticas. También se pueden usar fragmentos Fab biespecíficos en que un brazo del anticuerpo tiene especificidad por alfa-SN y el otro por un receptor de Fc. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN, opcionalmente en forma desnaturalizada, tal como cuando se trata con SDS, con una afinidad de unión superior o igual a aproximadamente  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  o  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. Algunos anticuerpos de la descripción se unen específicamente alfa-sinucleína humana en sinapsis o cuerpos de células neuronales, según se determina por inmunocitoquímica.

Los sueros policlonales contienen típicamente poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen a diversos epítomos por toda la longitud de alfa-SN. Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos para un segmento particular de alfa-SN, tal como NAC. Los sueros policlonales que son específicos para un segmento concreto contienen anticuerpos que se unen específicamente a ese segmento y carecen de anticuerpos que se unen específicamente a otros segmentos de alfa-SN. Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítopo específico dentro de alfa-SN que puede ser un epítopo conformacional o no conformacional. Los epítomos no conformacionales permanecen presentes cuando la alfa-SN es desnaturalizada con SDS. Las eficacias profiláctica y terapéutica de los anticuerpos pueden ser examinadas utilizando los procedimientos con modelos animales transgénicos descritos en los Ejemplos. Algunos anticuerpos monoclonales se unen a un epítopo dentro de NAC. En algunos métodos se emplean múltiples anticuerpos monoclonales que tienen especificidades ligantes hacia diferentes epítomos. Dichos anticuerpos pueden ser administrados sucesiva o simultáneamente. También se pueden utilizar anticuerpos hacia componentes de cuerpos de Lewy distintos de la alfa-SN. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden dirigir a neurofilamentos, ubiquitina o sinfilina. Los agentes terapéuticos también incluyen anticuerpos generados contra compuestos análogos a alfa-SN y fragmentos de la misma. Algunos agentes terapéuticos de la descripción son péptidos todo-D, por ejemplo, alfa-SN todo-D y NAC todo-D.

Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítopo dentro de restos especificados, tal como, por ejemplo, alfa-SN 1-5, lo que se quiere significar es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los restos especificados (es decir, alfa-SN 1-5 en este ejemplo). Dicho anticuerpo no entra necesariamente en contacto con cada resto de alfa-SN 1-5. Ni necesariamente cada sustitución o supresión individual de aminoácido dentro de alfa-SN 1-5 afecta significativamente a la afinidad de unión. Se puede determinar la especificidad epitépica de un anticuerpo, por ejemplo, formando un banco de presentación en fago en que diferentes miembros presentan diferentes subsecuencias de alfa-SN. Luego se seleccionan los miembros del banco de presentación en fago que se unen específicamente a un anticuerpo bajo ensayo. Se aísla una familia de secuencias. Típicamente, dicha familia

contiene una secuencia nuclear común y longitudes variables de secuencias flanqueadoras en los diferentes miembros. La secuencia nuclear más corta que muestra unión específica hacia el anticuerpo define el epítipo abarcado por el anticuerpo. También se puede examinar la especificidad epitópica de los anticuerpos en un ensayo de competición con un anticuerpo cuya especificidad epitópica ya ha sido determinada.

- 5 Algunos anticuerpos de la descripción se unen específicamente a un epítipo dentro de NAC. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de una forma glicosilada de 22 kilodáltones de sinucleína, por ejemplo, P22-sinucleína (H. Shimura et al., *Science*, 13 de julio de 2001: 293 (5528): 224-5).

- 10 Algunos anticuerpos de la descripción se unen a un epítipo del extremo N de alfa-SN (por ejemplo, un epítipo dentro de los aminoácidos 1-20 o los aminoácidos 1-10 de alfa-sinucleína, según se numeran de acuerdo con laID. SEC. nº 1). Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en que el resto N-terminal del epítipo es el resto N-terminal de la alfa-SN de longitud completa. Dichos anticuerpos no se unen a mutantes de alfa-sinucleína por supresión en que falta el resto 1. Algunos de tales anticuerpos no se unen a alfa-sinucleína de longitud completa en que el aminoácido N-terminal está unido a un polipéptido heterólogo. Algunos anticuerpos de la descripción se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-69 o los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo con un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado de los restos 1 a  $N_a$  de la ID. SEC. nº 1, donde  $N_a$  es de 5 a 20; los restos 2 a  $N_b$  de la ID. SEC. nº 1, donde  $N_b$  es de 6 a 21; o los restos 3- $N_c$  de la ID. SEC. nº 1, donde  $N_c$  es de 7 a 22. Algunos anticuerpos se unen a un epítipo dentro de un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN1-5, SN1-6, SN1-7, SN1-8, SN1-9, SN1-10, SN1-11, SN1-12, SN1-13, SN1-14, SN1-15, SN1-16, SN1-17, SN1-18, SN1-19 y SN1-20.

- 20 Algunos anticuerpos se unen a un epítipo de, o cerca de, el extremo C de alfa-SN (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 70-140, 100-140, 120-140, 130-140 o 135-140). Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en que el resto C-terminal del epítipo es el resto C-terminal de la alfa-SN (longitud completa). Dichos anticuerpos no se unen a mutantes de alfa-sinucleína por supresión en que falta el resto 140. Algunos de dichos anticuerpos no se unen a alfa-sinucleína de longitud completa en que el aminoácido C-terminal está unido a un polipéptido heterólogo. En algunos métodos el anticuerpo se une específicamente a NAC sin unirse a alfa-SN de longitud completa.

- 25 Algunos anticuerpos de la descripción se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140 o 83-140 de la alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo con un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado de entre 83-101, 107-125, 110-128 y 124-140. Algunos anticuerpos se unen a un epítipo dentro de un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN124-140, SN125-140, SN126-140, SN127-140, SN128-140, SN129-140, SN130-140, SN131-140, SN132-140, SN133-140, SN134-140, SN135-140, SN136-140, SN137-140, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN129-139, SN130-139, SN131-139, SN132-139, SN133-139, SN134-139, SN135-139, SN136-139, SN137-139, SN124-138, SN125-138, SN126-138, SN127-138, SN128-138, SN129-138, SN130-138, SN131-138, SN132-138, SN133-138, SN134-138, SN135-138, SN136-138, SN124-137, SN125-137, SN126-137, SN127-137, SN128-137, SN129-137, SN130-137, SN131-137, SN132-137, SN133-137, SN134-137, SN135-137, SN124-136, SN125-136, SN126-136, SN127-136, SN128-136, SN129-136, SN130-136, SN131-136, SN132-136, SN133-136 y SN134-136.

- 30 Algunos anticuerpos se unen a un epítipo dentro de un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado de los aminoácidos 90-140, 98-140, 108-136, 110-130 o 118-126 de alfa-sinucleína.

Algunos anticuerpos se unen a un epítipo con un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado de entre SN70-119, 80-109, 88-101, y 91-99 o 70-99.

- 35 Los anticuerpos monoclonales que se unen a epítipos de la región C-terminal se unen preferiblemente con elevada afinidad, por ejemplo, de al menos  $10^8$ ,  $10^9$  o  $10^{10} M^{-1}$ , a la alfa-sinucleína humana.

Algunos anticuerpos de la descripción reconocen específicamente alfa-SN fosforilada en la posición 129 (serina) y no se unen específicamente alfa-SN no fosforilada. Algunos anticuerpos se unen a un epítipo dentro del segmento SN 120-130 de alfa-sinucleína humana, tal como SN 124-134.

- 40 Los anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen específicamente a un segmento preferido de alfa-SN sin unirse específicamente a otras regiones de alfa-SN tienen diversas ventajas con respecto a los anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o a los sueros policlonales hacia alfa-SN intacta. En primer lugar, para dosis másicas iguales, las dosis de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una mayor dosis molar de anticuerpos eficaces para suprimir placas de amiloide. En segundo lugar, los anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de supresión contra LBs sin inducir una respuesta de supresión contra alfa-SN intacta, reduciéndose por ello la posibilidad de efectos secundarios.

Opcionalmente, se pueden explorar los anticuerpos en cuanto a su actividad profiláctica o terapéutica en animales transgénicos con enfermedad de LB, como se describió anteriormente. Opcionalmente, se explora previamente una

colección de anticuerpos en cuanto a su unión relativa a alfa-sinucleína humana desnaturalizada o un fragmento de la misma. Las afinidades ligantes relativas pueden ser estimadas a partir de intensidades de señal relativas en una inmunotransferencia. Se selecciona un anticuerpo que tiene una afinidad ligante relativa por encima de la media, o preferiblemente el anticuerpo que tiene la máxima afinidad ligante ensayada, para una ulterior exploración en animales transgénicos. Se puede llevar a cabo una exploración previa similar sobre anticuerpos de ensayo en cuanto a la unión a agregados de alfa-sinucleína en cortes tisulares por inmunocitoquímica. Se pueden obtener cortes tisulares del cerebro de un paciente enfermo o de un modelo de animal transgénico.

En una realización, se utiliza para inmunización pasiva el anticuerpo denominado 6H7, o un anticuerpo que compite con 6H7 por unirse específicamente a alfa-sinucleína. En una realización, se utiliza para inmunización pasiva el anticuerpo denominado 8A5, o un anticuerpo que compite con 8A5 por unirse específicamente a alfa-sinucleína. En una realización, se utiliza para inmunización pasiva el anticuerpo denominado 9E4, o un anticuerpo que compite con 9E4 por unirse específicamente a alfa-sinucleína. En una realización, se utiliza para inmunización pasiva el anticuerpo denominado 1H7, o un anticuerpo que compite con 1H7 por unirse específicamente a alfa-sinucleína. En una realización, se utiliza para inmunización pasiva el anticuerpo denominado 11A5, o un anticuerpo que compite con 11A5 por unirse específicamente a alfa-sinucleína. En algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo anteriormente mencionado en combinación con cada uno de los otros anticuerpos anti-alfa-sinucleína o con otros anticuerpos anti-alfa-sinucleína.

Como se describe en esta memoria, la administración de anticuerpos que reconocen epítomos en las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal de alfa sinucleína (es decir, 8A5 y 6H7) redujo los agregados de alfa-sinucleína en los cerebros de ratones transgénicos que sobreexpresaban alfa-sinucleína humana (véase, por ejemplo, el Ejemplo IX). Basándose en parte en este descubrimiento, se contempla que la administración en combinación de anticuerpos que reconocen un epítomo N-terminal (por ejemplo, como se describió anteriormente) y anticuerpos que reconocen un epítomo C-terminal (por ejemplo, como se describió anteriormente) sea particularmente eficaz en la profilaxis y la terapia. De esta manera, en un aspecto, la descripción proporciona un método para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro al administrar en combinación, a un paciente que tiene la enfermedad o presenta riesgo de desarrollarla, un régimen eficaz de un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítomo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana, restos que se numeran de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, y administrar un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítomo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana. Preferiblemente, el primer anticuerpo se une a un epítomo de alfa-sinucleína dentro de la secuencia de los restos 1 a  $N_a$  de la ID. SEC. nº 1, donde  $N_a$  es de 5 a 20; dentro de la secuencia de los restos 2 a  $N_b$  de la ID. SEC. nº 1, donde  $N_b$  es de 6 a 21; y/o dentro de la secuencia de los restos 3 a  $N_c$  de la ID. SEC. nº 1, donde  $N_c$  es de 7 a 22. Preferiblemente, el segundo anticuerpos se une específicamente a un epítomo dentro de los restos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Los anticuerpos primero y segundo se pueden administrar simultáneamente (por ejemplo, conjuntamente formulados), el mismo día, el mismo mes y/o como parte del mismo curso de terapia.

La descripción proporciona composiciones para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, que comprenden uno o más anticuerpos que se unen a una región terminal de alfa-sinucleína, por ejemplo, que tienen una especificidad anteriormente descrita. Las composiciones incluyen formulaciones y formas de dosificación que contienen dos o más anticuerpos. Las formulaciones ejemplares (adecuadas para anticuerpos en formulación conjunta) son conocidas en la técnica e incluyen las descritas más adelante en la Sección VII ("Regímenes de tratamiento").

La descripción proporciona también kits para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. Los kits incluyen dos (o más) anticuerpos, donde un primer anticuerpo se une a un epítomo del extremo N de la alfa-sinucleína humana y el segundo anticuerpos se une a un epítomo del extremo C de la alfa-sinucleína humana. Los anticuerpos se pueden combinar en una única preparación o en un kit para uso simultáneo. Alternativamente, los anticuerpos pueden ocupar recipientes separados (por ejemplo, viales, jeringas, tubos o similares) en un kit para uso simultáneo, sucesivo o separado. Estos anticuerpos pueden ser opcionalmente administrados en combinación con otros agentes que sean al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de la enfermedad de cuerpos de Lewy. Los kits pueden incluir además agentes que aumenten el paso de los anticuerpos de la descripción a través de la barrera hematoencefálica, otros adyuvantes y materiales para administración al paciente.

#### i. Características generales de las inmunoglobulinas

Se sabe que la unidad estructural básica de un anticuerpo comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, esencialmente responsable del reconocimiento antigénico. La porción carboxilo-terminal de cada cadena define una región constante, esencialmente responsable de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican en kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta y épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas

ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo además la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más (véase, en general, *Fundamental Immunology*, redactado por W. Paul, 2ª edición, Raven Press, New York, EE.UU., 1989, capítulo 7).

5 Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio ligante del anticuerpo. De este modo, un anticuerpo intacto tiene dos sitios ligantes. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios ligantes son iguales. Todas las cadenas presentan la misma estructura general de regiones de armazón (FR; del inglés, *framework region*) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs (del inglés, *complementarity determining regions*). Las CDRs de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones de armazón, lo que permite la unión a un epítipo específico. Del extremo N al extremo C, ambas cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU., 1987 y 1991); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); o Chothia et al., *Nature* 342: 878-883 (1989).

ii. Producción de anticuerpos no humanos

Los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen especificidades y afinidades de unión iguales o similares a las de un anticuerpo de ratón u otro anticuerpo no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos no humanos pueden ser humanizados injertando CDRs no humanas en regiones de armazón y constantes humanas, o incorporando los dominios variables no humanos completos ("encubriéndolos" opcionalmente con una superficie de tipo humano por sustitución de restos expuestos, en donde el resultado es un anticuerpo "revestido"). Véase, Gonzales et al., *Minimizing the immunogenicity of antibodies for clinical application*, *Tumour Biol.* 26 (1): 31-43 (2005). Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadenas ligera y pesada han sido construidos, típicamente mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de genes inmunoglobulínicos que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden ser unidos a segmentos constantes (C) humanos, tales como IgG1 e IgG4. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humano. En algunos métodos también se pueden utilizar anticuerpos IgM. Por lo tanto, un anticuerpo quimérico típico es una proteína híbrida que consiste en el dominio V o ligante de antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio C o efector de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos humanizados tienen restos de armazón de región variable sustancialmente de un anticuerpo humano (denominado "anticuerpo aceptor") y regiones determinantes de la complementariedad sustancialmente de un anticuerpo de ratón (al que se hace referencia como "inmunoglobulina dadora"). Véanse, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10.029-10.033 (1989), WO 90/07861, US 5.693.762, US 5.693.761, US 5.585.089, US 5.530.101, y Winter, US 5.225.539. La(s) región(es) constante(s), si está(n) presente(s), es (son) también sustancial o completamente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos se eligen normalmente de anticuerpos humanos cuyas secuencias de armazón presentan un alto grado de identidad secuencial con respecto a los dominios de región variable murinos de los cuales procedían las CDRs. Los restos de armazón de región variable de cadenas pesada y ligera pueden proceder de secuencias de anticuerpo humano iguales o diferentes. Las secuencias de anticuerpo humano pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos de origen natural o pueden ser secuencias de consenso de diversos anticuerpos humanos. Véase Carter et al., WO 92/22653. Ciertos aminoácidos de los restos de armazón de región variable humanos son seleccionados para sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de CDRs y/o la unión al antígeno. La investigación de dichas posibles influencias es por modelado, examen de las características de los aminoácidos en posiciones concretas, u observación empírica de los efectos de la sustitución o la mutagénesis de aminoácidos concretos.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto de armazón de región variable murino y un resto de armazón de región variable humano, el aminoácido de armazón humano debería ser normalmente sustituido por el equivalente aminoácido de armazón del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una directa y no covalentemente al antígeno,
- (2) esté adyacente a una región CDR,
- (3) si no, interacte con una región CDR (por ejemplo, esté dentro de aproximadamente 0,6 nm de una región CDR), o
- (4) participe en la interfase VL-VH.

Otros candidatos para sustitución son aminoácidos de armazón humana aceptora que son inusuales en esa posición de una inmunoglobulina humana. Estos aminoácidos pueden ser sustituidos por aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo dador de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Otros candidatos para sustitución son aminoácidos de armazón humana aceptora que son inusuales en esa

posición de una inmunoglobulina humana. Los armazones de región variable de inmunoglobulinas humanizadas muestran normalmente una identidad secuencial de al menos 85% con respecto a una secuencia de armazón de región variable humana o un consenso de dichas secuencias.

5 Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) procedentes del anticuerpo monoclonal mAb 6H7 de ratón. La línea celular denominada JH17.6H7.1.54.28 que produce el anticuerpo 6H7 tiene el número de acceso PTA-6910 de la ATCC, habiendo sido depositada bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) el 4 de agosto de 2005.

10 Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) procedentes del anticuerpo monoclonal mAb 8A5 de ratón. La línea celular denominada JH4.8A5.25.7.36 que produce el anticuerpo 8A5 tiene el número de acceso PTA-6909 de la ATCC, habiendo sido depositada el 4 de agosto de 2005.

15 Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) procedentes del anticuerpo monoclonal mAb 9E4 de ratón. La línea celular denominada JH17.9E4.3.37.1.14.2 que produce el anticuerpo 9E4 tiene el número de acceso PTA-8221 de la ATCC, habiendo sido depositada bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) el 26 de febrero de 2007.

20 Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) procedentes del anticuerpo monoclonal mAb 11A5 de ratón. La línea celular denominada JH22.11A5.6.29.70.54.16.14 que produce el anticuerpo 11A5 tiene el número de acceso PTA-8222 de la ATCC, habiendo sido depositada bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) el 26 de febrero de 2007.

25 Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) procedentes del anticuerpo monoclonal mAb 1H7 de ratón. La línea celular denominada JH17.1H7.4.24.34 que produce el anticuerpo 1H7 tiene el número de acceso PTA-8220 de la ATCC, habiendo sido depositada bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) el 26 de febrero de 2007.

30 Como se indicó anteriormente, se conocen diversos métodos para producir anticuerpos quiméricos y humanizados utilizando una línea celular que expresa anticuerpos (por ejemplo, un hibridoma). Por ejemplo, las regiones variables inmunoglobulínicas de los anticuerpos 8A5 y/o 6H7 y/o 9E4 de ratón pueden ser clonadas y secuenciadas utilizando métodos bien conocidos. Asimismo, las regiones variables inmunoglobulínicas de los anticuerpos 1H7 o 11A5 pueden ser clonadas y secuenciadas utilizando métodos bien conocidos. En un método, para ilustración y no para limitación, la región variable de cadena pesada VH es clonada por RT-PCR usando mRNA preparado a partir de células de hibridoma. Se emplean cebadores de consenso para el péptido líder de la región VH que abarca el codón de iniciación de la traducción como cebador 5' y un cebador 3' específico de regiones constantes de g2b. En la publicación de patente de EE.UU. US 2005/0009150 de Schenk et al. (en lo sucesivo, "Schenk") se describen cebadores ejemplares. Se pueden comparar las secuencias de múltiples clones independientemente obtenidos para asegurar que no se introducen cambios durante la multiplicación. La secuencia de la región VH puede ser también determinada o confirmada secuenciando un fragmento de VH obtenido mediante la metodología RT-PCR 5' RACE y el cebador 3' específico de g2b.

35 La región variable de cadena ligera VL de 8A5, 6H7, 9E4, 1H7 o 11A5 puede ser clonada de manera análoga a la de la región VH. En un planteamiento, un conjunto de cebadores de consenso diseñado para la multiplicación de regiones VL murinas es diseñado para que se hibriden con la región VL que abarca el codón de iniciación de la traducción y un cebador 3' específico para la región Ck murina cadena abajo de la región de unión V-J. En un segundo planteamiento, se emplea la metodología RT-PCR 5' RACE para clonar un cDNA que codifica VL. En Schenk se describen cebadores ejemplares. Las secuencias clonadas son luego combinadas con secuencias que codifican regiones constantes humanas.

40 En un planteamiento, las regiones variables de cadenas pesada y ligera son vueltas a modificar para que codifiquen secuencias dadoras de ajuste cadena abajo de las respectivas juntas VDJ o VJ y son clonadas en el vector de expresión de mamífero, tal como pCMV-hy1 para la cadena pesada y pCMV-hk1 para la cadena ligera. Estos vectores codifican regiones constantes  $\gamma$ 1 y Ck humanas como fragmentos exónicos cadena abajo del casete de región variable insertado. Después de la verificación de las secuencias, los vectores de expresión de cadena pesada y cadena ligera pueden ser utilizados para cotransfectar células COS para producir anticuerpos quiméricos. Los medios acondicionados se recogen 48 horas después de la transfección y se examinan mediante análisis por transferencia Western en cuanto a la producción de anticuerpos o mediante ELISA en cuanto a la unión a antígenos. Los anticuerpos quiméricos son humanizados del modo anteriormente descrito.



## iii. Anticuerpos humanos

Mediante una diversidad de técnicas descritas más adelante se obtienen anticuerpos humanos contra alfa-SN. Algunos anticuerpos humanos se seleccionan mediante experimentos de unión competitiva o, si no, por tener la misma especificidad epitópica que un anticuerpo particular de ratón, tal como uno de los anticuerpos monoclonales de ratón descritos en los Ejemplos IX y X. Los anticuerpos humanos pueden ser también explorados en cuanto a una especificidad epitópica particular utilizando sólo un fragmento de alfa-SN como inmunógeno, y/o explorando anticuerpos frente a una colección de mutantes de alfa-SN por delección. Los anticuerpos humanos tienen preferiblemente la especificidad isotípica IgG1 humano.

## (1) Metodología de triomas

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, han descrito la estrategia básica y una pareja de fusión celular ejemplar, SPAZ-4, para uso en esta estrategia. Las líneas celulares productoras de anticuerpo obtenidas por este método se denominan triomas porque descienden de tres células: dos humanas y una de ratón. Inicialmente, se fusiona una línea de mieloma de ratón 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, *supra*. Luego se fusiona la célula xenogénica con un linfocito B humano inmunizado para obtener una línea celular trioma que produce anticuerpos. Se ha hallado que los triomas producen anticuerpo más establemente que los hibridomas comunes obtenidos de células humanas.

Los linfocitos B inmunizados se obtienen de la sangre, el bazo, ganglios linfáticos o la médula ósea de un donante humano. Si se desean anticuerpos contra un antígeno o epítipo específico, es preferible emplear ese antígeno o un epítipo del mismo para la inmunización. La inmunización puede ser *in vivo* o *in vitro*. Para la inmunización *in vivo*, se aíslan típicamente células B de un ser humano inmunizado con alfa-SN, un fragmento de la misma, un polipéptido más grande que contiene alfa-SN o un fragmento, o un anticuerpo anti-idiotípico hacia un anticuerpo hacia alfa-SN. En algunos métodos, se aíslan células B del mismo paciente al que finalmente se va administrar la terapia por anticuerpos. Para la inmunización *in vitro*, se exponen típicamente linfocitos B al antígeno durante un período de 7-14 días en un medio tal como RPMI-1640 (véase Engleman, *supra*) complementado con plasma humano al 10%.

Los linfocitos B inmunizados son fusionados con una célula híbrida xenogénica tal como SPAZ-4 mediante métodos bien conocidos. Por ejemplo, se tratan las células con polietilenglicol de peso molecular 1000-4000 al 40-50%, a aproximadamente 37 °C, durante aproximadamente 5-10 minutos. Las células son separadas de la mezcla de fusión y son propagadas en medios selectivos para los híbridos deseados (por ejemplo, HAT o AH). Los clones que secretan anticuerpos que tienen la requerida especificidad ligante son identificados examinando el medio de cultivo de triomas en cuanto a la capacidad para unirse a alfa-SN o a un fragmento de la misma. Los triomas que producen anticuerpos humanos que tienen la especificidad deseada son subclonados mediante la técnica de dilución limitante y son cultivados *in vitro* en un medio de cultivo. Las líneas celulares de trioma obtenidas son luego examinadas en cuanto a la capacidad para unirse a alfa-SN o un fragmento de la misma.

Aunque los triomas son genéticamente estables, no producen anticuerpos en niveles muy elevados. Los niveles de expresión pueden ser aumentados clonando genes de anticuerpo del trioma en uno o más vectores de expresión y transformando líneas celulares estándares de mamífero, bacteria o levadura con el vector.

## (2) Mamíferos transgénicos no humanos

También se pueden producir anticuerpos humanos contra alfa-SN a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus inmunoglobulínico humano. Normalmente, el locus inmunoglobulínico endógeno de dichos mamíferos transgénicos está funcionalmente inactivado. Preferiblemente, el segmento del locus inmunoglobulínico humano incluye secuencias no reordenadas de componentes de cadenas pesada y ligera. Tanto la inactivación de genes inmunoglobulínicos endógenos como la introducción de genes inmunoglobulínicos exógenos se pueden llevar a cabo mediante recombinación homóloga dirigida o mediante la introducción de cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos que resultan de este proceso son capaces de reordenar funcionalmente las secuencias de componentes inmunoglobulínicos y expresar un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes inmunoglobulínicos humanos, sin que se expresen genes inmunoglobulínicos endógenos. La producción y las propiedades de mamíferos que tienen estas propiedades se describen con detalle en, por ejemplo, Lonberg et al., WO93/1222, US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741. Son particularmente adecuados los ratones transgénicos. Se obtienen anticuerpos anti-alfa-SN inmunizando un mamífero transgénico no humano, tal como describe Lonberg o Kucherlapati, *supra*, con alfa-SN o un fragmento de la misma. Se preparan anticuerpos monoclonales, por ejemplo, fusionando células B de dichos mamíferos con adecuadas líneas celulares de mieloma usando la tecnología convencional de Kohler-Milstein. También se pueden proporcionar anticuerpos policlonales humanos en forma de suero de seres humanos inmunizados con un agente inmunogénico. Opcionalmente, dichos anticuerpos policlonales pueden ser concentrados mediante purificación por afinidad utilizando alfa-SN u otro péptido amiloide como un reactivo de afinidad.

## (3) Métodos de presentación en fagos

Otro planteamiento para obtener anticuerpos humanos anti-alfa-SN es explorar un banco de DNA de células B humanas de acuerdo con el protocolo general esbozado por Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989). Como se describió para la metodología de triomas, dichas 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, dichas células B se obtienen de un paciente que va a recibir finalmente el tratamiento de anticuerpos. Se seleccionan anticuerpos que se unen a alfa-SN o a un fragmento de la misma. Luego se clonan y multiplican las secuencias que codifican dichos anticuerpos (o fragmentos ligantes). El protocolo descrito por Huse se vuelve más eficaz en combinación con la tecnología de presentación en fagos. Véanse, por ejemplo, Dower et al., WO 91/17271 y McCafferty et al., WO 92/01047, US 5.877.218, US 5.871.907, US 5.858.657, US 5.837.242, US 5.733.743 y US 5.565.332. En estos métodos, se producen bancos de fago cuyos miembros presentan diferentes anticuerpos en sus superficies externas. Los anticuerpos se presentan normalmente como fragmentos Fv o Fab. Los fagos que presentan anticuerpos con una especificidad deseada son seleccionados mediante enriquecimiento por afinidad hacia un péptido de alfa-SN o un fragmento del mismo.

En una variación del método de presentación en fagos, se pueden producir anticuerpos humanos que tengan la especificidad ligante de un anticuerpo murino seleccionado. Véase Winter, WO 92/20791. En este método se emplea como material de partida la región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera del anticuerpo murino seleccionado. Si, por ejemplo, se selecciona una región variable de cadena ligera como material de partida, se construye un banco de fagos cuyos miembros presentan la misma región variable de cadena ligera (es decir, el material de partida murino) y una diferente región variable de cadena pesada. Las regiones variables de cadena pesada se obtienen de un banco de regiones variables de cadena pesada humana reordenadas. Se selecciona un fago que muestra una potente unión específica para alfa-SN (por ejemplo, al menos  $10^8$  y preferiblemente al menos  $10^9 M^{-1}$ ). La región variable de cadena pesada humana de este fago sirve entonces como material de partida para construir otro banco de fagos. En este banco, cada fago presenta la misma región variable de cadena pesada (es decir, la región identificada del primer banco de presentación) y una diferente región variable de cadena ligera. Las regiones variables de cadena ligera se obtienen de un banco de regiones variables de cadena ligera humana reordenadas. De nuevo, se seleccionan los fagos que muestran una potente unión específica para alfa-SN. Estos fagos presentan las regiones variables de anticuerpos anti-alfa-SN completamente humanos. Estos anticuerpos tienen normalmente una especificidad epitópica igual o similar a la del material de partida murino.

## iv. Selección de la región constante

Las regiones variables de cadenas pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos pueden ser unidas a al menos una porción de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea toxicidad mediada por complemento y/o células dependiente de anticuerpos. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de complemento y los isotipos IgG2 e IgG4 no. La elección del isotipo puede también afectar al paso del anticuerpo al cerebro. Se prefiere el isotipo humano IgG1. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos se pueden expresar como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, como cadenas pesadas y cadenas ligeras separadas, como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, o como anticuerpos de cadena única en que los dominios variables de cadenas pesada y ligera están unidos por medio de un espaciador.

## v. Expresión de anticuerpos recombinantes

Se producen típicamente anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos mediante expresión recombinante. Las construcciones polinucleotídicas recombinantes incluyen típicamente una secuencia para control de la expresión operativamente unida a las secuencias codificadoras de cadenas de anticuerpo, incluyendo regiones promotoras naturalmente asociadas o heterólogas. Preferiblemente, las secuencias para control de la expresión son sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucarióticas. Una vez que el vector se ha incorporado al huésped apropiado, el huésped es mantenido bajo unas condiciones adecuadas para una expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y para la colección y purificación de los anticuerpos que reaccionan cruzadamente.

Estos vectores de expresión se pueden replicar típicamente en los organismos huésped bien como episomas o bien como una parte integral del DNA cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección, por ejemplo, de resistencia a ampicilina o resistencia a higromicina, para permitir la detección de las células transformadas con las secuencias de DNA deseadas.

La bacteria *E. coli* es un huésped procariótico particularmente útil para clonar las secuencias de DNA de la presente descripción. Microbios tales como las levaduras son también útiles para la expresión. Las levaduras *Saccharomyces* son levaduras huésped preferidas, con vectores adecuados que tienen secuencias para control de la expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen los de 3-fosfoglicerato cinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, los promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Las células de mamífero son un huésped preferido para que se expresen segmentos nucleotídicos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, *From Genes to Clones* (VCH Publishers, New York, EE.UU., 1987). Se ha desarrollado en la técnica un número de adecuadas líneas celulares huésped capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, incluyendo líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, células L, células renales embrionarias humanas, y líneas celulares de mieloma. Preferiblemente, las células son no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias para control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador [Queen et al., *Immunol. Rev.* 89: 49 (1986)], y sitios necesarios para información del procesamiento, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de ajuste de RNA, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias para control de la expresión preferidas son promotores procedentes de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino, y similares. Véase Co et al., *J. Immunol.* 148: 1149 (1992).

Alternativamente, se pueden incorporar secuencias codificadoras de anticuerpos a transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la subsiguiente expresión en la leche del animal transgénico (véanse, por ejemplo, US 5.741.957, US 5.304.489 y US 5.849.992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias de codificación para cadenas ligeras y/o pesadas en unión operativa con un promotor y un potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, tal como el de caseína o beta-lactoglobulina.

Los vectores que contienen los segmentos de DNA de interés pueden ser transferidos a la célula huésped mediante métodos bien conocidos, dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, se usa comúnmente la transfección con cloruro cálcico para células procarióticas, mientras que para otros huéspedes celulares se puede utilizar el tratamiento con fosfato cálcico, la electroporación, la lipofección, la biolística o la transfección de base viral. Otros métodos empleados para transformar células de mamífero incluyen el uso de Polybrene, la fusión de protoplastos, los liposomas, la electroporación y la microinyección (véase, en general, Sambrook et al., *supra*). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes se pueden microinyectar en ovocitos fertilizados, o se pueden incorporar al genoma de células madre embrionarias y transferir los núcleos de dichas células a ovocitos enucleados.

Una vez expresados, los anticuerpos pueden ser purificados de acuerdo con procedimientos estándares de la técnica, incluyendo purificación por HPLC, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, New York, EE.UU., 1982).

### 3. Productos de conjugación

Algunos agentes para inducir una respuesta inmune contienen el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmune contra LBs pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, se puede unir un inmunógeno peptídico a una molécula portadora adecuada para formar un producto de conjugación que ayude a provocar una respuesta inmune. Los vehículos adecuados incluyen albúminas séricas, hemocianina de *Megathura crenulata*, moléculas inmunoglobulínicas, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, o un toxoide de otras bacterias patógenas, tales como difteria, *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado toxínico atenuado. Los epítipos de células T son también moléculas portadoras adecuadas. Se pueden formar algunos productos de conjugación al unir agentes de la descripción con una molécula polimérica inmuoestimulante [por ejemplo, tripalmitoil-S-gliceril-cisteína (Pam<sub>3</sub>Cys), manano (un-polímero de manosa) o glucano (un polímero beta 1→2)], citocinas (por ejemplo, IL-1, péptidos IL-1 alfa y beta, IL-2, gamma-INF, IL-10, y GM-CSF) y quimiocinas (por ejemplo, MIP1 alfa y beta, y RANTES). También se pueden unir agentes inmunogénicos a péptidos que potencian el transporte a través de tejidos, como se describe en O'Mahony, WO 97/17613 y WO 97/17614. Los inmunógenos se pueden unir al portador con o sin aminoácidos espaciadores (por ejemplo, gly-gly).

Algunos productos de conjugación se pueden formar al unir agentes con al menos un epítipo de células T. Algunos epítipos de células T son promiscuos, mientras que otros epítipos de células T son universales. Los epítipos de células T promiscuos son capaces de potenciar la inducción de inmunidad de células T en una gran variedad de sujetos que presentan diversos tipos de HLA. Por contraste con los epítipos de células T promiscuos, los epítipos de células T universales son capaces de potenciar la inducción de inmunidad de células T en un gran porcentaje, por ejemplo, al menos el 75%, de sujetos que presentan diversas moléculas de HLA codificadas por diferentes alelos de HLA-DR.

Existe un gran número de epítipos de células T de origen natural, tales como el toxoide tetánico (por ejemplo, los epítipos P2 y P30), el antígeno superficial del virus de la hepatitis B, el toxoide de la tos ferina, la proteína F del virus del sarampión, la proteína principal de la membrana externa de *Chlamydia trachomatis*, el toxoide diftérico, T del circunsporozoito de *Plasmodium falciparum*, el antígeno CS de *Plasmodium falciparum*, la triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni*, TraT de *Escherichia coli*, y la hemaglutinina (HA) del virus de influenza. Los péptidos inmunogénicos de la descripción pueden ser también conjugados con los epítipos de células T descritos en F. Sinigaglia et al., *Nature* 336: 778-780 (1988); R. M. Chicz et al., *J. Exp. Med.* 178: 27-47 (1993); J. Hammer et al., *Cell* 74: 197-203 (1993); K. Falk et al., *Immunogenetics* 39: 230-242 (1994); WO 98/23635; y S. Southwood et al., *J. Immunology* 160: 3363-3373 (1998). Otros ejemplos incluyen:

Hemaglutinina de influenza: HA<sub>307-319</sub> PKYVKQNTLKLAT (ID. SEC. nº 4)

CS de malaria: epítipo T3 EKKIAMEKASSVFNV (ID. SEC. nº 5)

Antígeno superficial del virus de la hepatitis B: HBsAg<sub>19-28</sub> FLLTRILTI (ID. SEC. nº 6)

Proteína 65 de choque térmico: hsp65<sub>153-171</sub> DQSIGDLIAEAMDKVGN (ID. SEC. nº 7)

Bacilo Calmette-Guerin: QVHFQPLPPAVVKL (ID. SEC. nº 8)

5 Toxoide tetánico: TT<sub>830-844</sub> QYIKANSKFIGITEL (ID. SEC. nº 9)

Toxoide tetánico: TT<sub>947-967</sub> FNNFTVSFVLRVPKVSASHLE (ID. SEC. nº 10)

gp120 T1 de HIV: KQIINMWQEVGKAMYA (ID. SEC. nº 11).

10 Alternativamente, los productos de conjugación pueden ser formados al unir agentes de la invención con al menos un epítipo de células T artificial capaz de unirse a una gran proporción de moléculas del MHC de Clase II, tal como el panepítipo DR ("PADRE"; del inglés, pan DR epitope). El epítipo PADRE se describe en US 5.736.142, WO 95/07707, y J. Alexander et al., *Immunity* 1: 751-761 (1994). Un péptido PADRE preferido es AKXVAAWTLKAAA (ID. SEC. nº 12) (restos comunes en negrita), en donde X es preferiblemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la más preferida la ciclohexilalanina.

15 Los agentes inmunogénicos pueden ser unidos a portadores mediante entrecruzamiento químico. Las técnicas para unir un inmunógeno a un portador incluyen la formación de enlaces disulfuro utilizando 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) y 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, éste puede ser proporcionado mediante la adición de un resto de cisteína). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre ellos mismos y restos peptídicos de cisteína de una proteína, y un enlace amida a través del épsilon-amino de una lisina, u otro grupo amino libre de otros aminoácidos. En *Immun. Rev.* 62, 20 185 (1982), se describe una diversidad de dichos agentes formadores de disulfuro/amida. Otros agentes de copulación bifuncionales forman un enlace tioéter en vez de un enlace disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tioéter son comercialmente asequibles e incluyen ésteres reactivos del ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético, ácido 2-yodoacético y ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxilo pueden ser activados combinándolos con succinimida o la sal sódica del ácido 1-hidroxi-2-nitro-4-sulfónico.

25 Se puede mejorar la inmunogenicidad a través de la adición de restos espaciadores (por ejemplo, Gly-Gly) entre el epítipo T<sub>h</sub> y el inmunógeno peptídico de la descripción. Además de separar físicamente el epítipo T<sub>h</sub> del epítipo de células B (es decir, el inmunógeno peptídico), los restos de glicocola pueden alterar estructuras secundarias artificiales creadas por la unión del epítipo T<sub>h</sub> con el inmunógeno peptídico y, de este modo, eliminar la interferencia entre las respuestas de células T y/o B. Por lo tanto, la separación conformacional entre el epítipo cooperador y el dominio provocador de anticuerpos permite interacciones más eficaces entre el inmunógeno presentado y las apropiadas células T<sub>h</sub> y B.

35 Para potenciar la inducción de inmunidad de células T hacia un agente de la presente descripción en un gran porcentaje de sujetos que presentan diversos tipos de HLA, se puede preparar una mezcla de productos de conjugación con diferentes epítipos de células T<sub>h</sub>. La mezcla puede contener una mezcla de al menos dos productos de conjugación con diferentes epítipos de células T<sub>h</sub>, una mezcla de al menos tres productos de conjugación con diferentes epítipos de células T<sub>h</sub>, o una mezcla de al menos cuatro productos de conjugación con diferentes epítipos de células T<sub>h</sub>. La mezcla puede ser administrada con un adyuvante.

40 Los péptidos inmunogénicos se pueden también expresar como proteínas de fusión con portadores (es decir, péptidos heterólogos). El péptido inmunogénico se puede unir por su extremo amino, su extremo carboxilo o ambos a un portador. Opcionalmente, pueden estar presentes múltiples repeticiones del péptido inmunogénico en la proteína de fusión. Opcionalmente, un péptido inmunogénico puede estar unido a múltiples copias de un péptido heterólogo, por ejemplo, tanto por el extremo N como por el extremo C del péptido. Algunos péptidos portadores sirven para inducir una respuesta de células T cooperadoras contra el péptido portador. A su vez, las células T cooperadoras inducidas inducen una respuesta de células B contra el péptido inmunogénico unido al péptido portador.

45 Algunos agentes de la descripción comprenden una proteína de fusión en la que un fragmento N-terminal de alfa-SN está unido por su extremo C a un péptido portador. En dichos agentes, el resto N-terminal del fragmento de alfa-SN constituye el resto N-terminal de la proteína de fusión. En consecuencia, dichas proteínas de fusión son eficaces en cuanto a inducir anticuerpos que se unen a un epítipo que requiere que el resto N-terminal de alfa-SN esté en forma libre. Algunos agentes comprenden una pluralidad de repeticiones de NAC unidas por el extremo C a una o más copias de un péptido portador. Algunas proteínas de fusión comprenden diferentes segmentos de alfa-SN en tándem.

55 Algunos agentes comprenden una proteína de fusión en la que un fragmento C-terminal de alfa-SN está unido por su extremo N a un péptido portador. En dichos agentes, el resto C-terminal del fragmento de alfa-SN constituye el resto C-terminal de la proteína de fusión. En consecuencia, dichas proteínas de fusión son eficaces en cuanto a inducir

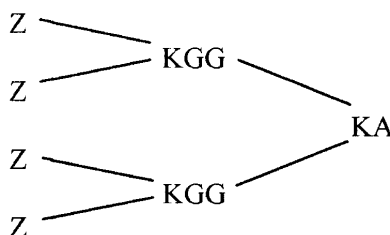
anticuerpos que se unen a un epítipo que requiere que el resto C-terminal de alfa-SN esté en forma libre. Algunos agentes comprenden una pluralidad de repeticiones de un péptido C-terminal, tal como SN125-140, unidas por el extremo N a una o más copias de un péptido portador. Algunas proteínas de fusión comprenden diferentes segmentos de alfa-SN en tándem.

- 5 En algunas proteínas de fusión, el NAC está fusionado por su extremo N-terminal con un péptido portador heterólogo. En algunas proteínas de fusión, el NAC está fusionado por su extremo C-terminal con un péptido portador heterólogo. Algunas proteínas de fusión comprenden un péptido heterólogo unido al extremo N o el extremo C de NAC, el cual, a su vez, está unido a uno o más segmentos NAC adicionales de alfa-SN en tándem. Algunas proteínas de fusión comprenden múltiples copias de un péptido C-terminal de alfa-sinucleína, como se describió anteriormente, y múltiples copias de un péptido heterólogo entrelazadas unas con otras.

10 En algunas proteínas de fusión, un fragmento de alfa-SN que no incluye el extremo C ni el extremo N (por ejemplo, SN110-130 o SN85-105) está fusionado por su extremo N-terminal con un péptido portador heterólogo. En algunas proteínas de fusión, el fragmento está fusionado por su extremo C-terminal con un péptido portador heterólogo. Algunas proteínas de fusión comprenden un péptido heterólogo unido al extremo N o el extremo C del fragmento, el cual, a su vez, está unido a uno o más fragmentos adicionales de alfa-SN en tándem. Algunas proteínas de fusión comprenden múltiples copias de un péptido de alfa-sinucleína, como se describió anteriormente, y múltiples copias de un péptido heterólogo entrelazadas unas con otras.

Más adelante se muestran algunos ejemplos de proteínas de fusión. Algunas de estas proteínas de fusión comprenden segmentos de alfa-SN (incluyendo cualesquiera de los fragmentos anteriormente descritos) unidos a epítipos del toxoide tetánico tal como se describe en 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 epítipos de células T promiscuos, mientras que otros péptidos heterólogos son epítipos de células T universales. En algunos métodos, el agente para administración es simplemente una sola proteína de fusión con un segmento de alfa-SN unido a un segmento heterólogo en configuración lineal. Los agentes terapéuticos de la descripción se pueden representar utilizando una fórmula. Por ejemplo, en algunos métodos, el agente es un multímero de proteínas de fusión representado por la fórmula  $2^x$ , en la que x es un número entero de 1 a 5. Preferiblemente, x es 1, 2 o 3, siendo 2 el valor más preferido. Cuando x es dos, dicho multímero tiene cuatro proteínas de fusión unidas en una configuración preferida a la que se hace referencia como MAP4 (véase US 5.229.490).

Más adelante se muestra la configuración MAP4, donde se producen estructuras ramificadas al iniciar la síntesis peptídica tanto por el extremo N como por aminas de cadena lateral de la lisina. Dependiendo del número de veces que se incorpora lisina a la secuencia y se deja que ramifique, la estructura resultante presentará múltiples extremos N. En este ejemplo, se han producido cuatro extremos N idénticos sobre el núcleo que contiene lisina ramificada. Dicha multiplicidad potencia en gran medida la sensibilidad de las células B afines.



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

Z = péptido 60-72 (región de NAC) de alfa-SN = NH<sub>2</sub>-KEQVTNVC GGAVVT-COOH (ID. SEC. nº 13)

Z = péptido 73-84 (región de NAC) de alfa-SN = NH<sub>2</sub>-GVTAVAQKTVECG-COOH (ID. SEC. nº 14)

Z = péptido 102-112 de alfa-SN = NH<sub>2</sub>-C-ácido aminoheptanoico-KNEEGAPCQEG-COOH (ID. SEC. nº 15)

40 péptido 128-140 de alfa-SN.

Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

Z-toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4:  
Z-QYIKANSKFIGITEL (ID. SEC. nº 16)

45 Z-toxoide tetánico 947-967 en una configuración MAP4:  
Z-FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE (ID. SEC. nº 17)

Z-toxoide tetánico<sub>830-844</sub> en una configuración MAP4:  
Z-QYIKANSKFIGITEL (ID. SEC. nº 18)

Z-toxoide tetánico<sub>830-844</sub> + toxoide tetánico<sub>947-967</sub> en una configuración lineal:  
 Z-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWRVLPKVSASHLE (ID. SEC. nº 19)

Péptido PADRE (todos en configuraciones lineales), en donde X es preferiblemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la más preferida la ciclohexilalanina-Z:

5 AKXVAAWTLKAAA-Z (ID. SEC. nº 20)

3Z-péptido PADRE:

Z-Z-Z-AKXVAAWTLKAAA (ID. SEC. nº 21)

Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

AKXVAAWTLKAAA-Z-Z-Z (ID. SEC. nº 22)

10 Z-AKXVAAWTLKAAA (ID. SEC. nº 23)

Z-ISQAVHAAHAEINEAGR (ID. SEC. nº 24)

PKYVKQNTLKLAT-Z-Z-Z (ID. SEC. nº 25)

Z-PKYVKQNTLKLAT-Z (ID. SEC. nº 26)

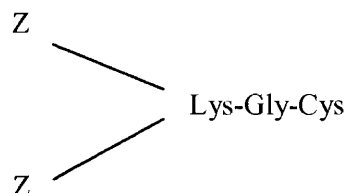
Z-Z-Z-PKYVKQNTLKLAT (ID. SEC. nº 27)

15 Z-Z-PKYVKQNTLKLAT (ID. SEC. nº 28)

Z-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE-Z-Z-Z-Z-QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE (ID. SEC. nº 29)

Z-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWRVLPKVSASHLE-Z-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWRVLPKVSASHLE-Z (ID. SEC. nº 30)

20 Z-QYIKANSKFIGITEL (ID. SEC. nº 31) sobre una resina 2-ramificada:



EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR (ID. SEC. nº 32)  
 (proteína de fusión de fragmento de sinucleína en configuración MAP4)

25 Se pueden emplear proteínas portadoras y métodos de unión iguales o similares para generar inmunógenos para ser utilizados en la generación de anticuerpos contra alfa-SN para uso en 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 agentes terapéuticos

30 También se pueden inducir respuestas inmunes contra cuerpos de Lewy mediante la administración de ácidos nucleicos que codifican segmentos de péptido de alfa-SN, y fragmentos de los mismos, otros inmunógenos peptídicos, o anticuerpos y sus cadenas componentes usadas para inmunización pasiva. Dichos ácidos nucleicos pueden ser DNA o RNA. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno está típicamente unido a elementos reguladores, tales como un promotor y un potenciador que permiten la expresión del segmento de DNA en las previstas células diana de un paciente. Para la expresión en células sanguíneas, como es deseable para la inducción de una respuesta inmune, elementos promotores y potenciadores de genes inmunoglobulínicos de cadena ligera o pesada o el promotor y el potenciador precoces intermedios principales de CMV son adecuados para expresión directa. Los elementos reguladores unidos y las secuencias de codificación se clonan a menudo en un vector. Para la administración de anticuerpos de doble cadena, las dos cadenas pueden ser clonadas en el mismo vector o en vectores separados. El ácido nucleico que codifica agentes terapéuticos de la descripción puede también codificar al menos un epítipo de células T. Las presentes descripciones que se refieren al uso de adyuvantes y al uso de portadores se aplican *mutatis mutandis* a su uso con el ácido nucleico que codifica agentes terapéuticos de la presente descripción.

Se dispone de diversos sistemas vectores víricos, incluyendo sistemas retrovíricos [véase, por ejemplo, Lawrie y Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)]; vectores adenovíricos [véase, por ejemplo, Bett et al., J. Virol.

67, 5911 (1993)]; vectores de virus adenoasociados [véase, por ejemplo, Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)], vectores víricos de la familia *Poxviridae*, incluyendo virus vaccinia y poxvirus aviares, vectores víricos del género *Alphavirus* tales como los derivados de los virus Sindbis y del bosque Semliki [véase, por ejemplo, Dubensky et al., J. Virol. 70, 508-519 (1996)], el virus de la encefalitis equina venezolana (véase US 5.643.576) y rhabdovirus, tales como el virus de la estomatitis vesicular (véase WO 96/34625), y papilomavirus [Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629, y Xiao y Brandsma, Nucleic Acids Res. 24, 2630-2622 (1996)].

El DNA que codifica un inmunógeno, o un vector que contiene el mismo, puede ser empaquetado en liposomas. En US 5.208.036, US 5.264.618, US 5.279.833 y US 5.283.185 se describen lípidos adecuados y compuestos análogos relacionados. Los vectores y el DNA que codifica un inmunógeno pueden ser adsorbidos por, o asociarse con, vehículos corpusculares, ejemplos de los cuales incluyen polímeros de poli(metacrilato de metilo) y polilactidas y poli(lactida-co-glicolidas) (véase, por ejemplo, McGee et al., J. Microencap. 1996).

Se pueden suministrar *in vivo* DNA desnudo o vectores para terapia génica mediante administración a un paciente individual, típicamente mediante administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica (véase, por ejemplo, US 5.399.346). Dichos vectores pueden incluir además agentes auxiliares tales como bupivacina (véase, por ejemplo, US 5.593.970). También se puede administrar DNA utilizando un cañón génico. Véase Xiao y Brandsma, *supra*. El DNA que codifica un inmunógeno es precipitado sobre la superficie de glóbulos metálicos microscópicos. Los microproyectiles son acelerados con una onda de choque o helio gaseoso en expansión y penetran en los tejidos hasta una profundidad de varias capas celulares. Por ejemplo, es adecuado el dispositivo para suministro génico Accel™ fabricado por Agacetus, Inc., Middleton, Wisconsin, EE.UU. Alternativamente, se puede hacer que DNA desnudo atraviese la piel hasta la corriente sanguínea simplemente salpicando el DNA sobre la piel con irritación química o mecánica (véase WO 95/05853).

En otra variación, se pueden suministrar vectores que codifican inmunógenos a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, productos de aspiración de médula ósea, y biopsias tisulares) o células madre hematopoyéticas de donantes universales, lo que va seguido de la reimplantación de las células a un paciente, normalmente después de la selección de las células que tienen el vector incorporado.

### III. Agentes para inducir una respuesta inmunogénica contra A $\beta$

El A $\beta$ , también conocido como péptido  $\beta$ -amiloide, o péptido A4 [véanse US 4.666.829; y Glenner y Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)], es un péptido de 39-43 aminoácidos que es el componente principal de las características placas de la enfermedad de Alzheimer. El A $\beta$  se genera mediante el procesamiento de una proteína más grande, APP, por dos enzimas, denominadas secretasas  $\beta$  y  $\gamma$  [véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)]. Se producen mutaciones conocidas en la APP, asociadas con la enfermedad de Alzheimer, próximas al sitio de la secretasa  $\beta$  o  $\gamma$  o dentro de A $\beta$ . Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de escisión de la APP por  $\gamma$ -secretasa en su procesamiento hasta A $\beta$ , y las posiciones 670/671 están próximas al sitio de escisión por  $\beta$ -secretasa. Se cree que las mutaciones causan la AD al interactuar con las reacciones de escisión mediante las cuales se forma A $\beta$  a fin de aumentar la cantidad generada de la forma de aminoácido 42/43 de A $\beta$ .

El A $\beta$  presenta la inusual propiedad de que puede fijar y activar las cascadas del complemento tanto clásica como alternativa. En particular, se une a C1q y finalmente a C3bi. Esta asociación facilita la unión a macrófagos, lo que conduce a la activación de células B. Además, el C3bi se rompe más y luego se une a CR2 de células B de un modo dependiente de células T, lo que conduce a un aumento de 10.000 en la activación de estas células. Este mecanismo causa que A $\beta$  genere una respuesta inmune superior a la de otros antígenos.

El A $\beta$  presenta diversas formas de origen natural. A las formas humanas de A $\beta$  se hace referencia como A $\beta$ 39, A $\beta$ 40, A $\beta$ 41, A $\beta$ 42 y A $\beta$ 43. Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor APP se ilustran mediante la Figura 1 de Hardy et al., TINS 20, 155-158 (1997). Por ejemplo, A $\beta$ 42 tiene la secuencia:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT (ID. SEC. n° 33).

A $\beta$ 41, A $\beta$ 40 y A $\beta$ 39 difieren de A $\beta$ 42 por la falta de Ala, Ala-Ile y Ala-Ile-Val, respectivamente, del extremo C-terminal. A $\beta$ 43 difiere de A $\beta$ 42 por la presencia de un resto de Thr en el extremo C.

Agentes análogos a los descritos anteriormente para alfa-SN han sido previamente descritos para A $\beta$  (véanse WO 98/25386 y WO 00/72880). Estos agentes incluyen A $\beta$  y fragmentos activos del mismo, productos de conjugación de A $\beta$  y productos de conjugación de fragmentos activos de A $\beta$ , anticuerpos hacia A $\beta$  y fragmentos activos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos de ratón, humanizados, humanos y quiméricos), y ácidos nucleicos que codifican cadenas de anticuerpo. Se prefieren los fragmentos activos de la mitad N-terminal de A $\beta$ . Los fragmentos inmunogénicos preferidos incluyen A $\beta$ 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 3-7, 1-3 y 1-4. Por ejemplo, la denominación A $\beta$ 1-5 indica un fragmento que incluye los restos 1-5 de A $\beta$  y que carece de otros restos de A $\beta$ . Son particularmente preferidos los fragmentos que comienzan en los restos 1-3 de A $\beta$  y acaban en los restos 7-11 de A $\beta$ .

Las descripciones de esta memoria que se refieren a agentes que inducen una respuesta inmune activa, agentes para inducir una respuesta inmune pasiva, productos de conjugación, y ácidos nucleicos que codifican agentes

terapéuticos (véanse las Secciones II. 1, 2, 3 y 4 anteriores) se aplican *mutatis mutandis* al uso de A $\beta$  y fragmentos del mismo. Las descripciones de esta memoria que se refieren a agentes que inducen una respuesta inmune activa, agentes para inducir una respuesta inmune pasiva, productos de conjugación, y ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos (véanse las Secciones II. 1, 2, 3 y 4 anteriores) se aplican *mutatis mutandis* al uso de A $\beta$  y fragmentos del mismo. Las descripciones de esta memoria que se refieren a pacientes susceptibles de tratamiento y a regímenes de tratamiento (véanse las Secciones IV y V posteriores) se aplican *mutatis mutandis* al uso de A $\beta$  y fragmentos del mismo.

A $\beta$  desagregado o fragmentos del mismo significa unidades peptídicas monoméricas. El A $\beta$  desagregado y los fragmentos del mismo son generalmente solubles y son capaces de autoagregarse para formar oligómeros solubles. Los oligómeros de A $\beta$  y fragmentos del mismo son normalmente solubles y existen predominantemente como hélices alfa o bucles aleatorios. A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo significa oligómeros de alfa-SN o fragmentos del mismo que se han asociado en conjuntos beta-laminares insolubles. A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo significa también polímeros fibrilares. Las fibrillas son normalmente insolubles. Algunos anticuerpos se unen a A $\beta$  soluble o fragmentos del mismo o a A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo. Algunos anticuerpos se unen tanto a A $\beta$  soluble o fragmentos del mismo como a A $\beta$  agregado o fragmentos del mismo.

Algunos ejemplos de productos de conjugación incluyen:

AN90549 (A $\beta$ 1-7-toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4):  
**DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL** (ID. SEC. nº 34)

AN90550 (A $\beta$ 1-7-toxoide tetánico 947-967 en una configuración MAP4):  
**DAEFRHD-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE** (ID. SEC. nº 35)

AN90542 (A $\beta$ 1-7-toxoide tetánico 830-844 + 947-967 en una configuración lineal):  
**DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE** (ID. SEC. nº 36)

AN90576: (A $\beta$ 3-9-toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4):  
**EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL** (ID. SEC. nº 37)

25 Péptido PADRE (todos en configuraciones lineales), en donde X es preferiblemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la más preferida la ciclohexilalanina:

AN90562 (PADRE-A $\beta$ 1-7):  
**AKXVAAWTLAAA-DAEFRHD** (ID. SEC. nº 38)

AN90543 (3 PADRE-A $\beta$ 1-7):  
**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA** (ID. SEC. nº 39)

Otros ejemplos de proteínas de fusión (epítipo inmunogénico de A $\beta$  en negrita) incluyen:

**AKXVAAWTLKAAA-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (ID. SEC. nº 40)

**DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA** (ID. SEC. nº 41)

**DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR** (ID. SEC. nº 42)

35 **FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR** (ID. SEC. nº 43)

**EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR** (ID. SEC. nº 44)

**PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (ID. SEC. nº 45)

**DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD** (ID. SEC. nº 46)

**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT** (ID. SEC. nº 47)

40 **DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT** (ID. SEC. nº 48)

**DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNQYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD** (ID. SEC. nº 49)

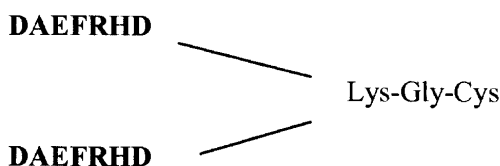
**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELNFTVSFWLR VPKVSASHLE** (ID. SEC. nº 50)

**DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE** (ID. SEC. nº 51)

45 **DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD** (ID. SEC. nº 52)

**DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL** (ID. SEC. nº 53) sobre una resina 2-ramificada.





Los anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítipo dentro de los restos 1-10 de A $\beta$  (con el primer resto N-terminal del A $\beta$  natural denominado 1). Algunos anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítipo dentro de los aminoácidos 1-5, y algunos aún epítipo dentro de 5-10. Algunos anticuerpos preferidos se unen a epítopos dentro de los aminoácidos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 o 3-7. Algunos anticuerpos preferidos se unen a un epítipo que comienza en los restos 1-3 y acaba en los restos 7-11 de A $\beta$ . Otros anticuerpos incluyen aquellos que se unen a epítopos con los restos 13-280 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 266). Los anticuerpos preferidos tienen el isotipo IgG1 humano.

#### IV. Exploración de anticuerpos en cuanto a actividad supresora

La descripción proporciona métodos para explorar un anticuerpo en cuanto a actividad en la supresión de un cuerpo de Lewy o cualquier otro antígeno, o un elemento biológico asociado, para el que se desea una actividad supresora. Para explorar la actividad contra un cuerpo de Lewy, una muestra tisular de un cerebro de un paciente con PD o de un modelo animal que tiene la patología característica de la enfermedad de Parkinson es puesta en contacto con células fagocíticas que portan un receptor de Fc, tales como células microgliales, y el anticuerpo bajo 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 algunos métodos, los componentes se combinan sobre un portaobjetos de microscopio para facilitar la determinación microscópica. En algunos métodos, se llevan a cabo múltiples reacciones en paralelo en los pocillos de una placa para microtitulación. En dicho formato, se puede montar un portaobjetos diminuto aparte para microscopio en los distintos pocillos, o se puede utilizar un formato de detección no microscópico, tal como la detección de alfa-SN por ELISA. Preferiblemente, se realiza una serie de mediciones de la cantidad de cuerpo de Lewy en la mezcla de reacción *in vitro*, comenzando desde un valor de línea de base antes de que haya transcurrido la reacción, y uno o más valores de ensayo durante la reacción. El antígeno puede ser detectado por tinción, por ejemplo, con un anticuerpo fluorescentemente marcado hacia alfa-SN u otros componentes de los LBs. El anticuerpo utilizado para la tinción puede ser o no igual al anticuerpo que se examina en cuanto a actividad supresora. Una reducción con respecto a la línea de base durante la reacción de los LBs indica que el anticuerpo bajo ensayo presenta actividad supresora. Es probable que dichos anticuerpos sean útiles en cuanto a prevenir o tratar la PD y otras LBD.

Se pueden emplear métodos análogos para explorar anticuerpos en cuanto a actividad en la supresión de otros tipos de elementos biológicos. El ensayo puede ser usado para detectar actividad supresora contra casi cualquier clase de elemento biológico. Típicamente, el elemento biológico ejerce algún papel en una enfermedad humana o animal. El elemento biológico puede ser proporcionado como una muestra tisular o en forma aislada. Si se proporciona como una muestra tisular, la muestra tisular se deja preferiblemente sin fijar para permitir el rápido acceso a componentes de la muestra tisular y evitar la perturbación de la conformación de los componentes relacionada con la fijación. Los ejemplos de muestras tisulares que se pueden examinar en este ensayo incluyen tejido canceroso, tejido precanceroso, tejido que contiene crecimientos benignos tales como verrugas o lunares, tejido infectado con microorganismos patógenos, tejido con células inflamatorias infiltradas, tejido que porta matrices patológicas entre células (por ejemplo, pericarditis fibrinosa), tejido que porta antígenos aberrantes, y tejido cicatrizal. Los ejemplos de elementos biológicos aislados que pueden ser empleados incluyen alfa-SN, antígenos víricos o virus, proteoglicanos, antígenos de otros microorganismos patógenos, antígenos tumorales y moléculas de adhesión. Dichos antígenos pueden ser obtenidos de fuentes naturales, por expresión recombinante o por síntesis química, entre otros medios. La muestra tisular o el elemento biológico aislado se pone en contacto con células fagocíticas que portan receptores de Fc, tales como monocitos o células microgliales, y el anticuerpo que se va a examinar en un medio. El anticuerpo se puede dirigir al elemento biológico bajo ensayo o a un antígeno asociado con el elemento. En la segunda situación, el objeto es probar si el elemento biológico es indirectamente fagocitado con el antígeno. Normal aunque no necesariamente, el anticuerpo y el elemento biológico (a veces con un antígeno asociado) se ponen en contacto entre sí antes de la adición de las células fagocíticas. Luego se determina la concentración del elemento biológico y/o el antígeno asociado, si está presente, que quedan en el medio. Una reducción de la cantidad o concentración del antígeno o del elemento biológico asociado en el medio indica que el anticuerpo tiene una respuesta supresora contra el antígeno y/o el elemento biológico asociado en conjunción con las células fagocíticas.

Los anticuerpos o demás agentes pueden ser también explorados en cuanto a actividad supresora de cuerpos de Lewy utilizando el ensayo *in vitro* descrito en el Ejemplo II. Células neuronales transfectadas con un vector de expresión que expresa sinucleína forman inclusiones de sinucleína que pueden ser microscópicamente visualizadas. La actividad de un anticuerpo u otro agente en cuanto a suprimir dichas inclusiones puede ser determinada comparando la aparición o el nivel de sinucleína en células transfectadas tratadas con agente, con la aparición o el nivel de sinucleína en células testigo no tratadas con el agente. Una reducción del tamaño o la intensidad de las inclusiones de sinucleína o una reducción del nivel de sinucleína indican actividad en cuanto a suprimir sinucleína.

La actividad puede ser determinada visualizando microscópicamente las inclusiones de sinucleína o desarrollando extractos celulares sobre un gel y visualizando una banda de sinucleína. Como se indicó en el Ejemplo 1, Sección 2, el cambio en el nivel de sinucleína es más acusado si los extractos son fraccionados en fracciones de citosol y de membrana y se analiza la fracción de membrana.

5 Los anticuerpos o demás agentes pueden ser también explorados en cuanto a actividad supresora de cuerpos de Lewy utilizando el ensayo *in vivo* descrito en el Ejemplo IX. En resumen, se inyecta un anticuerpo de ensayo en el neocórtex de ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína humana y tienen agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína. En un planteamiento, los animales empleados son ratones transgénicos heterocigóticos de 4 a 8 meses de edad que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína humana de tipo silvestre en el cerebro bajo el control transcripcional del promotor de PDGF (véase Masliah, 2000, Science 287: 1265-69). El anticuerpo de ensayo y los testigos (por ejemplo, anticuerpos testigo irrelevantes de isotipo equivalente) se disuelven en una disolución adecuada (por ejemplo, disolución salina estéril tamponada con fosfato) para inyección a ratones. Para cada ratón, se inyectan estereotácticamente 2  $\mu$ l de una disolución de anticuerpo de 2 mg/ml, bajo anestesia, en las capas profundas del neocórtex parietal del hemisferio cerebral derecho (lado ipsilateral). Los hemisferios izquierdos (lado contralateral) sirven como un testigo de línea de base para cada ratón. Se suturan los sitios de inyección y se controlan los ratones hasta que se recuperan de la anestesia. Dos semanas después de la inyección, los ratones son sacrificados y sus cerebros son extraídos, fijados en paraformaldehído al 4% durante 48 horas y cortados coronalmente con un grosor de 40  $\mu$ m. Los cortes alrededor del sitio de inyección son teñidos con un anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína (por ejemplo, ELADW-47, que reconoce los aminoácidos 115-122 de la  $\alpha$ -sinucleína). Para cada corte, se cuentan los agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína en 4 campos microscópicos (objetivo 20x) alrededor del sitio de inyección en el hemisferio ipsilateral y en 4 campos correspondientes en el hemisferio testigo contralateral. Para cada animal se añaden las cuentas de agregados de  $\alpha$ -sinucleína de dos cortes, y la diferencia entre las cuentas totales de agregados de  $\alpha$ -sinucleína entre los dos hemisferios determina el efecto del anticuerpo de ensayo sobre la supresión de agregados para cada ratón individual. Una reducción de las cuentas totales de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en el hemisferio tratado es indicativa de la actividad supresora de cuerpos de Lewy de los anticuerpos o demás agentes. Preferiblemente, se observa una reducción de al menos 10%. Más preferiblemente, se observa una reducción de al menos 20%, al menos 40%, al menos 60% o al menos 80%.

#### V. Pacientes susceptibles de regímenes de tratamiento con anti-componentes de cuerpos de Lewy

30 Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos que presentan riesgo de una enfermedad sinucleinopática pero no muestran síntomas, así como pacientes que en ese momento muestran síntomas. Los pacientes susceptibles de tratamiento también incluyen individuos que presentan riesgo de una enfermedad LBD pero no muestran síntomas, así como pacientes que en ese momento muestran síntomas. Dichas enfermedades incluyen la enfermedad de Parkinson (incluyendo la enfermedad de Parkinson idiopática), DLB, DLBD, LBVAD, insuficiencia autonómica pura, disfagia por cuerpos de Lewy, LBD secundaria, LBD heredada (por ejemplo, mutaciones del gen de alfa-SN, PARK3 y PARK4) y atrofia multisistémica (por ejemplo, atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome de Shy-Drager). Por lo tanto, los métodos presentes pueden ser llevados profilácticamente a cabo sobre individuos que presentan un riesgo genético conocido de una LBD. Dichos individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han sufrido esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia PD incluyen mutaciones en los genes de sinucleína o Parkin, UCHL1 y CYP2D6, particularmente mutaciones en la posición 53 del gen de sinucleína. Los individuos que en ese momento padecen la enfermedad de Parkinson pueden ser reconocidos por sus manifestaciones clínicas, que incluyen temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural.

45 En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas y/o indicios clínicos y/o factores de riesgo de toda enfermedad amiloidogénica y padece al menos una enfermedad sinucleinopática. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas y/o indicios clínicos y/o factores de riesgo de toda enfermedad caracterizada por depósitos extracelulares de amiloide. En algunos métodos, el paciente está libre de enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides de péptido A $\beta$ . En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas y/o indicios clínicos y/o factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas y/o indicios clínicos y/o factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo, deterioro cognitivo benigno y síndrome de Down. En algunos métodos, el paciente tiene una enfermedad de Alzheimer concurrente y una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el paciente tiene una enfermedad de Alzheimer concurrente y una enfermedad caracterizada por acumulación de sinucleína. En algunos métodos, el paciente tiene una enfermedad de Alzheimer concurrente y la enfermedad de Parkinson.

55 En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, a los 10, 20 o 30 años). Sin embargo, normalmente no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcanza los 40, 50, 60 o 70 años de edad. El tratamiento acarrea típicamente múltiples dosis a lo largo de un periodo de tiempo. El tratamiento puede ser controlado examinando las respuestas de anticuerpo o de células T o células B activadas al agente terapéutico (por ejemplo, péptido de alfa-SN o A $\beta$ , o ambos) a lo largo del tiempo. Si la respuesta disminuye se recomienda una dosis de refuerzo.

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

## VI. Pacientes susceptibles de regímenes de tratamiento con anti-componentes amiloides

Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos que presentan riesgo de enfermedad pero no muestran síntomas, así como pacientes que en ese momento muestran síntomas de amiloidosis. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, casi todo el mundo presenta riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer si vive lo suficiente. Por lo tanto, los métodos presentes pueden ser llevados profilácticamente a cabo sobre la población general sin necesidad de ninguna valoración del riesgo del paciente objetivo. Los métodos presentes son especialmente útiles para individuos que presentan un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer o de cualquiera de las otras enfermedades amiloides hereditarias. Dichos individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han sufrido esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 a las que se hace referencia, respectivamente, como mutaciones de Hardy y sueca (véase Hardy, TINS, *supra*). Otros marcadores de riesgo son mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, historia familiar de AD, hipercolesterolemia y aterosclerosis. Los individuos que en ese momento padecen la enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidos por la característica demencia y también por la presencia de factores de riesgo anteriormente descritos. Además, se dispone de un número de ensayos diagnósticos para identificar individuos que tienen AD. Estos incluyen la medición de los niveles de CSF tau y A $\beta$ 42. Niveles elevados de tau y disminuidos de A $\beta$ 42 significan la presencia de AD. Los individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer pueden ser también diagnosticados por criterios de MMSE o ADRDA, como se discute en la sección Ejemplos. En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, a los 10, 20 o 30 años). Sin embargo, normalmente no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcanza los 40, 50, 60 o 70 años de edad. El tratamiento acarrea típicamente múltiples dosis a lo largo de un periodo de tiempo. El tratamiento puede ser controlado examinando las respuestas de anticuerpo o de células T o células B activadas al agente terapéutico (por ejemplo, NAC) a lo largo del tiempo, de acuerdo con las líneas descritas más adelante en la sección VII: "Métodos de control y diagnóstico". Si la respuesta disminuye se recomienda una dosis de refuerzo.

## VII. Regímenes de tratamiento

En general, los regímenes de tratamiento implican administrar un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica a alfa-SN y/o un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica a A $\beta$  a un paciente. En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones farmacéuticas o medicamentos a un paciente susceptible de, o si no que presenta riesgo de, una LBD u otra enfermedad sinucleinopática en un régimen que comprende una cantidad y una frecuencia de administración de la composición o el medicamento suficientes para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retrasar el inicio de la enfermedad, incluyendo síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones o medicamentos a un paciente del que se sospecha que padece, o ya padece, dicha enfermedad en un régimen que comprende una cantidad y una frecuencia de administración de la composición suficientes para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), incluyendo sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, en algunos métodos, el tratamiento efectúa una supresión al menos parcial de cuerpos de Lewy, una desagregación al menos parcial de cuerpos de Lewy y/o reduce los niveles de oligómeros de alfa-sinucleína en las sinapsis. Una cantidad adecuada para llevar a cabo el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéutica o profilácticamente eficaz. Una combinación de cantidad y frecuencia de administración adecuadas para llevar a cabo el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como un régimen terapéutico o profilácticamente eficaz. En ambos regímenes profiláctico y terapéutico, los agentes se administran normalmente en varias dosis hasta que se ha alcanzado una respuesta inmune suficiente. Típicamente, se controla la respuesta inmune y se administran dosis repetidas si la respuesta inmune empieza a menguar.

En algunos métodos, la administración de un agente da lugar a una reducción de los niveles intracelulares de sinucleína agregada. En algunos métodos, la administración de un agente da lugar a una mejora en un síntoma clínico de una LBD, tal como la función motora en el caso de la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la reducción de los niveles intracelulares de sinucleína agregada o la mejora en un síntoma clínico de la enfermedad se controlan a intervalos de tiempo después de la administración de un agente.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de los estados anteriormente descritos varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Para optimizar la seguridad y la eficacia es necesario titular las dosis de tratamiento. La cantidad de inmunógeno depende de si también se administra un adyuvante, requiriéndose dosis mayores en ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunógeno para administración varía a veces de 1 a 500  $\mu$ g por paciente y más normalmente de 5 a 500  $\mu$ g por inyección para administración a seres humanos. Ocasionalmente se emplea una dosis mayor de 1-2 mg por inyección. Para cada inyección a seres humanos se emplean típicamente aproximadamente 10, 20, 50 o 100  $\mu$ g. La masa de inmunógeno

también depende de la proporción másica de epítipo inmunogénico dentro del inmunógeno a masa de inmunógeno en su totalidad. Típicamente, se utilizan de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  micromoles de epítipo inmunogénico por microgramo de inmunógeno. La regulación temporal de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, a una vez al año, a una vez al decenio. Cualquier día dado que se administra una dosis de inmunógeno, la dosis es superior a 1  $\mu\text{g}$ /paciente y normalmente superior a 10  $\mu\text{g}$ /paciente si también se administra un adyuvante, y superior a 10  $\mu\text{g}$ /paciente y normalmente superior a 100  $\mu\text{g}$ /paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos de tiempo, tal como a intervalos de 6 semanas. Otro régimen consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen acarrea una inyección cada dos meses durante toda la vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden seguir una base irregular según aconseje el control de la respuesta inmune.

Para inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosis varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o estar dentro del intervalo de 1 a 10 mg/kg o, en otras palabras, 70 mg o 700 mg o dentro del intervalo de 70 a 700 mg, respectivamente, para un paciente de 70 kg de peso. Un régimen de tratamiento ejemplar acarrea la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades ligantes, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. Se administra normalmente el anticuerpo en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos pueden ser también irregulares según aconseje la medición de los niveles sanguíneos de anticuerpo hacia alfa-SN en el paciente. En algunos métodos, se ajusta la dosis para alcanzar una concentración plasmática de anticuerpo de 1-1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y, en algunos métodos, 25-300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación ininterrumpida, en cuyo caso se requiere 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, seguidos 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 aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja en intervalos relativamente infrecuentes a lo largo de un periodo prolongado de tiempo. Algunos pacientes siguen recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere a veces una dosis relativamente elevada en intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Más tarde se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Las dosis de ácidos nucleicos que codifican inmunógenos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1  $\mu\text{g}$  a 10 mg, o 30-300  $\mu\text{g}$  de DNA por paciente. Las dosis para vectores víricos infecciosos varían de 10 a 100 o más viriones por dosis.

Los agentes para inducir una respuesta inmune pueden ser administrados por medio parenteral, tópico, intravenoso, oral, subcutáneo, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración más típica de un agente inmunogénico es la subcutánea, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se lleva muy típicamente a cabo en músculos del brazo o de la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo, por inyección intracraneal. Para la administración del anticuerpo se prefiere la inyección intramuscular o la infusión intravenosa. En algunos métodos, se inyectan directamente anticuerpos terapéuticos particulares en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos se administran como una composición o dispositivo de liberación ininterrumpida, tal como un dispositivo Medipad™.

Como se indicó anteriormente, los agentes que inducen una respuesta inmunogénica contra alfa-SN y A $\beta$ , respectivamente, se pueden administrar en combinación. Los agentes pueden ser combinados en una sola preparación o kit para uso simultáneo, sucesivo o separado. Los agentes pueden ocupar viales separados en la preparación o el kit o pueden ser combinados en un solo vial. Estos agentes pueden ser opcionalmente administrados en combinación con otros agentes que sean al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de la LBD. En el caso de la enfermedad de Parkinson y el síndrome de Down, en los que aparecen LBs en el cerebro, los agentes de la descripción pueden ser también administrados junto con otros agentes que aumenten el paso de los agentes a través de la barrera hematoencefálica.

Los agentes inmunogénicos de la descripción, tales como péptidos, se administran a veces en combinación con un adyuvante. Se puede utilizar una diversidad de adyuvantes en combinación con un péptido, tal como alfa-SN, para provocar una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin causar en el inmunógeno cambios conformacionales que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (MPL™) [véase GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, EE.UU., ahora parte de Corixa)]. Stimulon™ QS-21 es un glicósido triterpénico o saponina aislado de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina hallado en América del Sur [véanse Kensil et al. en "Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach"

- (redactado por Powell y Newman, Plenum Press, New York, EE.UU., 1995); Patente de EE.UU. nº 5.057.540 (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, Massachusetts, EE.UU.]. Otros adyuvantes son emulsiones de aceite (tal como escualeno o aceite de cacahuete) en agua, opcionalmente en combinación con agentes inmunoestimulantes, tal como monofosforil-lípido A [véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)], polímeros Pluronic y micobacterias muertas. Otro adyuvante es CpG (WO 98/40100). Alternativamente, se puede copular alfa-SN o A $\beta$  con un adyuvante. Sin embargo, dicha copulación no debería cambiar sustancialmente la conformación de alfa-SN como para afectar a la naturaleza de la respuesta inmune hacia la misma. Los adyuvantes pueden ser administrados como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden ser administrados separadamente, antes, concurrentemente con, o después de la administración del agente terapéutico.
- Una clase preferida de adyuvantes son las sales de aluminio, tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes se pueden utilizar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, y aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como poli(ácido glutámico) y polilisina. Otra clase de adyuvantes son las formulaciones en emulsión de aceite en agua. Dichos adyuvantes se pueden emplear con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos muramílicos [por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1',2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Ala-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi-propilamida (DTP-DPP) (Theramide™)], u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (WO 90/14837), que contiene escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5% y Span 85 al 0,5% (conteniendo opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE), formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador tal como el microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, Massachusetts, EE.UU.), (b) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero L121 de bloques de Pluronic al 5%, y thr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrométrica o ya sea agitado con formación de remolinos para generar una emulsión con partículas de mayor tamaño, y (c) el sistema adyuvante Ribi™ (RAS; del inglés, Ribi™ adjuvant system) (Ribi ImmunoChem, Hamilton, Montana, EE.UU.), que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS; del inglés, cell wall skeleton), preferiblemente MPL + CWS (Detox™).
- Otra clase de adyuvantes preferidos son los adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (QS-21, Aquila, Framingham, Massachusetts, EE.UU.) o partículas generadas a partir del mismo tales como ISCOMs (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen RC-529, GM-CSF y adyuvante completo de Freund (CFA; del inglés, complete Freund's adjuvant) y adyuvante incompleto de Freund (IFA; del inglés, incomplete Freund's adjuvant). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13 e IL-15), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF; del inglés, macrophage colony stimulating factor), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF; del inglés, granulocyte macrophage colony stimulating factor) y factor de necrosis tumoral (TNF; del inglés, tumor necrosis factor). Otra clase de adyuvantes son los compuestos glicolipídicos análogos que incluyen N-glicosilamidas, N-glicosilureas y N-glicosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el resto de azúcar con un aminoácido, como agentes inmunomoduladores o adyuvantes (véase la Patente de EE.UU. nº 4.855.283). También se pueden utilizar proteínas de choque térmico, por ejemplo, HSP70 y HSP90, como adyuvantes.
- Un adyuvante puede ser administrado con un inmunógeno como una sola composición o puede ser administrado antes, concurrentemente con, o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y el adyuvante pueden ser envasados y suministrados en el mismo vial o pueden ser envasados en viales separados y mezclarse antes de su uso. El inmunógeno y el adyuvante se envasan típicamente con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica prevista. Si el inmunógeno y el adyuvante se envasan separadamente, el envase incluye típicamente instrucciones para el mezclado antes del uso. La elección de un adyuvante y/o un portador depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de administraciones y la eficacia del adyuvante para la especie que va a ser vacunada, y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido aprobado o puede ser aprobado para la administración a seres humanos por los pertinentes organismos reguladores. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para la administración a seres humanos, se prefieren aluminio, MPL y QS-21. Opcionalmente, se pueden emplear simultáneamente dos o más adyuvantes diferentes. Las combinaciones preferidas incluyen aluminio con MPL, aluminio con QS-21, MPL con QS-21, MPL o RC-529 con GM-CSF, y aluminio, QS-21 y MPL juntos. También se puede usar adyuvante incompleto de Freund [Chang et al., Advanced Drug Delivery Reviews 32, 173-186 (1998)], opcionalmente en combinación con cualquiera de aluminio, QS-21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos.
- Los agentes de la descripción se administran a menudo como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, y una diversidad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase "Remington's Pharmaceutical Sciences" (15ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, EE.UU., 1980). Por lo tanto, se puede utilizar cualquier agente (por ejemplo, un fragmento de alfa-sinucleína o un anticuerpo que se une específicamente a alfa-sinucleína) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad sinucleinopática. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica previstas. Las composiciones pueden también incluir, dependiendo de la formulación, vehículos o diluyentes atóxicos y farmacéuticamente aceptables deseados, que se definen como vehículos comúnmente empleados para

formular composiciones farmacéuticas para administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona de modo que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Son ejemplos de dichos diluyentes: agua destilada, disolución salina fisiológica tamponada con fosfato, disoluciones de Ringer, disolución de dextrosa y disolución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica puede también incluir otros vehículos, adyuvantes, o agentes estabilizantes no inmunogénicos, no terapéuticos y atóxicos, y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden también incluir macromoléculas grandes de metabolismo lento tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos) y copolímeros (tales como látex funcionalizado con agarosa (Sepharose™), celulosa, y similares) aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Además, estos vehículos pueden actuar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

Para administración parenteral, los agentes de la descripción pueden ser administrados como 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, disolución salina, glicerol o etanol. Además, en las composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsivos, agentes tensioactivos, sustancias amortiguadoras del pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son aquellos de origen petrolero, animal, vegetal o sintético, tales como, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como el propilenglicol y el polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los anticuerpos se pueden administrar en forma de una preparación para implante o inyección en depósito, que puede ser formulada de tal modo que permita una liberación ininterrumpida del ingrediente activo. Una composición ejemplar comprende anticuerpo monoclonal en una concentración de 5 mg/ml, formulado en un tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM y NaCl 150 mM, con el pH ajustado a 6,0 con HCl. Típicamente, las composiciones para administración parenteral son sustancialmente estériles, sustancialmente isotónicas y fabricadas bajo las condiciones de "Good Manufacturing Practice" (Buena Práctica de Fabricación) de la FDA o un organismo similar. Por ejemplo, las composiciones que contienen sustancias biológicas se esterilizan típicamente mediante esterilización por filtración. Las composiciones pueden ser formuladas para administración de una sola dosis.

Las composiciones se preparan típicamente como productos inyectables, bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación puede ser también emulsionada o encapsulada en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para un efecto adyuvante potenciado, como se discutió anteriormente [véanse Langer, *Science* 249, 1527 (1990), y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997)]. Los agentes de esta descripción se pueden administrar en forma de una preparación para implante o inyección en depósito que puede ser formulada de tal modo que permita una liberación ininterrumpida o pulsátil del ingrediente activo. Las composiciones pueden ser formuladas en una forma de dosificación unitaria (es decir, la formulación contiene suficiente cantidad del ingrediente activo para una dosis a un paciente).

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

Para supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dicho supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 10%, preferiblemente de 1% a 2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones tienen la forma de disoluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación ininterrumpida o polvos y contienen 10%-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25%-70%.

La aplicación tópica puede conducir a suministro transdérmico o intradérmico. La administración tópica puede ser facilitada por la administración conjunta del agente con toxina colérica o derivados o subunidades destoxificados de la misma u otras toxinas bacterianas similares [véase Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1998)]. La administración conjunta puede ser llevada a cabo utilizando los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas por entrecruzamiento químico o por expresión como una proteína de fusión.

Alternativamente, se puede conseguir el suministro transdérmico utilizando un parche cutáneo o utilizando transferosomas [Paul et al., *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998)].

#### VIII. Métodos de control y métodos de diagnóstico

La descripción proporciona métodos para detectar una respuesta inmune contra péptido de alfa-SN y/o péptido Aβ en un paciente que padece una LBD o es susceptible de padecerla. Los métodos son particularmente útiles para controlar un curso de tratamiento que se administra a un paciente. Los métodos pueden ser empleados para controlar tanto el tratamiento terapéutico sobre pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico sobre pacientes asintomáticos. Los métodos son útiles para controlar tanto la inmunización activa (por ejemplo, el

anticuerpo producido en respuesta a la administración de un inmunógeno) como la inmunización pasiva (por ejemplo, medición del nivel del anticuerpo administrado).

### 1. Inmunización activa

5 Algunos métodos acarrean determinar un valor de línea de base de una respuesta inmune en un paciente antes de administrar una dosis de agente, y comparar ese valor con un valor para la respuesta inmune después del tratamiento. Un aumento significativo (es decir, superior al típico margen de error experimental en mediciones repetidas sobre la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales mediciones) del valor de la respuesta inmune indica un resultado de tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha conseguido o aumentado una respuesta inmune). Si el valor de la respuesta inmune no cambia significativamente o disminuye, se indica un resultado de tratamiento negativo. En general, se espera que los pacientes que están sometidos a un curso inicial de tratamiento con un agente inmunogénico muestren un aumento de la respuesta inmune con las sucesivas dosis, respuesta que alcanza finalmente una meseta. En general, se continúa la administración del agente mientras aumenta la respuesta inmune. La consecución de la meseta es un indicador de que el tratamiento administrado puede ser interrumpido o reducido en cuanto a dosis o frecuencia.

15 En otros métodos, se determina un valor testigo (es decir, una media y la desviación estándar) de la respuesta inmune para una población testigo. Típicamente, los individuos de la población testigo no han recibido un tratamiento previo. Los valores medidos de la respuesta inmune en un paciente después de la administración de un agente terapéutico son luego comparados con el valor testigo. Un aumento significativo con respecto al valor testigo (por ejemplo, superior a una desviación estándar de la media) indica un resultado de tratamiento positivo. Una falta de aumento significativo o una disminución indican un resultado de tratamiento negativo. En general, se continúa la administración del agente mientras aumenta la respuesta inmune con respecto al valor testigo. Como antes, la consecución de una meseta con respecto a los valores testigo es un indicador de que la administración del tratamiento puede ser interrumpida o reducida en cuanto a dosis o frecuencia.

25 En otros métodos, se determina un valor testigo de la respuesta inmune (por ejemplo, una media y la desviación estándar) de una población testigo de individuos que han sido sometidos a tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas inmunes han alcanzado una meseta en respuesta al tratamiento. Los valores medidos de la respuesta inmune en un paciente se comparan con el valor testigo. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, más de una desviación estándar) del valor testigo, se puede interrumpir el tratamiento. Si el nivel en un paciente es significativamente menor que el valor testigo, se justifica la administración continuada del agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor testigo, se puede indicar entonces un cambio en el régimen de tratamiento, por ejemplo, el uso de un adyuvante diferente.

35 En otros métodos, se controla la respuesta inmune de un paciente que no está recibiendo en ese momento un tratamiento pero que ha seguido un curso previo de tratamiento, para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de la respuesta inmune en el paciente puede ser comparado con un valor de la respuesta inmune previamente alcanzado en el paciente después de un curso de tratamiento previo. Una disminución significativa con respecto a la medida previa (es decir, superior a un típico margen de error en mediciones repetidas sobre la misma muestra) es una indicación de que se puede reanudar el tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor testigo (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de haber seguido un curso de tratamiento.

40 Alternativamente, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor testigo en poblaciones de pacientes profilácticamente tratados que siguen libres de síntomas de la enfermedad, o en poblaciones de pacientes terapéuticamente tratados que muestran una mejoría de características morbosas. En todos estos casos, una disminución significativa con respecto al nivel testigo (es decir, más de una desviación estándar) es un indicador de que se debería reanudar el tratamiento en el paciente.

45 La muestra tisular para el análisis es típicamente sangre, plasma, suero, moco o líquido cefalorraquídeo del paciente. Se analiza la muestra en cuanto a la indicación de una respuesta inmune hacia cualquier forma de alfa-SN, típicamente NAC, o A $\beta$ . La respuesta inmune puede ser determinada por la presencia de, por ejemplo, anticuerpos o células T que se unen específicamente a alfa-SN o A $\beta$ . En la sección Ejemplos se describen métodos ELISA para detectar anticuerpos específicos hacia alfa-SN. Anteriormente se han descrito métodos para detectar células T reactivas (véase "Definiciones"). En algunos métodos, la respuesta inmune se determina utilizando un ensayo de supresión, tal como se describió anteriormente en la Sección III. En dichos métodos, una muestra tisular o sanguínea de un paciente que está siendo examinado es puesta en contacto con LBs (por ejemplo, de un ratón transgénico para sinucleína/hAPP) y células fagocíticas que portan receptores de Fc. Luego se determina la subsiguiente supresión de los LBs. La existencia y el grado de respuesta supresora proporcionan una indicación de la existencia y el nivel de anticuerpos eficaces para suprimir alfa-SN en la muestra tisular del paciente bajo ensayo.

### 2. Inmunización pasiva

En general, los procedimientos para controlar la inmunización pasiva son similares a aquellos para controlar la inmunización activa anteriormente descritos. Sin embargo, el perfil de anticuerpos después de una inmunización pasiva muestra típicamente un pico inmediato en la concentración de anticuerpos seguido de un declive

exponencial. Sin una dosis más, el declive se aproxima a los niveles de pretratamiento en un período 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.

5 En algunos métodos, se realiza una medición de la línea de base del anticuerpo hacia alfa-SN en el paciente antes de la administración, poco después se realiza una segunda medición para determinar el nivel máximo de anticuerpo, y se realizan una o más mediciones adicionales en intervalos para determinar el declive de los niveles de anticuerpo. Cuando el nivel de anticuerpo ha decaído hasta la línea de base o hasta un porcentaje predeterminado del máximo menos la línea de base (por ejemplo, 50%, 25% o 10%), se administra otra dosis de anticuerpo. En algunos métodos, se comparan los niveles máximos o los niveles medidos subsiguientes menos el fondo con niveles de referencia previamente determinados por constituir un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico beneficioso en otros pacientes. Si el nivel de anticuerpo medido es significativamente menor que un nivel de referencia (por ejemplo, menor que la media menos una desviación estándar del valor de referencia en la población de pacientes que se benefician del tratamiento), se recomienda la administración de una dosis adicional de anticuerpo.

### 3. Kits diagnósticos

15 La descripción proporciona además kits diagnósticos para llevar a cabo los métodos diagnósticos anteriormente descritos. Típicamente, dichos kits contienen un agente que se une específicamente a anticuerpos hacia alfa-SN. El kit puede incluir también un marcador. Para la detección de anticuerpos hacia alfa-SN, el marcador está típicamente en forma de anticuerpos anti-idiotípicos marcados. Para la detección de anticuerpos, el agente puede ser suministrado previamente unido a una fase sólida, tal como los pocillos de una placa para microtitulación. Los kits también contienen típicamente un etiquetado que proporciona instrucciones para el uso del kit. El etiquetado puede también incluir un gráfico u otro régimen de correspondencia que correlaciona los niveles de etiqueta medida con los niveles de anticuerpos hacia alfa-SN. El término "etiquetado" se refiere a todo material escrito o grabado que está unido a, o si no acompaña a, un kit en todo momento durante su fabricación, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término "etiquetado" abarca folletos y prospectos publicitarios, materiales de envase, instrucciones, casetes de audio o vídeo, discos para ordenador y también inscripciones directamente impresas sobre los kits.

La descripción también proporciona kits diagnósticos para llevar a cabo la obtención de imágenes *in vivo*. Dichos kits contienen típicamente un anticuerpo que se une a un epítipo de alfa-SN, por ejemplo, dentro de NAC. Preferiblemente, el anticuerpo está marcado o se incluye un reactivo marcador secundario en el orden indicado en el en el kit. Preferiblemente, el kit está etiquetado con instrucciones para llevar a cabo un ensayo de obtención de imágenes *in vivo*.

En una realización, el anticuerpo es seleccionado de entre mAb 6H7, mAb 8A5, mAb 9E4, mAb 1H7 y mAb 11A5 y un fragmento ligante de los mismos. Los susodichos anticuerpos anti-alfa-sinucleína pueden ser también empleados en ensayos como los descritos en la publicación de patente de EE.UU. nº 2005/196818.

### IX. Obtención de imágenes *in vivo*

35 La descripción proporciona métodos para obtener imágenes *in vivo* de LBs en un paciente. Dichos métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de PD u otra enfermedad asociada con la presencia de LBs en el cerebro, o la susceptibilidad a las mismas. Por ejemplo, los métodos pueden ser utilizados sobre un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene LBs, es probable entonces que padezca, por ejemplo, PD. Los métodos pueden ser también empleados sobre pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos anormales de amiloide indica susceptibilidad a una futura enfermedad sintomática. Los métodos son también útiles para controlar la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes a los que se ha diagnosticado previamente enfermedad de Parkinson.

Los métodos se llevan a cabo administrando un reactivo, tal como un anticuerpo que se une a alfa-SN, al paciente y detectando luego el agente una vez que se ha unido. Los anticuerpos preferidos se unen a depósitos de alfa-SN en un paciente sin unirse al polipéptido NACP de longitud completa. Son particularmente preferidos los anticuerpos que se unen a un epítipo de alfa-SN dentro de NAC. Si se desea, se puede evitar la respuesta supresora utilizando fragmentos de anticuerpo que carecen de una región constante de longitud completa, tales como Fabs. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir como tratamiento y como reactivo diagnóstico. En general, los anticuerpos que se unen a epítopos N-terminales de alfa-SN no muestran una potente señal como anticuerpos que se unen a epítopos C-terminales, probablemente porque los epítopos N-terminales son inaccesibles en los LBs (Spillantini et al., PNAS, 1998). En consecuencia, dichos anticuerpos son menos preferidos.

Los reactivos diagnósticos se pueden administrar por inyección intravenosa en el cuerpo del paciente o directamente en el cerebro por inyección intracraneal o haciendo un agujero a través del cráneo. La dosis de reactivo debería estar dentro de los mismos intervalos que para los métodos de tratamiento. Típicamente, el reactivo está marcado aunque, en algunos métodos, el reactivo primario con afinidad por alfa-SN no está marcado y se emplea un agente marcador secundario para que se una al reactivo primario. La elección del marcador depende del medio de detección. Por ejemplo, para la detección óptica es adecuado un marcador fluorescente. El uso de marcadores paramagnéticos es adecuado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. También se pueden detectar



marcadores radiactivos utilizando PET o SPECT.

El diagnóstico se lleva a cabo comparando el número, el tamaño y/o la intensidad de los loci marcados con los correspondientes valores de línea de base. Los valores de línea de base pueden representar los niveles medios en una población de individuos no enfermos. Los valores de línea de base pueden representar también niveles determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, se pueden determinar los valores de línea de base en un paciente antes de que comience el tratamiento y se pueden comparar más tarde los valores medidos con los valores de línea de base. Una disminución de los valores con respecto a las señales de línea de base indica una respuesta positiva al tratamiento.

**Ejemplos**

10 Ejemplo I. la inmunización de ratones transgénicos para alfa-sinucleína humana con alfa-sinucleína humana da lugar a la producción de un alto título de anticuerpos anti-alfa-sinucleína que atraviesan la barrera hematoencefálica

Se resuspendió alfa-SN humana recombinante de longitud completa, en una concentración de 1 mg/ml, en disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) 1X. Para cada inyección se utilizaron 50 µl de alfa-SN, lo que proporcionaba una concentración final de 50 µg por inyección, a los que se añadieron 150 µl de PBS 1X. Luego se añadió adyuvante completo de Freund (CFA) 1:1 a alfa-SN o a PBS solo (testigo), y se realizaron una agitación con formación de remolinos y una sonicación para resuspender completamente la emulsión. Para las inyecciones iniciales, ocho ratones transgénicos (tg) para alfa-SN humana de línea D, de 4-7 meses de edad [Masliah et al., Science 287: 1265-1269 (2000)], recibieron inyecciones de alfa-SN humana en CFA y, como testigos, cuatro ratones tg para alfa-SN humana de línea D recibieron inyecciones de PBS en CFA. Los ratones recibieron un total de 6 inyecciones. Tres inyecciones se realizaron en intervalos de dos semanas y luego 3 inyecciones en intervalos de un mes. Los animales se sacrificaron usando las directrices del NIH para el tratamiento humano de animales 5 meses después del inicio del experimento. Una vez recogidas muestras de sangre para la determinación de los títulos de anticuerpo, se fijaron los cerebros por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS durante 4 días. En la Tabla 1 se muestran los niveles de anticuerpos contra alfa-SN humana por ELISA. Los ratones tratados se dividen en dos grupos por título. El primer grupo desarrolló un título moderado de 2-8000. El segundo grupo desarrolló un título elevado de 12.000-30.000. No se halló ningún título en los ratones testigo. El análisis neuropatológico mostró que los ratones que producían títulos elevados presentaban una acusada disminución en el tamaño de las inclusiones de sinucleína. Los ratones que producían títulos moderados mostraban una disminución menor. En la Figura 2 (secciones a-d) se muestran las inclusiones de sinucleína en (a) un ratón no transgénico, (b) un ratón transgénico tratado sólo con CFA, (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 por inmunotinción con un anticuerpo anti-alfa-SN humana. En la Figura 2 se muestran inclusiones de sinucleína en la sección (b) pero no en la sección (a). En la sección (c), ratón tratado, títulos moderados, las inclusiones tienen una intensidad algo reducida. En la sección (d), las inclusiones tienen una intensidad notablemente reducida. En las secciones (e)-(h) se muestran los niveles de anti-IgG en los cerebros de los mismos cuatro ratones que los de las secciones (a) a (d), respectivamente. Se puede ver que está presente IgG en las secciones (g) y, en mayor medida, en la sección (h). Los datos muestran que los anticuerpos hacia alfa-SN periféricamente administrados atraviesan la barrera hematoencefálica y alcanzan el cerebro. En las secciones (i) a (l) se muestra la tinción para GAP, un marcador de células astrogliales, de nuevo para los mismos cuatro ratones que en las primeras dos filas de la figura. Se puede ver que en las secciones (k) y (l) se muestra una tinción moderadamente aumentada en comparación con (i) y (j). Estos datos muestran que la supresión de depósitos de sinucleína va acompañada de una moderada reacción astrogliar y microglial.

Tabla 1

Grupo	Genotipo	n =	Edad al sacrificio	Tratamiento/duración	Títulos	Inclusiones syn (+)/mm2
I	Syn Tg	4	10-13 meses	a-syn+CFA, 50µg/inyec., durante 3 meses; sacrific. 3 meses después	2000-8000	15-29
II	Syn Tg	4	10-13 meses	a-syn+CFA, 50µg/inyec., durante 3 meses; sacrific. 3 meses después	12.000-30.000	10-22
III	Syn Tg	4	10-13 meses	PBS+CFA durante 3 meses; sacrificio 3 meses después	0	18-29

45

Ejemplo II. Exploración *in vitro* de anticuerpos que suprimen inclusiones de sinucleína

Se transfectaron células neuronales GT1-7 [Hsue et al., Am. J. Pathol. 157: 401-410 (2000)] con un vector de expresión pCR3.1-T (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) que expresa alfa-SN murina y se compararon con células transfectadas con vector de expresión solo (Figuras 3B y 3A, respectivamente). Las células transfectadas

con vector solo (A) tienen un aspecto fibroblástico, mientras que las células transfectadas con alfa-SN son redondeadas, con cuerpos de inclusión en la superficie celular visibles tanto por microscopía óptica como por microscopía confocal de barrido. Las células transfectadas fueron luego tratadas con suero preinmune de conejo (Figura 3C) o 67-10, un anticuerpo policlonal de conejo, purificado por afinidad, contra los restos C-terminales 131-140 de alfa-SN murina [Iwai et al., *Neuron* 14: 467 (1995)] (Figura 3D). Se puede ver que los cuerpos de inclusión están menos intensamente teñidos en la sección D que en la sección C, lo que indica que el anticuerpo contra alfa-sinucleína era eficaz en la supresión o prevención del desarrollo de inclusiones. En la Figura 4 se muestra un análisis, en gel, de fracciones corpusculares y citosólicas de células transfectadas GT1-7 tratadas con el suero preinmune de conejo y el anticuerpo policlonal 67-10. Se puede ver que los niveles de sinucleína en la fracción citosólica resultan en gran medida inalterados por el tratamiento con suero preinmune o anticuerpo hacia alfa-SN. Sin embargo, la banda de alfa-SN desaparece en la fracción de membrana de las células GT1-7 tratadas con anticuerpo hacia alfa-SN. Estos datos indican que la actividad del anticuerpo anti-alfa-sinucleína da lugar a la supresión de sinucleína asociada con la membrana celular.

También se pueden usar células GT1-7 transfectadas para explorar anticuerpos en cuanto a actividad supresora de inclusiones de sinucleína con detección por análisis inmunohistoquímico, microscopía óptica como en la Figura 3 o análisis en gel como en la Figura 4.

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

#### i. Inmunización de ratones tg para alfa-sinucleína humana

Para este estudio se emplean ratones (Línea D) transgénicos (tg) para alfa-SN humana heterocigóticos (Masliah et al., *Science* 286: 1265-69, 2000) y testigos no transgénicos (notg). Los animales experimentales se dividen en 3 grupos. Para el grupo I, se examinan los efectos preventivos de una inmunización precoz al inmunizar 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 más viejos 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 sólida patología. Para todos los grupos, los ratones se inmunizan con alfa-SN humana recombinante más CFA o con CFA solo y, para cada experimento, se utilizan 20 ratones tg y 10 ratones notg. De ellos, 10 ratones tg se inmunizan con alfa-SN humana + CFA y otros 10 ratones tg con CFA solo. Similarmente, se inmunizan 5 ratones notg con alfa-SN humana + CFA y los otros 5 con CFA solo. En resumen, el protocolo de inmunización consiste en una inyección inicial con alfa-SN humana recombinante purificada (2 mg/ml) en CFA, seguida de una nueva inyección 1 mes más tarde con alfa-SN humana en combinación con IFA. Los ratones reciben luego una nueva inyección con esta mezcla una vez al mes. En un pequeño subconjunto de ratones tg para alfa-SN humana (n = 3/cada uno; 6 meses de edad) y notg (n= 3/cada uno; 6 meses de edad), se llevan a cabo experimentos adicionales que consisten en inmunización con alfa-SN murina (m), beta-sinucleína humana o alfa-SN humana mutante (A53T).

Se determinan los niveles de anticuerpo anti-alfa-SN utilizando placas para microtitulación de 96 pocillos revestidas con 0,4 µg, por pocillo, de alfa-SN purificada de longitud completa mediante incubación durante la noche a 4 °C en tampón de carbonato sódico, pH de 9,6. Los pocillos son lavados 4 veces con 200 µl, cada vez, de PBS que contiene Tween al 0,1% y son bloqueados durante 1 hora en PBS-BSA al 1% a 37 °C. Se diluyen sucesivamente muestras de suero "en pocillo", 1:3, comenzando en la fila A, en dilución que varía de 1:150 a 1:328.050. Para los experimentos testigo se ensaya una muestra de anticuerpo monoclonal de ratón frente a blancos de alfa-SN, ninguna proteína, y sólo tampón. Las muestras son incubadas durante la noche a 4 °C, lo que va seguido de una incubación de 2 horas con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (1:7500, Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Luego se añade el sustrato fluorescente Atto-phos® para fosfatasa alcalina durante 30 minutos a temperatura ambiental. 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 gráficamente a escala semilogarítmica con unidades de fluorescencia relativas en ordenadas y dilución del suero en abscisas. El título de anticuerpos se define como la dilución a la que hubo una reducción del 50% con respecto a la unión máxima de anticuerpo.

Para cada grupo, al final del tratamiento, los ratones se someten a evaluación motora en un dispositivo "Rotarod" del modo descrito [Masliah et al. (2000)]. Después del análisis se sacrifican los ratones y se extraen los cerebros para un análisis neuroquímico y neuropatológico detallado, como se describe más adelante. En resumen, se congela y homogeneiza el hemisferio derecho para las determinaciones por transferencia Western de la inmunorreactividad de alfa-SN humana agregada y no agregada [Masliah et al. (2000)]. Se fija el hemisferio izquierdo en paraformaldehído al 4% y se corta sucesivamente en el vibratomo para el análisis inmunocitoquímico y ultraestructural.

#### ii. Análisis inmunocitoquímico y neuropatológico

Con objeto de determinar si disminuye la inmunización, se inmunotienen 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, se incuban los cortes con anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo, seguido de complejo de avidina D-

peroxidasa de rábano picante (HRP; del inglés, horseradish peroxidase) (1:200, ABC Elite, Vector). Los cortes son también inmunoteñidos con anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo, ratón o ser humano solo. Los experimentos con el anticuerpo secundario anti-ratón permiten determinar si los anticuerpos contra alfa-SN humana pasan al cerebro. La reacción se visualiza con tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencidina (DAB) al 0,1% en Tris-HCl 50 mM (pH de 7,4) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,001%, y luego se montan los cortes sobre portaobjetos bajo Entellan. Los niveles de inmunorreactividad son semicuantitativamente evaluados por densitometría óptica utilizando Quantimet 570C. Estos cortes son también estudiados por análisis de imágenes para determinar los números de inclusiones inmunorreactivas para alfa-SN, y esta medida fiable de agregación de alfa-SN sirve como un índice valioso de los efectos anti-agregación de la vacunación [Masliah et al. (2000)].

Se lleva a cabo el análisis de los patrones de neurodegeneración analizando densidades sinápticas y dendríticas en el hipocampo, el córtex frontal, el córtex temporal y los ganglios basales utilizando cortes por vibratomo doblemente inmunomarcados para sinaptofisina y proteína 2 asociada con microtúbulos (MAP2; del inglés, microtubule-associated protein 2) y visualizados por LSCM. Se lleva a cabo un análisis adicional de la neurodegeneración determinando la inmunorreactividad de tirosina hidrolasa (TH) en el caudoputamen y la sustancia negra (SN), como se describió previamente [Masliah et al. (2000)]. Se obtienen imágenes de los cortes con el LSCM y se determina interactivamente el umbral de cada imagen individual de modo que se incluya la intensidad de píxeles que presentan terminales inmunorreactivos para TH dentro de un intervalo lineal. Se ajusta una escala para determinar la relación de píxel a  $\mu\text{m}$ . Luego se emplea esta información para calcular el porcentaje de área del neuropilo cubierta por terminales inmunorreactivos para TH. Se utilizan también estos mismos cortes para evaluar los números de neuronas TH en el SN.

Para evaluar los patrones de respuesta inmune a la inmunización, se lleva a cabo un análisis inmunocitoquímico y ultraestructural con anticuerpos contra GFAP, MHC de clase II, Mac 1, TNF-alfa, IL-1-beta e IL-6 humanos en los cortes cerebrales de ratones notg y tg para alfa-SN inmunizados con alfa-SN humana recombinante e inmunógenos testigo.

### 25 iii. Análisis del comportamiento

Para la actividad locomotora se analizan ratones durante 2 días en el aparato Rotarod (San Diego Instruments, San Diego, California, EE.UU.) de la manera previamente descrita [Masliah et al. (2000)]. El primer día se entrenan los ratones para 5 pruebas: la primera a 10 rpm, la segunda a 20 rpm y la tercera a quinta a 40 rpm. El segundo día se examinan los ratones para 7 pruebas a 40 rpm cada una. Se colocan individualmente los ratones sobre el cilindro y se aumenta la velocidad de rotación de 0 a 40 rpm a lo largo de un periodo de 240 segundos. Se registra el tiempo que los ratones permanecen sobre la barra (latencia de caída) y se utiliza el registro como una medida de la función motora.

### Ejemplo 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 alfa-SN para determinar qué epitopos transmiten la respuesta eficaz. Se inyectan intraperitonealmente los 9 diferentes inmunógenos y un testigo del modo anteriormente descrito. Los inmunógenos incluyen cuatro productos de conjugación de péptido de alfa-SN humana, todos copulados a través de un enlace cistina con un anticuerpo anti-IgG de ratón, generado en oveja. Se utilizan alfa-SN y PBS como testigos positivo y negativo, respectivamente. Se controlan los títulos del modo anterior y se sacrifican los ratones al final de 3-12 meses de inyecciones. Se lleva a cabo un análisis post mórtem por histoquímica, niveles de alfa-SN y toxicología.

#### i. Preparación de inmunógenos

Preparación de péptidos de alfa-SN copulados: se preparan productos de conjugación de péptido de alfa-SN H por copulación a través de una cisteína artificial añadida al péptido de alfa-SN utilizando el reactivo de entrecruzamiento sulfo-EMCS. Los derivados de péptido de alfa-SN se sintetizan con las siguientes secuencias de aminoácidos finales. En cada caso, se indica por subrayado la posición del resto de cisteína insertado.

Péptido 60-72 de alfa-sinucleína (región de NAC):  
NH<sub>2</sub>-KEQVTNVCGGAVVT-COOH (ID. SEC. nº 54)

Péptido 73-84 de alfa-sinucleína (región de NAC):  
NH<sub>2</sub>-GVTAVAQKTVECG-COOH (ID. SEC. nº 55)

50 Péptido 102-112 de alfa-sinucleína:  
NH<sub>2</sub>-C-ácido aminoheptanoico-KNEEGAPCQEG-COOH (ID. SEC. nº 56)

Péptido 128-140 de alfa-sinucleína:  
Ac-NH-PSEEGYQDYEPCEA-COOH (ID. SEC. nº 57)

55 Para preparar la reacción de copulación, se dializan diez mg de anticuerpo anti-IgG de ratón, generado en oveja (Jackson ImmunoResearch Laboratories), durante la noche frente a tampón de borato sódico 10 mM, pH de 8,5. El

anticuerpo sometido a diálisis es luego concentrado hasta un volumen de 2 ml utilizando un tubo Amicon Centriprep. Se disuelven diez mg de sulfo-EMCS [N-(ε-maleimidocaproiloxi)succinimida] (Molecular Sciences Co.) en un ml de agua desionizada. Se añade gota a gota, con agitación, un exceso molar de 40 veces de sulfo-EMCS al anticuerpo anti-IgG de ratón, generado en oveja, y luego se agita la disolución durante diez minutos adicionales. Se purifica el anticuerpo activado anti-IgG de ratón, generado en oveja, y se cambia el tampón haciendo pasar aquél a través de una columna para filtración en gel de 10 ml de capacidad (Pierce Presto Column, obtenida de Pierce Chemicals), equilibrada con NaPO<sub>4</sub> 0,1 M, EDTA 5 mM, pH de 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpo, identificadas por absorbancia a 280 nm, son reunidas y son diluidas hasta una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, utilizándose 1,4 mg por unidad de densidad óptica como coeficiente de extinción. Se disuelve un exceso molar de 40 veces de péptido de alfa-SN en 20 ml de NaPO<sub>4</sub> 10 mM, pH de 8,0, con la excepción del péptido de alfa-SN para el cual se disuelven primero 10 mg en 0,5 ml de DMSO y luego se diluye la disolución hasta 20 ml con el tampón de NaPO<sub>4</sub> 10 mM. Se añade cada una de las disoluciones peptídicas a 10 ml de anticuerpo activado anti-IgG de ratón, generado en oveja, y se sacuden las mezclas a temperatura ambiental durante 4 horas. Los productos de conjugación resultante son concentrados hasta un volumen final inferior a 10 ml utilizando un tubo Amicon Centriprep y son luego sometidos a diálisis frente a PBS para cambiar el tampón y separar el péptido libre. Los productos de conjugación son hechos pasar a través de filtros con un tamaño de poro de 0,22 μm para esterilización y son luego repartidos en fracciones alícuotas de 1 mg y guardados congelados a -20 °C. Las concentraciones de los productos de conjugación se determinan utilizando el ensayo del BCA para proteínas (Pierce Chemicals) con IgG de caballo para la curva patrón. La conjugación viene documentada por el aumento de peso molecular de los péptidos conjugados con respecto al del anticuerpo activado anti-IgG de ratón, generado en oveja.

Ejemplo V. Inmunización pasiva con anticuerpos hacia alfa-sinucleína

Se inyectan 0,5 mg de anticuerpos monoclonales anti-alfa-SN en PBS, como se muestra más adelante, a ratones transgénicos para alfa-SN humana. Todas las preparaciones de anticuerpos se purifican para que tengan bajos niveles de endotoxina. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales contra un fragmento inyectando el fragmento o una forma más larga de alfa-SN a un ratón, preparando hibridomas y explorando los hibridomas en cuanto al anticuerpo que se une específicamente a un fragmento deseado de alfa-SN sin unirse a otros fragmentos no solapantes de alfa-SN.

Los ratones reciben inyecciones intraperitoneales según sea necesario a lo largo de un periodo de 4 meses para mantener un título de anticuerpos circulantes hacia alfa-SN u otro inmunógeno, medido por ELISA, superior a 1:1000. Se controlan los títulos como antes y se sacrifican los ratones al final de 6 meses de inyecciones. Se lleva a cabo un análisis post mórtem por histoquímica, niveles de alfa-SN y toxicología.

Ejemplo VI. Inmunización de ratones transgénicos Syn/APP con Aβ

Este experimento permite comparar los efectos de la inmunización con aβ sobre tres tipos de ratones transgénicos: ratones transgénicos con un transgén de alfa-sinucleína (syn), ratones app con un transgén app (Games et al.) y ratones doblemente transgénicos SYN/APP producidos por cruce de ratones transgénicos simples. Los ratones doblemente transgénicos son descritos por Masliah et al., PNAS USA 98: 12.245-12.250 (2001). Estos ratones representan un modelo de individuos que tienen tanto enfermedad de Alzheimer como enfermedad de Parkinson. En la Tabla 2 se muestran los diferentes grupos, la edad de los ratones empleados en el estudio, el procedimiento de tratamiento y el título de anticuerpos hacia Aβ. Se puede ver que se generó un título significativo en los tres tipos de ratones. En la Figura 5 se muestra el porcentaje de área cubierta por placas amiloides de Aβ en el cerebro, determinado mediante el examen de cortes cerebrales de los sujetos tratados por microscopía. Se acumulan depósitos sustanciales en los ratones APP y SYN/APP pero no en los ratones SYN ni en los testigos no transgénicos. Los depósitos son más grandes en los ratones doblemente transgénicos SYN/APP. La inmunización con Aβ<sub>1-42</sub> reduce los depósitos tanto en los ratones APP como en los ratones SYN/APP. En la Figura 6 se muestran los depósitos de sinucleína en los diferentes grupos de ratones, según se detectan por microscopía óptica y microscopía confocal de barrido por láser. Se acumulan depósitos de sinucleína en los ratones SYN y SYN/APP tratados sólo con CFA. Sin embargo, en los mismos tipos de ratones tratados con Aβ<sub>1-42</sub> y CFA hay una notable reducción en el nivel de depósitos de sinucleína. Estos datos indican que el tratamiento con Aβ es eficaz no sólo en cuanto a suprimir depósitos de Aβ sino también en cuanto a suprimir depósitos de sinucleína. Por lo tanto, el tratamiento con Aβ o anticuerpos hacia el mismo es útil en el tratamiento no sólo de la enfermedad de Alzheimer sino de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson combinadas, y de la enfermedad de Parkinson en pacientes libres de enfermedad de Alzheimer. El título de anticuerpos anti-Aβ en los ratones SYN/APP se correlacionaba con una formación disminuida de inclusiones de sinucleína (r = -0,71, p < 0,01).

Tabla 2

Grupo	n =	Edad	Tratamiento/duración	Títulos de Ab
SYN	4	12-20 meses	Inyec. de Ab, 50 μg/inyec., durante 6 meses	10.000-58.000
SYN	2	12-20 meses	Inyección de Sal durante 6 meses	0
APP	2	12-20 meses	Inyec. de Ab, 50 μg/inyec., durante 6 meses	25.000

APP	2	12-20 meses	Inyección de Sal durante 6 meses	0
SYN/APP	4	12-20 meses	Inyec. de Ab, 50 µg/inyec., durante 6 meses	1000-50.000
SYN/APP	2	12-20 meses	Inyección de Sal durante 6 meses	0

#### Ejemplo VII. Ensayo de exploración *ex vivo* de la actividad de un anticuerpo contra depósitos de amiloide

Para examinar el efecto de anticuerpos sobre la supresión de placas, establecimos un ensayo *ex vivo* en el que se cultivaban células microgliales primarias con cortes por criostato no fijados de cerebro humano con AD o de cerebro de ratón PDAPP. Se obtuvieron células microgliales de las cortezas cerebrales de ratones DBA/2N neonatales (1-3 días). Las cortezas fueron mecánicamente disociadas en disolución salina equilibrada de Hanks (HBSS; del inglés, Hanks's balanced salt solution) (Sigma) con 50 µg/ml de DNasa I (Sigma). Las células disociadas fueron filtradas con un tamiz celular de 100 µm (Falcon) y fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. Se resuspendió el sedimento de centrifugación en medio de cultivo (DMEM con alto contenido en glucosa, FBS al 10%, 25 ng/ml de rmGM-CSF) y se sembraron las células con una densidad de 2 cerebros por matraz de cultivo de plástico T-75. Después de 7-9 días, se hicieron girar los matraces en un agitador orbital a 200 rpm durante 2 horas a 37 °C. La suspensión celular fue centrifugada a 1000 rpm y fue resuspendida en el medio de ensayo.

Se descongelaron-montaron cortes de 10 µm por criostato de cerebro humano con AD o de cerebro de ratón PDAPP (intervalo post mórtem < 3 h) sobre cubreobjetos redondos de vidrio revestidos con polilisina y se colocaron en pocillos de placas para cultivo tisular de 24 pocillos. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con medio de ensayo que consistía en medio exento de suero para hibridomas (H-SFM; del inglés, hybridoma-serum free medium) (Gibco BRL) con FBS al 1%, glutamina, penicilina/estreptomina, y 5 ng/ml de rmGM-CSF (R&D). Se añadieron testigo o anticuerpos anti-Aβ en una concentración 2x (5 µg/ml al final) durante 1 hora. Luego se sembraron las células microgliales en una densidad de 0,8 x 10<sup>6</sup> células/ml de medio de ensayo. Se mantuvieron los cultivos en una incubadora humidificada (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%) durante 24 horas o más. Al final de la incubación, los cultivos fueron fijados con paraformaldehído al 4% y fueron permeabilizados con Triton-X100 al 0,1%. Los cortes fueron teñidos con 3D6 biotinilado seguido de un producto de conjugación de estreptavidina/Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Las células microgliales exógenas se visualizaron mediante un tinte nuclear (DAPI). Se observaron los cultivos con un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon, TE300) y se tomaron fotomicrografías con una cámara digital SPOT utilizando el software SPOT (Diagnostic Instruments). Para el análisis por transferencia Western, los cultivos fueron extraídos en urea 8 M, diluidos 1:1 en tampón de tricina para muestras con agente reductor y cargados en un gel tricina al 16% (Novex). Después de la transferencia a membranas Immobilon, las transferencias fueron expuestas a pAbAβ42 en concentración de 5 µg/ml y luego a un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP y fueron desarrolladas con ECL (Amersham).

Cuando el ensayo se llevó a cabo con cortes de cerebro PDAPP en presencia de un anticuerpo contra un NAC, se observó una acusada reducción en el número y el tamaño de las placas, indicativa de actividad supresora del anticuerpo. Se puso un anticuerpo hacia NAC en contacto con una muestra de tejido cerebral que contenía placas de amiloide y células microgliales, como se discutió anteriormente. Se utilizó suero de conejo como un testigo.

Se llevó a cabo el mismo ensayo con cortes de cerebro PDAPP en presencia de varios anticuerpos contra Aβ. Se compararon las capacidades de los anticuerpos para inducir fagocitosis en el ensayo *ex vivo* y para reducir *in vivo* la carga de placas en estudios de transferencia pasiva. Estos resultados muestran que la eficacia *in vivo* se debe a la supresión directa de las placas del CNS mediada por anticuerpos, y que el ensayo *ex vivo* permite predecir la eficacia *in vivo* (véanse las Tablas 16 y 17 del Ejemplo XIV del documento WO 00/72880; y el Ejemplo XIV, Tabla 16, del documento WO 00/72876).

#### Ejemplo VIII. Inmunización activa con alfa-sinucleína

##### A. Materiales y métodos

*Vacunación de ratones tg para ha-sinucleína:* Para este estudio se emplearon ratones tg heterocigóticos (Línea D) que expresaban ha-sinucleína bajo el control regulador del promotor del factor β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFβ; del inglés, platelet-derived growth factor-β) (Masliah, 2000, Science 287: 1265-69). Se seleccionaron estos animales porque desarrollan inclusiones inmunorreactivas para ha-sinucleína en el cerebro así como déficits neurodegenerativos y motores que remedian ciertos aspectos de la LBD. Los animales experimentales se dividieron en dos grupos. Para el primer grupo, se inmunizó un total de 20 ratones tg jóvenes (3 meses de edad) durante 8 meses con ha-sinucleína recombinante (n = 10) o adyuvante solo (n = 10). Para el segundo grupo, se inmunizó un total de 20 ratones tg adultos jóvenes (6 meses de edad) durante 8 meses con ha-sinucleína recombinante (n = 10) o adyuvante solo (n = 10). El protocolo de inmunización consistía primero en una inyección de ha-sinucleína recombinante (80 µg/ml; 100 µl) con adyuvante completo de Freund (CFA). Dos semanas más tarde los ratones recibían otra inyección de ha-sinucleína (80 µg/ml; 100 µl) con FA incompleto, seguida de una nueva inyección de ha-sinucleína (80 µg/ml; 100 µl) en disolución salina tamponada con fosfato una vez al mes (durante los 7 meses subsiguientes). La ha-sinucleína recombinante se preparó y purificó del modo descrito por Masliah et al., 2005, Neuron 46: 857-68, y se examinó para endotoxinas.

*Determinación de los títulos de anticuerpos y la afinidad relativa hacia  $\alpha$ -sinucleína:* Se determinaron los niveles de anticuerpos hacia  $\alpha$ -sinucleína en el plasma usando placas para microtitulación de 96 pocillos revestidas con 0,4  $\mu$ g de  $\alpha$ -sinucleína purificada de longitud completa por pocillo. Las muestras se incubaron durante la noche a 4 °C, lo que fue seguido de lavado y de incubación con anticuerpo anti-IgG de ratón, generado en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina (1:7500, Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.). La placa fue leída a una longitud de onda de excitación de 450 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. Los resultados se representaron gráficamente a escala semilogarítmica con unidades de fluorescencia relativas en ordenadas y dilución del suero en abscisas. El título de anticuerpo se definió como la dilución a la que había una reducción de la unión máxima de anticuerpo del 50%.

Para determinar la afinidad relativa para  $\alpha$ -sinucleína de los anticuerpos generados en los ratones vacunados, se llevaron a cabo dos conjuntos de experimentos. En el primero, se desarrollaron productos de homogeneización cerebrales de ratones tg para  $\alpha$ -sinucleína no inmunizados en un aparato de múltiples canales con minigel (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). Se incubó cada canal con el suero diluido de cada uno de los ratones, y se transfirió el producto a nitrocelulosa y se incubó con anticuerpo secundario anti-ratón, generado en conejo, seguido de proteína A marcada con  $^{125}$ I [Alford et al., J. Histochem. Cytochem. 42: 283-287 (1994)]. Se obtuvieron imágenes de las transferencias y se analizaron con PhosphorImager (Molecular Dynamics, Piscataway, New Jersey, EE.UU.). Para el segundo conjunto de experimentos, se incubaron cortes sucesivos de un ratón tg para  $\alpha$ -sinucleína no inmunizado, mediante vibratomo, en el suero diluido de cada uno de los ratones tratados, seguido de anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón (1:100, Vector), generado en caballo, avidina D-peroxidasa de rábano picante (HRP, 1:200, ABC Elite, Vector), y se hicieron reaccionar con tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB) que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,001%. Después de un examen microscópico, los cortes fueron calificados de acuerdo con la clasificación del compartimento celular (cuerpos de células neuronales, sinapsis e inclusiones) y el grado de inmunorreactividad (0 = ninguno; 1 = muy leve; 2 = leve; 3 = moderado; 4 = intenso).

*Mapeo epitópico de anticuerpos hacia  $\alpha$ -sinucleína:* Se determinaron los epítomos reconocidos por anticuerpos hacia  $\alpha$ -sinucleína mediante un ensayo ELISA que permite medir la unión de un anticuerpo a péptidos lineales solapantes que cubren la secuencia completa de  $\alpha$ -sinucleína. Se prepararon péptidos C-terminalmente biotinilados con secuencias de  $\alpha$ -sinucleína (Mimotopes, San Diego, California, EE.UU.) como péptidos de 15 aminoácidos (aa) de longitud con un solapamiento de 12 restos y un paso de 3 restos por péptido. Se utilizó un total de 43 péptidos para recorrer la secuencia completa de 140 aa de la  $\alpha$ -sinucleína, teniendo el último péptido un solapamiento de 13 aa y un paso de 2 aa. Además, se repitieron los 3 últimos péptidos pero con la biotinilación llevada a cabo en su extremo N. Esto se realizó para mejorar el acceso de los anticuerpos al extremo C de los péptidos y permitir la identificación de anticuerpos específicos para el extremo C libre. Además, se añadieron otras características a este ensayo para permitir un examen más a fondo de las interacciones entre anticuerpos y la región (61-95) del componente (NAC) no beta-amiloide (A $\beta$ ) de  $\alpha$ -sinucleína. Puesto que el 21º péptido de este ensayo ya contiene el extremo N libre de la región NAC, se añadió un péptido N-terminalmente biotinilado adicional que contiene el extremo C libre de la región NAC para completar el ensayo con un total de 47 péptidos.

Para realizar el ensayo, se dejó que estos péptidos biotinilados en concentración 5 nM revistieran durante la noche placas para ELISA previamente revestidas con estreptavidina (Pierce, Rockford, Illinois, EE.UU.). Luego se lavaron las placas y se añadieron muestras de suero, diluidas hasta un equivalente de título de 6, para una incubación de 1 hora. Las muestras de suero con títulos inferiores a 5000 fueron diluidas 1:1000 para esta incubación. Después de otra operación de lavado, se detectaron los anticuerpos unidos utilizando segundos anticuerpos específicos de especie conjugados con HRP en un formato de ELISA colorimétrico.

*Procesamiento de tejidos:* Se sacrificaron los ratones y se extrajeron sus cerebros para un análisis neuroquímico y neuropatológico detallado, como se describe más adelante. En resumen, el hemisferio derecho fue congelado y homogeneizado para determinaciones de inmunorreactividad hacia  $\alpha$ -sinucleína agregada y no agregada por transferencia Western (Masliah et al., 2000, *supra*). El hemisferio izquierdo fue fijado en paraformaldehído (PFA) al 4% y fue seccionado secuencialmente con el vibratomo (Leica, Wetzlar, Alemania) para análisis inmunocitoquímico (ICC; del inglés, *immunocytochemistry*) y ultraestructural.

*Preparaciones sinaptosómicas y análisis por inmunotransferencia:* Para determinar los efectos de la vacunación sobre la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en los cerebros de ratones tg, se prepararon fracciones sinaptosómicas utilizando gradientes de sacarosa y se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida tris-acetato al 10% (NuPAGE™, Invitrogen). Las inmunotransferencias fueron sondadas con anticuerpos primarios contra  $\alpha$ -sinucleína (LB509, 1:1000, Transduction Laboratories, San Diego, California, EE.UU.) y sinaptofisina (1:20, Chemicon, Temecula, California, EE.UU.) y con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, generado en cabra y marcado con HRP (1:5000, SantaCruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, EE.UU.), y fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia potenciada y analizadas con un aparato Versadoc XL (BioRad, Hercules, California, EE.UU.) para obtención de imágenes.

*Análisis neuropatológico e inmunocitoquímico:* En resumen, como se describió previamente (Masliah et al., 2000, *supra*), para investigar los efectos de la vacunación sobre la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína, se incubaron cortes sucesivamente realizados, de flotación libre y de codificación ciega, realizados con vibratomo, durante la noche a 4 °C, con un anticuerpo específico anti- $\alpha$ -sinucleína purificado por afinidad (72-10, policlonal de conejo, 1:500),

preparado del modo previamente descrito (Masliah et al., 2000, *supra*) al inmunizar conejos con péptidos sintéticos de  $\alpha$ -sinucleína consistentes en los aa 101-124. La incubación con el anticuerpo primario fue seguida del anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo (1:100, Vector), generado en cabra, avidina D-HRP (1:200, ABC Elite, Vector), y de reacción con tetrahidrocloruro de DAB que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,001%. Los cortes fueron analizados con el aparato Quantimet 570C (Leica) con objeto de determinar el número de inclusiones inmunorreactivas para  $\alpha$ -sinucleína en el neocórtex. Para cada caso se analizaron tres cortes, y los resultados se promediaron y se expresaron como números por milímetro cuadrado. Se llevó a cabo otro análisis inmunocitoquímico haciendo inmunorreaccionar los cortes con anticuerpos contra marcadores gliales que incluían CD45 (1:1000, DakoCytomation, Carpinteria, California, EE.UU.) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP; del inglés, glial fibrillary acidic protein; 1:500, Chemicon).

Se llevó a cabo un análisis inmunocitoquímico doble del modo previamente descrito [Hashimoto et al., Neuron 32: 213-223 (2001)] para determinar los efectos de la vacunación sobre la densidad de terminales nerviosos y la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en sinapsis. Con esta finalidad, se marcaron doblemente cortes por vibratomo con un anticuerpo policlonal contra  $\alpha$ -sinucleína (1:1000) y con el anticuerpo monoclonal contra sinaptofisina (Chemicon). Se detectó la  $\alpha$ -sinucleína con Tyramide Red (1:2000, Roche) y la sinaptofisina con anticuerpo anti-IgG de ratón, generado en caballo y marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; del inglés, fluorescein isothiocyanate). Para cada caso, los cortes fueron inmunomarcados por duplicado y analizados con el microscopio confocal de barrido por láser (LSCM; del inglés, laser scanning confocal microscope) y el software NIH Image 1.43 para calcular el porcentaje de área del neuropilo cubierta por terminales inmunorreactivos para sinaptofisina en el neocórtex [Mucke et al., J. Neurosci. 20: 4050-4058 (2000)] y la proporción de terminales inmunorreactivos para sinaptofisina que eran positivos para  $\alpha$ -sinucleína. Con objeto de confirmar la especificidad de los anticuerpos primarios, se llevaron a cabo experimentos de control en los que se incubaron cortes durante la noche en ausencia de anticuerpo primario (suprimido), con el anticuerpo primario preadsorbido durante 48 horas con un exceso de 20 veces del péptido correspondiente o con suero preinmune.

Todos los cortes se procesaron simultáneamente bajo las mismas condiciones, y los experimentos se llevaron dos veces a cabo para evaluar la reproducibilidad de los resultados. Se obtuvieron imágenes de los cortes con un objetivo Zeiss 63X (N.A. 1.4) en un microscopio Axiovert 35 (Zeiss, Alemania), con un sistema MRC1024 LSCM unido (BioRad, Watford, Reino Unido) (Masliah et al., 2000, *supra*).

*Análisis estadístico:* Se llevaron a cabo comparaciones estadísticas entre los grupos utilizando la prueba t de Student de dos colas para muestras independientes. Se llevó a cabo un análisis por regresión lineal para determinar la relación entre las variables. Se aplicó la corrección de Bonferroni para dar cuenta de comparaciones múltiples.

## B. Resultados

### *Caracterización de títulos de anticuerpos, afinidad y mapeo epitópico*

Se analizaron los títulos de anticuerpos en 3 puntos temporales (2 semanas, 6 meses y 9 meses después de la vacunación) en ambos grupos experimentales. Los títulos de anticuerpos variaban considerablemente entre los ratones; en los animales que pertenecían al grupo I, los títulos de anticuerpos de los ratones inmunizados con  $\alpha$ -sinucleína variaban de 200 a 20.000 (Tabla 3).

Tabla 3. Sumario de títulos hacia  $\alpha$ -sinucleína y afinidad por inmunotransferencia (corregida en cuanto al título)

Grupo	Afinidad de anticuerpos por minitransferencia	Afinidad de anticuerpos hacia sinapsis	Afinidad de anticuerpos hacia inclusiones	Títulos de anticuerpos (primera sangría)	Títulos de anticuerpos (segunda sangría)	Títulos de anticuerpos (tercera sangría)
Grupo I/ $\alpha$ -syn	109.147 $\pm$ 2700	1,9 $\pm$ 0,73	1,2 $\pm$ 0,4	2332 $\pm$ 500	2772 $\pm$ 1176	3644 $\pm$ 2365
Grupo I/CFA	113 $\pm$ 113	0,4 $\pm$ 0,1	0	19 $\pm$ 6,7	30 $\pm$ 12	7 $\pm$ 4
Grupo II/ $\alpha$ -syn	235.747 $\pm$ 74.000	4,1 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 1,0	3813 $\pm$ 1200	2926 $\pm$ 976	1468 $\pm$ 641
Grupo II/CFA	400 $\pm$ 358	0,3 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	23 $\pm$ 9	21 $\pm$ 14	0,6 $\pm$ 0,6

En este grupo, los títulos medios crecían ligeramente a lo largo del tiempo. Similarmente, para el grupo II, los animales inmunizados con  $\alpha$ -sinucleína mostraban títulos que variaban de 200 a 13.000 (Tabla 3). Sin embargo, los niveles de título medios eran mayores en la primera determinación y luego disminuían a lo largo del tiempo. El análisis por inmunotransferencia también mostró una variabilidad significativa de ratón a ratón en cuanto a su capacidad para reconocer  $\alpha$ -sinucleína. En general, los niveles de afinidad relativa al anticuerpo eran mayores en los ratones del grupo II que en los ratones inmunizados del grupo I (Tabla 4).

Tabla 4. Sumario de correlaciones entre afinidad por inmunotransferencia, neuropatología y títulos

Marcadores neuropatológicos	Afinidad de anticuerpos por minitransferencia	Afinidad de anticuerpos hacia sinapsis	Afinidad de anticuerpos hacia inclusiones	Afinidad de anticuerpos hacia neuronas	Títulos de anticuerpos (primera sangría)
Número de inclusiones $\alpha$ -syn (+)	-0,11	0,04	0,12	-0,21	0,1
% del área del neuropilo con sinapsis $\alpha$ -syn (+)	-0,46 (p = 0,003)	-0,41 (p = 0,009)	-0,43 (p = 0,005)	0,06	-0,47 (p = 0,007)
% del área del neuropilo con sinapsis sinaptofisina (+)	0,06	0,35 (p = 0,04)	0,01	0,04	0,12
Afinidad de anticuerpos por minitransferencia	–	0,74 (p = 0,0001)	0,70 (p = 0,0001)	-0,16	0,85 (p = 0,0001)
Títulos de anticuerpos (primera sangría)	0,85 (p = 0,0001)	0,62 (p = 0,0001)	-0,18	0,81 (p = 0,0001)	–

5 Por análisis ICC, los sueros de los ratones vacunados con  $h\alpha$ -sinucleína mostraban marcación de neuronas, inclusiones intraneuronales y terminales presinápticos. Por contraste, los ratones tratados con adyuvante solo mostraban una leve tinción difusa e inespecífica de cuerpos celulares. Los sueros de los ratones pertenecientes al grupo II mostraban mayor afinidad en cuanto a reconocer  $h\alpha$ -sinucleína en las sinapsis y neuronas de los ratones tg que los ratones inmunizados del grupo I (Tabla 4).

10 Los estudios de mapeo epitópico mostraban que, en los ratones vacunados con  $h\alpha$ -sinucleína, los anticuerpos reconocían muy frecuentemente epítomos peptídicos dentro de la región C-terminal de la  $h\alpha$ -sinucleína (Figura 8). Además, también se reconocían a veces anticuerpos hacia epítomos adicionales. Por contraste, no se detectaron reactividad ni epítomos de anticuerpo con los sueros de ratones tratados con CFA solo.

*La inmunización reduce la acumulación de  $h\alpha$ -sinucleína y preserva la densidad sináptica en los cerebros de ratones tg*

15 Para determinar los efectos de la inmunoterapia sobre la acumulación de  $h\alpha$ -sinucleína, se marcaron cortes con anticuerpos contra  $h\alpha$ -sinucleína y se analizaron mediante microscopía de campo claro o mediante LSCM. En los ratones tg se observó una abundante inmunorreactividad para  $h\alpha$ -sinucleína en el neuropilo así como en inclusiones intraneuronales. En comparación con los ratones tg tratados con CFA solo, los ratones de ambos grupos inmunizados mostraban una reducción comparable (aproximadamente 25%) en el número de inclusiones en el córtex temporal (Figura 9A). Además, la inmunización daba lugar a una disminución de la inmunorreactividad para  $h\alpha$ -sinucleína en el neuropilo. Cuando se comparaban con los ratones tg tratados con CFA solo, este efecto era mayor en los ratones del grupo II que en los ratones del grupo I (Figura 9A). Para determinar si los efectos de la inmunización estaban realmente relacionados con la capacidad de los anticuerpos para reducir la acumulación neuronal de  $h\alpha$ -sinucleína o con efectos de enmascaramiento, se llevaron a cabo experimentos de control comparando los niveles de inmunorreactividad para  $\beta$ -sinucleína entre los ratones tg tratados con CFA solo y los vacunados con  $h\alpha$ -sinucleína. Coherentemente con la conocida distribución de  $\beta$ -sinucleína, un compuesto homólogo próximo a la  $\alpha$ -sinucleína [Iwai et al., Neuron 14: 467-475 (1994)], se observó una abundante inmunorreactividad para  $\beta$ -sinucleína en el neuropilo en asociación con los terminales presinápticos y se detectó una leve inmunomarcación en los cuerpos de células neuronales pero no en las inclusiones. En comparación con los ratones tg tratados con CFA solo, no se hallaron diferencias en los patrones ni los niveles de  $\beta$ -sinucleína en los ratones inmunizados con  $h\alpha$ -sinucleína. Para investigar más la especificidad de los efectos de los anticuerpos hacia  $h\alpha$ -sinucleína, se compararon los niveles de inmunorreactividad para  $\alpha$ -sinucleína murina (m) entre los ratones tg tratados con CFA solo y los vacunados con  $h\alpha$ -sinucleína. Similarmente a la  $h\alpha$ -sinucleína, la inmunorreactividad para  $m\alpha$ -sinucleína era abundante en el neuropilo en asociación con terminales nerviosos pero estaba ausente en los cuerpos de células neuronales y en las inclusiones. Tanto en los ratones tratados con CFA como en los inmunizados con  $h\alpha$ -sinucleína, los patrones y niveles de  $m\alpha$ -sinucleína eran comparables. Conjuntamente considerados, estos estudios sugieren que la vacunación afecta específicamente a la  $h\alpha$ -sinucleína pero no a otras moléculas sinápticas relacionadas.

Para confirmar más los efectos de la inmunoterapia sobre la integridad del neuropilo, se inmunotifieron cortes con un



anticuerpo contra sinaptofisina o se analizaron por microscopía electrónica. En comparación con los ratones no transgénicos (notg), los ratones tg tratados con CFA solo mostraban una disminución media de 20% en el número de terminales inmunomarcados para sinaptofisina, y los niveles de inmunorreactividad para sinaptofisina por sinapsis permanecieron inalterados (Figura 9B). Por contraste, los ratones inmunizados de ambos grupos mostraban niveles de inmunorreactividad para sinaptofisina comparables a los de los testigos notg (9B). Otro análisis inmunocitoquímico con anticuerpos contra marcadores gliales tales como GFAP y CD45 mostró una tendencia hacia una inmunorreactividad aumentada en los cerebros de ratones tg vacunados con  $\alpha$ -sinucleína (Figura 9C). Coherentemente con estos hallazgos, el análisis ultraestructural mostró que, en los cerebros de ratones tg inmunizados con  $\alpha$ -sinucleína, el neuropilo estaba bien conservado, con terminales presinápticos y dendritas intactos, y los terminales nerviosos contenían abundantes vesículas claras y formaban densidades postsinápticas. Sólo se identificaron agregados electrodensos ocasionales en las prolongaciones neuríticas y, en general, las mitocondrias y la mielina estaban bien conservadas.

Para caracterizar mejor los efectos de la vacunación sobre la agregación de  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis, se llevó a cabo un análisis inmunocitoquímico doble y por transferencia Western con preparaciones sinaptosómicas. Bajo condiciones fisiológicas, la  $\alpha$ -sinucleína se localiza principalmente en los terminales presinápticos (Iwai et al., 1994, *supra*), y en la LBD y en los ratones tg, la acumulación aumentada de  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis está asociada con déficits funcionales y pérdida de sinapsis (Hashimoto et al., 2001, *supra*). Para determinar los efectos de la vacunación sobre la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en los terminales nerviosos, se llevaron a cabo estudios de inmunomarcación doble con anticuerpos contra el marcador de terminales presinápticos sinaptofisina y contra  $\alpha$ -sinucleína y un análisis por transferencia Western con preparaciones sinaptosómicas. La obtención de imágenes confocales de cortes doblemente marcados mostró que, en comparación con los ratones tg para  $\alpha$ -sinucleína vacunados con CFA solo (Figura 9D), aquellos a los que se inyectó  $\alpha$ -sinucleína presentaban una acumulación disminuida de  $\alpha$ -sinucleína en terminales nerviosos inmunorreactivos para sinaptofisina del neocórtex (Figura 9D).

Coherentemente con los estudios inmunocitoquímicos, el análisis por inmunotransferencia mostró que, en los ratones tg tratados con CFA solo, había abundantes bandas de mayor peso molecular, lo que refleja posiblemente la acumulación de inclusiones inmunorreactivas para  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis (Figura 10). En los ratones inmunizados había una considerable disminución de la acumulación de bandas de mayor peso molecular de  $\alpha$ -sinucleína y de la banda nativa, pero no se observaron efectos sobre los niveles de  $\alpha$ -sinucleína. Además, en comparación con los ratones tg tratados con CFA solo, los niveles de inmunorreactividad para sinaptofisina eran mayores en las preparaciones sinaptosómicas de los ratones inmunizados (Figura 10). Considerados conjuntamente, estos resultados sugieren que la inmunoterapia puede mejorar el daño neuronal en los cerebros de los ratones tg al reducir la acumulación de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína potencialmente tóxicos en las sinapsis.

*Los efectos de la inmunización dependen de la afinidad relativa de los anticuerpos para reconocer terminales sinápticos*

Para comprender mejor qué factores permiten pronosticar la eficacia de la inmunoterapia, se llevó a cabo un análisis por regresión lineal entre los marcadores neuropatológicos de acumulación de  $\alpha$ -sinucleína y los títulos y la afinidad de los anticuerpos. Este análisis mostró una significativa correlación entre la afinidad relativa de los anticuerpos por inmunotransferencia y los niveles de inmunorreactividad para  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis, pero no con los números de inclusiones neuronales. Similarmente, la afinidad relativa de los anticuerpos para reconocer sinapsis por ICC estaba inversamente correlacionada con los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis y directamente correlacionada con el porcentaje de área ocupada por terminales nerviosos marcados para sinaptofisina, pero no con los números de inclusiones neuronales. Los niveles de reactividad de los anticuerpos por inmunotransferencia e ICC estaban muy correlacionados con los títulos de anticuerpos, según se determinaban por ELISA. Los títulos de anticuerpos estaban también correlacionados con el porcentaje de área del neuropilo marcada con el anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína, pero no con los números de inclusiones en neuronas (Tabla 4). Conjuntamente considerados, estos resultados sugieren que la reactividad relativa por inmunotransferencia de los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína humana y, en cierta medida, los títulos de anticuerpos por ELISA se correlacionan con la reducción de la acumulación neuronal de  $\alpha$ -sinucleína humana.

*Los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína humana se internalizan y se unen a sinapsis y a neuronas que contienen inclusiones en ratones tg*

Para determinar si los anticuerpos circulantes reconocen los característicos sitios neuronales donde se acumula  $\alpha$ -sinucleína humana en los cerebros de ratones tg, se llevó a cabo un análisis inmunocitoquímico simple y doble con anticuerpos anti-IgG de ratón, generados en caballo. Estos anticuerpos supuestamente reconocen la anti- $\alpha$ -sinucleína humana generada en los animales inmunizados pero no en los testigos de CFA. Una microscopía digital de campo claro de los cortes inmunomarcados mostró que, en los ratones inmunizados con  $\alpha$ -sinucleína, el anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón marcaba difusamente cuerpos de células neuronales y prolongaciones neuríticas en el neuropilo. En animales tg tratados con CFA solo había una leve marcación de vasos sanguíneos y células ocasionales que parecían microglía. Experimentos de inmunotinción doble confirmaron que, en los ratones vacunados, los cuerpos de células neuronales marcados mediante un anticuerpo anti-IgG de ratón, etiquetado con FITC, presentaban inmunorreactividad para  $\alpha$ -sinucleína. En comparación con los ratones tg tratados con CFA solo, en los ratones vacunados con  $\alpha$ -sinucleína, en algunas neuronas, el anticuerpo anti-IgG de ratón y la

5 inmunorreactividad para h $\alpha$ -sinucleína se localizaban conjuntamente en la periferia de los cuerpos celulares; en otras zonas, los dos marcadores se detectaban en las prolongaciones neuríticas y las sinapsis. Además, en varias neuronas que contenían  $\alpha$ -sinucleína humana se detectaron los dos marcadores en estructuras subcelulares granulares con un diámetro medio de 0,4-0,8  $\mu$ m. Experimentos de doble marcación adicionales mostraron que estas estructuras granulares presentaban inmunorreactividad para catepsina D, lo que sugiere que los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína humana internalizados reaccionaban con sinucleína dentro de lisosomas. Coherentemente con este hallazgo, el análisis ultraestructural mostró que, en algunas de las neuronas de los ratones vacunados con  $\alpha$ -sinucleína humana, se identificaban estructuras laminares electrodensas que sugerían lisosomas y fagolisosomas. Conjuntamente considerados, estos resultados sugieren que la vacunación con  $\alpha$ -sinucleína humana puede provocar la degradación de esta molécula a través de la activación de una ruta lisosómica.

Ejemplo IX. Supresión de agregados de  $\alpha$ -sinucleína *in vivo* mediante la administración de anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína

15 En este ejemplo se demuestra la supresión de agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína utilizando anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -sinucleína que reconocen los extremos de la  $\alpha$ -sinucleína. Se inyectaron los anticuerpos monoclonales en el neocórtex de ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína humana y tienen agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína. Los dos anticuerpos, uno dirigido contra el extremo N y el otro dirigido contra el extremo C de la  $\alpha$ -sinucleína, reducían el número de agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína en hasta 80% en comparación con anticuerpos testigo irrelevantes (Figura 11).

20 *Métodos:* Se disolvieron anticuerpos monoclonales que reconocían diferentes epítomos de la molécula de  $\alpha$ -sinucleína y anticuerpos testigo irrelevantes de isotipo equivalente en disolución salina estéril tamponada con fosfato (Tabla 5) para inyección a ratones. Los animales empleados eran ratones transgénicos heterocigóticos de 4 a 8 meses de edad que sobreexpresaban  $\alpha$ -sinucleína humana de tipo silvestre en el cerebro bajo el control transcripcional del promotor de PDGF. Para cada uno de los anticuerpos se utilizaron de 4 a 6 ratones transgénicos diferentes.

25 Tabla 5. Anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína y testigos empleados para inyección intracerebral en un modelo transgénico de sinucleinopatía neuronal

Anticuerpo monoclonal	Epítomo/Especificidad	Isotipo
11A5	$\alpha$ -sinucleína fosfoSER129	IgG1
8A5	extremo C de $\alpha$ -sinucleína	IgG1
9G5	$\alpha$ -sinucleína 91-96	IgG1
23E8	$\alpha$ -sinucleína 40-55	IgG1
6H7	extremo N de $\alpha$ -sinucleína	IgG1
4B1	extremo C de $\alpha$ -sinucleína	IgG2a
5C12	$\alpha$ -sinucleína 109-120	IgG2b
27-1	testigo	IgG1
TY11-15	testigo	IgG2a
5B7	testigo	IgG2b

30 A cada ratón se inyectaron estereotácticamente, bajo anestesia, 2  $\mu$ l de una disolución de 2 mg/ml de anticuerpo en las capas profundas del neocórtex parietal del hemisferio cerebral derecho (cara ipsilateral). Los hemisferios izquierdos (cara contralateral) servían como un testigo de línea de base para cada ratón. Se suturaron los sitios de inyección y se controlaron los ratones hasta que se recuperaron de la anestesia. El investigador que ponía las inyecciones desconocía el anticuerpo que se inyectaba cada vez. Dos semanas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados siguiendo las directrices institucionales. Sus cerebros fueron extraídos, fijados en paraformaldehído al 4% durante 48 horas y cortados coronalmente con un grosor de 40  $\mu$ m usando un vibratomo Leica. Se tiñeron dos cortes por animal (alrededor del sitio de inyección), mediante tinción por inmunoperoxidasa, con un anticuerpo policlonal anti- $\alpha$ -sinucleína (ELADW-47, que reconoce los aminoácidos 115-122 de  $\alpha$ -sinucleína). Para cada corte, se contaron los agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína en 4 campos microscópicos (objetivo 20x) alrededor del sitio de inyección en el hemisferio ipsilateral y en 4 campos correspondientes en el hemisferio testigo contralateral. Se sumaron las cuentas de agregados de  $\alpha$ -sinucleína de dos cortes para cada hemisferio. Finalmente, para cada animal, se calculó la diferencia entre las cuentas totales de agregados de  $\alpha$ -sinucleína entre los dos hemisferios y se expresó como diferencia porcentual entre los hemisferios contralateral e ipsilateral, obteniéndose así una medida del efecto de los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína sobre la supresión de agregados para cada ratón individual. Se codificaron ciegamente los cortes y se desveló el código una vez completado el análisis.

Los ratones pueden ser categorizados en tres grupos basándose en qué anticuerpos se inyectaron:

Grupo 1: ratones a los que se inyectó 11A5, 8A5 o un testigo IgG<sub>1</sub>.

Grupo 2: ratones a los que se inyectó 9G5, 23E8, 6H7 o un testigo IgG<sub>1</sub>.

Grupo 3: ratones a los que se inyectó 4B1, 5C12, un testigo IgG<sub>2a</sub> o un testigo IgG<sub>2b</sub>.

5 **Resultados:** Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 11 y 12. Los agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína fueron suprimidos por dos anticuerpos monoclonales: 8A5 (también llamado JH4.8A5) y 6H7 (también llamado JH17.6H7), ambos descritos en la publicación de patente PCT WO 05047860A2 ("Antibodies to Alpha-Synuclein", presentada el 26 de mayo de 2005) y en la solicitud de patente n° 10/984192 en tramitación con la presente. El mAb 6H7 se generó contra  $\alpha$ -sinucleína humana recombinante expresada en *E. coli* y reconoce el extremo amino de  $\alpha$ -sinucleínas humana y de ratón. Reconoce un epítipo que incluye los tres primeros aminoácidos de  $\alpha$ -sinucleína. El mAb 6H7 es capaz de reconocer proteínas de fusión de sinucleína en que la etiqueta proteica está fusionada con el extremo N de sinucleína, lo que sugiere que no se requiere un extremo amino libre (aunque se pueda preferir). El mAb 8A5 se generó contra sinucleínas bovinas purificadas (mezcla de  $\alpha$  y  $\beta$ ) y reconoce un epítipo en el extremo carboxilo de  $\alpha$ -sinucleínas humana y de ratón. El mAb 8A5 puede unirse a sinucleína truncada que acaba en el aminoácido 139. Experimentos preliminares sugieren que 8A5 tiene una preferencia de 4-5 veces por sinucleína con un extremo C libre en comparación con un extremo C conjugado con biotina. Tanto el mAb 6H7 como el mAb 8A5 también reconocen beta-sinucleína. El mAb 4B1 reconoce la región C-terminal de sinucleína y se une a sinucleína de transferencias Western pero no reconoce sinucleína en disolución (es decir, el mAb 4B1 no inmunoprecipita sinucleína). En la Figura 12 se muestran cortes de la cara contralateral (sección izquierda; los puntos marrones redondos dentro del corte son agregados de  $\alpha$ -sinucleína) y la cara ipsilateral (sección derecha) de un ratón al que se le ha inyectado 8A5. La diferencia entre los ratones a los que se ha inyectado 8A5 y los testigos a los que se ha inyectado IgG<sub>1</sub> fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$  mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn *post-hoc*). Estos resultados indican que dirigirse al extremo C y/o el extremo N de  $\alpha$ -sinucleína es terapéuticamente beneficioso en sinucleinopatías tales como PD y DLB. La administración de los otros anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína examinados (Tabla 5, Figura 11) no dio lugar a la supresión de agregados.

Ejemplo X: Supresión de agregados de  $\alpha$ -sinucleína *in vivo* mediante la administración de anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína

30 En este ejemplo se demuestra la supresión de agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína utilizando anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -sinucleína que reconocen los extremos de  $\alpha$ -sinucleína (6H7 y 8A5), como se describió en el Ejemplo IX. En este ejemplo también se demuestra la supresión de agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína usando un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -sinucleína que reconoce un epítipo cerca del extremo C (9E4). El mAb 9E4 reconoce un epítipo de alfa-sinucleína en la región de los aminoácidos 118-126.

35 Se inyectaron 3x los anticuerpos monoclonales en el neocórtex del hemisferio derecho de ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína humana y forman agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína. Como se describió anteriormente, el mAb 6H7, que reconoce el extremo N de  $\alpha$ -sinucleína, y el mAb 8A5, que reconoce el extremo C de  $\alpha$ -sinucleína, reducían el número de agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína en hasta 80% en comparación con un anticuerpo testigo irrelevante (Figura 13). Además, el mAb 9E4, que reconoce un epítipo de  $\alpha$ -sinucleína en los aa 118-126, presentaba un similar efecto reductor de agregados de  $\alpha$ -sinucleína (Figura 13).

40 **Métodos:** Se disolvieron anticuerpos monoclonales que reconocían diferentes epítipos de la molécula de  $\alpha$ -sinucleína y un anticuerpo testigo irrelevante de isotipo equivalente en disolución salina estéril tamponada con fosfato para inyección a ratones (Tabla 6). Los animales empleados eran ratones transgénicos heterocigóticos de 4 a 8 meses de edad que sobreexpresaban  $\alpha$ -sinucleína humana de tipo silvestre en el cerebro bajo el control transcripcional del promotor de PDGF. Para cada uno de los anticuerpos se utilizaron de 4 a 6 ratones transgénicos diferentes.

Tabla 6. Anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína y testigos empleados para 3 inyecciones intracerebrales en un modelo transgénico de sinucleinopatía neuronal

Anticuerpo monoclonal	Epítipo	Isotipo
8A5	extremo C de $\alpha$ -sinucleína	IgG1
6H7	extremo N de $\alpha$ -sinucleína	IgG1
9E4	aa 118-126 de $\alpha$ -sinucleína	IgG1
27/1	testigo	IgG1

50 A cada ratón se inyectaron estereotácticamente para cada sitio de inyección, bajo anestesia, 2  $\mu$ l de una disolución de 2 mg/ml de anticuerpo en las capas profundas del neocórtex parietal del hemisferio cerebral derecho (cara

ipsilateral). Los hemisferios izquierdos (cara contralateral) servían como un testigo de línea de base para cada ratón. Las tres coordenadas de inyección estereotácticas fueron: inyección 1: bregma 2,0 mm, lateral 1,5 mm, profundidad 2,0 mm; inyección 2: bregma 0,4 mm, lateral 1,5 mm, profundidad 1,4 mm; inyección 3: bregma -2,3 mm, lateral 1,5 mm, profundidad 1,2 mm. Se suturaron los sitios de inyección y se controlaron los ratones hasta que se recuperaron de la anestesia. El investigador que ponía las inyecciones desconocía el anticuerpo que se inyectaba cada vez. Dos semanas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados siguiendo las directrices institucionales. Sus cerebros fueron extraídos, fijados en paraformaldehído al 4% durante 48 horas y cortados coronalmente con un grosor de 40 µm usando un vibratomo Leica. Se tiñó cada tercer corte de todo el cerebro de cada animal, mediante tinción por inmunoperoxidasa, con un anticuerpo policlonal anti- $\alpha$ -sinucleína (ELADW-47, que reconoce los aminoácidos 115-122 de  $\alpha$ -sinucleína). Basándose en la situación de cada sitio de inyección, se seleccionaron dos-cuatro cortes en torno a cada uno de los tres sitios de inyección para cada animal. Se contaron los agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína en 4 campos microscópicos (objetivo 20x) alrededor del sitio de inyección en el hemisferio ipsilateral y en 4 campos correspondientes en el hemisferio testigo contralateral. Se sumaron las cuentas de agregados de  $\alpha$ -sinucleína de todos los cortes contados (total de 3-12 cortes/animal) para cada hemisferio. Finalmente, para cada animal, se calculó la diferencia entre las cuentas totales de agregados de  $\alpha$ -sinucleína entre los dos hemisferios y se expresó como diferencia porcentual entre los hemisferios contralateral e ipsilateral, obteniéndose así una medida del efecto de los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína sobre la supresión de agregados para cada ratón individual. Se codificaron ciegamente los cortes y se desveló el código una vez completado el análisis.

Ejemplo XI. Un anticuerpo monoclonal contra el extremo C (CT; del inglés, C-terminus) de alfa-sinucleína entra en el cerebro y reconoce alfa-sinucleína

Se inyectó intravenosamente 9E4-FITC, en una dosis de 5 mg/kg, 100 µl, a ratones tg para  $\alpha$ -sinucleína humana. Los ratones se sacrificaron una semana más tarde para determinar la presencia del anticuerpo en el cerebro y el CSF. Visualizamos directamente el anticuerpo fluorescente y hallamos que el anticuerpo realmente circulaba por el cerebro y reconocía específicamente  $\alpha$ -sinucleína en los cuerpos de células neuronales y las sinapsis. Una IgG testigo periféricamente suministrada sólo mostró inmunoreactividad de fondo tanto en ratones tg como en ratones notg. Además, hallamos que el CSF de los ratones tratados era inmunoreactivo contra  $\alpha$ -sinucleína en los cerebros de ratones tg no tratados y mostraba un patrón de tinción similar a la inmunomarcación directa con el anticuerpo 9E4-FITC (véase la Figura 14).

Ejemplo XII. La inmunización pasiva con un anticuerpo contra el extremo C de  $\alpha$ -sinucleína reduce los déficits de  $\alpha$ -sinucleína en ratones tg

El objetivo del presente estudio fue mostrar que la inmunización pasiva con un anticuerpo contra el extremo C de  $\alpha$ -sinucleína circula por el CNS y es capaz de reconocer y suprimir agregados de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro de ratones tg. Con este fin, se inyectó intraperitonealmente 9E4, en una dosis de 1 mg/kg, durante seis meses a ratones tg para  $\alpha$ -sinucleína humana. Los animales tratados con 9E4 fueron sacrificados después de 6 meses de inyecciones semanales. Se hallaron niveles reducidos de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína y formas insolubles de  $\alpha$ -sinucleína en los cerebros de los ratones tg sometidos a inyecciones (véase la Figura 15).

Ejemplo XIII. La inmunización con un anticuerpo contra el extremo C de  $\alpha$ -sinucleína promueve la supresión a través de la activación de la ruta de autofagia en un modelo transgénico de enfermedad de Parkinson

Se inyectó intravenosamente un anticuerpo monoclonal (clon 9E4) marcado con FITC a ratones notg y tg para alfa-sinucleína. 3 días después de la inyección se detectaron bajos niveles del anticuerpo en el cerebro al tiempo que se detectaban niveles elevados en el plasma. 14 y 30 días después de la inyección se detectaron mayores niveles en el cerebro con niveles decrecientes en el plasma, según se evidenció tanto por inmunocitoquímica como por ELISA. En los cerebros de los ratones tg se detectó el anticuerpo 9E4-FITC en asociación con agregados granulares de  $\alpha$ -sinucleína en neuronas. Estos agregados fueron conjuntamente marcados con anticuerpos contra marcadores lisosómicos (cathepsina D). Experimentos testigo con una IgG no inmune-FITC solo mostraron marcación de fondo en los ratones notg y tg para alfa-sinucleína. Además, la inmunomarcación de cortes de ratones tg para alfa-sinucleína con el CSF de ratones tratados con 9E4-FITC inmunomarcaba sinapsis y neuronas de cortes de ratones tg para alfa-sinucleína no tratados; por contraste, no se observó marcación con el CSF de ratones tratados con IgG no inmune-FITC.

La supresión de alfa-sinucleína en los ratones tg inmunizados con 9E4 estaba probablemente relacionada con la activación de la ruta de autofagia porque los niveles de beclina-1, escisión de LC3, y Atg5 estaban aumentados y se localizaban conjuntamente con los agregados de  $\alpha$ -sinucleína en las neuronas de los ratones tg inmunizados (véase la Figura 16). Estos resultados sugieren que un anticuerpo monoclonal contra un epítipo de, o cerca de, el extremo C de  $\alpha$ -sinucleína circula por el CNS, reconoce agregados en neuronas afectadas y desencadena la supresión a través de una ruta lisosómica, tal como la autofagia. En la Figura 17 se ilustran dichas rutas. En la parte izquierda de la figura, el anticuerpo se une a alfa-sinucleína unida a membrana desde el exterior de las células, y el complejo resultante es endocitado y se combina con un lisosoma dentro de la célula formando un autofagosoma y desencadenando la degradación por enzimas lisosómicas. En la parte derecha de la figura, la alfa-sinucleína y el anticuerpo hacia alfa-sinucleína son separadamente endocitados, entrando probablemente el anticuerpo a través de receptores de Fc, y se combinan con un lisosoma en la célula, lo que va seguido de degradación lisosómica.

**Depósito**

Las siguientes líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales han sido depositadas bajo las disposiciones del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) en las fechas indicadas:

Anticuerpo monoclonal	Línea celular	Epítipo/Especificidad	Isotipo	Fecha de depósito	Nº de acceso
11A5	JH22.11A5.6.29.70.54.16.14	restos 124-134, fosfoSER129, de alfa-sinucleína	IgG1	26 de febrero de 2007	PTA-8222
8A5	JH4.8A5.25.7.36	extremo C de alfa-sinucleína	IgG1	4 de agosto de 2005	PTA-6909
1H7	JH17.1H7.4.24.34	restos 91-99 de alfa-sinucleína	IgG1	26 de febrero de 2007	PTA-8220
9E4	JH17.9E4.3.37.1.14.2	restos 118-126 de alfa-sinucleína	IgG1	26 de febrero de 2007	PTA-8221
6H7	JH17.6H7.1.54.28	extremo N de alfa-sinucleína	IgG1	4 de agosto de 2005	PTA-6910

5

Será aparente para un experto en la materia que se pueden hacer muchos cambios y modificaciones aquí sin salirse del alcance de las reivindicaciones anejas. A menos que otra cosa sea aparente del contexto, cualquier etapa, figura, realización o aspecto se pueden usar en combinación con cualquier otro.

**Listado de secuencias**

<110> ELAN PHARMACEUTICALS, INC.  
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

5 <120> PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD SINUCLEINOPÁTICA Y AMILOIDOGÉNICA

<130> 015270-008980EP

10 <140>  
<141>

<150> PCT/US2008/002392

15 <151> 22-02-2008

<150> 60/984.721

<151> 01-11-2007

20 <150> 11/697.646

<151> 06-04-2007

<150> 11/710.248

<151> 23-02-2007

25 <160> 57

<170> PatentIn versión 3.5

30 **<210> 1**

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 570 182 T3

<400> 1

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val  
1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys  
20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val  
35 40 45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr  
50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys  
65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys  
85 90 95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile  
100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro  
115 120 125

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala  
130 135 140

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala  
1 5 10 15

Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr  
20 25 30

Gly Phe Val  
35

5 <210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 570 182 T3

<400> 3

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr  
1 5 10 15

Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser  
20 25

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

5 <213> virus Influenza

<400> 4

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Plasmodium sp.

<400> 5

Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val  
1 5 10 15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> virus de la hepatitis B

-

<400> 6

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile

1 5 10

10

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly  
1 5 10 15

Asn Glu Gly

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Mycobacterium bovis



<400> 8

Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu  
 1 5 10

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Clostridium tetani

<400> 9

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

10 <213> Clostridium tetani

<400> 10

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser  
 1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu  
 20

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 11

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala  
 1 5 10 15

<210> 12

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<220>

30 <221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Ciclohexilalanina

<220>

35 <221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar="Tyr" o "Phe"

<220>

40 <221> característica\_misc

<222> (3)..(3)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(13)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las  
 5 sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 12  
 Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 14  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 15 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 13  
 Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr  
 1 5 10

<210> 14  
 <211> 13  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 25 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 14  
 Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Cys Gly  
 1 5 10

<210> 15  
 <211> 13  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 35 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 40 <223> Ácido amino-heptanoico

<400> 15  
 Cys Xaa Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Cys Gln Glu Gly  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 29  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

15 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

20 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(29)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

25 <400> 16  
 Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Gln Tyr  
 1 5 10 15  
 Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
 20 25

<210> 17  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

45 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

50 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(35)

<223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 17

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Phe Asn  
1 5 10 15

Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser  
20 25 30

His Leu Glu  
35

5 <210> 18  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

15 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (1)..(14)  
<223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

20 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (1)..(14)  
<223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

25 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(14)  
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

30 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(29)  
<223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 18

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Gln Tyr  
1 5 10 15

Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
20 25

35 <210> 19  
<211> 50  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"  
 5

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"  
 10

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"  
 15

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(50)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"  
 20

<400> 19  
 Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Gln Tyr  
 1 5 10 15  
  
 Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn  
 20 25 30  
  
 Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His  
 35 40 45  
  
 Leu Glu  
 50

25 <210> 20  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ciclohexilalanina

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> /reemplazar="Tyr" o "Phe"

45 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (3)..(3)  
 <223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (14)..(27)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"  
 5

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (14)..(27)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"  
 10

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (14)..(27)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"  
 15

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(27)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"  
 20

<400> 20  
 Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Lys Glu Gln  
 1 5 10 15  
  
 Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr  
  
 20 25

25 <210> 21  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

45 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

50 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(28)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(28)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"  
 5

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (15)..(28)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"  
 10

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (29)..(42)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"  
 15

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (29)..(42)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"  
 20

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (29)..(42)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"  
 25

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (45)..(45)  
 <223> Ciclohexilalanina  
 30

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (45)..(45)  
 <223> /reemplazar="Tyr" o "Phe"  
 35

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (45)..(45)  
 <223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"  
 40

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(55)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"  
 45

ES 2 570 182 T3

<400> 21

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu  
 1 5 10 15

Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val  
 20 25 30

Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Ala Lys Ala Val Ala Ala  
 35 40 45

Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 50 55

<210> 22

<211> 69

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Ciclohexilalanina

15 <220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar="Tyr" o "Phe"

20 <220>

<221> característica\_misc

<222> (3)..(3)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(27)

<223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

30 <220>

<221> VARIANTE

<222> (14)..(27)

<223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

35 <220>

<221> característica\_misc

<222> (14)..(27)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

40 <220>

<221> VARIANTE

<222> (28)..(41)

<223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

45 <220>

<221> VARIANTE



- <222> (28)..(41)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"
- 5 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (28)..(41)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"
- 10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (42)..(55)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"
- 15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (42)..(55)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"
- 20 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (42)..(55)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"
- 25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (56)..(69)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"
- 30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (56)..(69)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"
- 35 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (56)..(69)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"
- 40 <220>
- <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(69)
- 45 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

-

<400> 22

Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Lys Glu Gln  
 1 5 10 15

Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr  
 20 25 30

Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr Asn Val  
 35 40 45

Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly  
 50 55 60

Gly Ala Val Val Thr  
 65

<210> 23

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

10

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(14)

<223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(14)

<223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

20

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(14)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

25

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> Ciclohexilalanina

30

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)..(17)

<223> /reemplazar="Tyr" o "Phe"

35

<220>

<221> característica\_misc

<222> (17)..(17)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

40

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(27)

<223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 23

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Ala Lys  
 1 5 10 15

Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 20 25

- 5 <210> 24
- <211> 31
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1)..(14)
- <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (1)..(14)
- <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"
- 25 <220>
- <221> característica\_misc
- <222> (1)..(14)
- <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"
- 30 <220>
- <221> característica\_misc
- <222> (1)..(31)
- <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"
- 35

<400> 24

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Ile Ser  
 1 5 10 15

Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg

20 25 30

- 40 <210> 25
- <211> 55
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <221> fuente
- 45

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 5 <222> (14)..(27)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 10 <222> (14)..(27)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 15 <222> (14)..(27)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 20 <222> (28)..(41)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 25 <222> (28)..(41)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 30 <222> (28)..(41)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 35 <222> (42)..(55)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 40 <222> (42)..(55)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 45 <222> (42)..(55)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

50

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(55)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 25

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Lys Glu Gln  
 1 5 10 15

Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr  
 20 25 30

Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr Asn Val  
 35 40 45

Cys Gly Gly Ala Val Val Thr  
 50 55

<210> 26  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (28)..(41)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (28)..(41)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (28)..(41)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> característica\_misc  
 <222> (1)..(41)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 26  
 Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Pro Lys  
 1 5 10 15  
 Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Lys Glu Gln Val Thr  
 20 25 30  
 Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr  
 35 40

5  
 <210> 27  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

20  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

25  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

30  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(28)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

35  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(28)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

40  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (15)..(28)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

45  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (29)..(42)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

50  
 <220>

<221> VARIANTE  
 <222> (29)..(42)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

5 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (29)..(42)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

10 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(55)  
 <223> /nota="Ver memoria descriptiva para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 27  
 Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val  
 20 25 30  
 Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Pro Lys Tyr Val Lys Gln  
 35 40 45  
 Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
 50 55

15 <210> 28  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

35 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(28)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(28)

<223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 5 <222> (15)..(28)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>  
 10 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(41)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

```

<400> 28
Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu
1          5          10          15

Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Pro Lys Tyr Val
          20          25          30

Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
          35          40
  
```

15 <210> 29  
 <211> 171  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

35 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(14)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (80)..(93)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (80)..(93)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

50 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (80)..(93)



- <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"
- 5 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (94)..(107)  
<223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"
- 10 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (94)..(107)  
<223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"
- 15 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (94)..(107)  
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"
- 20 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (108)..(121)  
<223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"
- 25 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (108)..(121)  
<223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"
- 30 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (108)..(121)  
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"
- 35 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (122)..(135)  
<223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"
- 40 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (122)..(135)  
<223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"
- 45 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (122)..(135)  
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"
- 50 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(171)  
<223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

ES 2 570 182 T3

<400> 29

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Pro Lys  
1 5 10 15

Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Glu Lys Lys Ile Ala  
20 25 30

Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Gln Tyr Ile Lys Ala  
35 40 45

Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val  
50 55 60

Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Lys  
65 70 75 80

Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln  
85 90 95

Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr  
100 105 110

Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr Asn Val  
115 120 125

Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
130 135 140

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu  
145 150 155 160

Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu  
165 170

<210> 30

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(14)

<223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(14)

<223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(14)  
 5 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 10 <222> (52)..(65)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 15 <222> (52)..(65)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 20 <222> (52)..(65)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 25 <222> (103)..(116)  
 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 30 <222> (103)..(116)  
 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 35 <222> (103)..(116)  
 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 40 <222> (1)..(116)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

45  
 <400> 30  
 Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Gln Tyr  
 1 5 10 15

ES 2 570 182 T3

Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn  
 20 25 30

Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser  
 35 40 45

His Leu Glu Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val  
 50 55 60

Thr Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
 65 70 75 80

Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val  
 85 90 95

Ser Ala Ser His Leu Glu Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly  
 100 105 110

Ala Val Val Thr  
 115

<210> 31

<211> 29

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(14)

15 <223> /reemplazar="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)..(14)

20 <223> /reemplazar="Ácido Cys-Amino-heptanoico-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(14)

25 <223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(29)

30 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 31

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Gln Tyr

ES 2 570 182 T3

1 5 10 15

Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
20 25

<210> 32  
<211> 26  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 32  
Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Ile Ser Gln Ala Val His Ala  
1 5 10 15

Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg  
20 25

10 <210> 33  
<211> 43  
<212> PRT  
15 <213> Homo sapiens

<400> 33  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr  
35 40

20 <210> 34  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 34  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
20

25 <210> 35  
<211> 28  
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 5 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 35  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu  
 20 25

<210> 36  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 36  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu  
 20 25 30  
 Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu  
 35 40

15 <210> 37  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 37  
 Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
 20

25 <210> 38  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)

<223> Ciclohexilalanina

<220>  
 <221> VARIANTE  
 5 <222> (3)..(3)  
 <223> /reemplazar="Tyr" o "Phe"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 10 <222> (3)..(3)  
 <223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

<220>  
 <221> característica\_misc  
 15 <222> (1)..(20)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 38  
 Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu  
 1 5 10 15

Phe Arg His Asp  
 20

20 <210> 39  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Ciclohexilalanina

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> /reemplazar="Tyr" o "Phe"

40 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (24)..(24)  
 <223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

45 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(34)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

50

<400> 39

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala  
 1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala  
 20 25 30

Ala Ala

<210> 40

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Ciclohexilalanina

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar="Tyr" o "Phe"

20

<220>

<221> característica\_misc

<222> (3)..(3)

<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

25

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(34)

<223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

30

<400> 40

Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu  
 1 5 10 15

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg  
 20 25 30

His Asp

<210> 41

<211> 20

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

40 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<220>



<221> MOD\_RES  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Ciclohexilalanina

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> /reemplazar="Tyr" o "Phe"

10 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (10)..(10)  
 <223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en la anotación para dicha posición"

15 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(20)  
 <223> /nota="Ver la memoria descriptiva tal y como se ha presentado para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 41  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu  
 1 5 10 15  
  
 Lys Ala Ala Ala  
 20

<210> 42  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 42  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His  
 1 5 10 15  
  
 Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg  
 20

30 <210> 43  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 43  
 Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His  
 1 5 10 15  
  
 Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg  
 20

<210> 44  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 44  
 Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His  
 1 5 10 15  
 Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg  
 20

10 <210> 45  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 45  
 Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu  
 1 5 10 15  
 Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg  
 20 25 30  
 His Asp

20 <210> 46  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 46  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu Phe Arg His Asp  
 20 25

30 <210> 47  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 570 182 T3

<400> 47

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala  
1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu  
20 25 30

Ala Thr

<210> 48

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 48

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys  
1 5 10 15

Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
20 25

10

<210> 49

<211> 79

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 49

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu  
1 5 10 15

Lys Leu Ala Thr Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser  
20 25 30

Val Phe Asn Val Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile  
35 40 45

Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro  
50 55 60

Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp  
65 70 75

20

<210> 50

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 50

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala  
1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly  
20 25 30

Ile Thr Glu Leu Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro  
35 40 45

Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu  
50 55

<210> 51

<211> 44

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 51

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp  
20 25 30

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu  
35 40

15

<210> 52

<211> 51

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 570 182 T3

<400> 52

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp  
20 25 30

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe  
35 40 45

Arg His Asp  
50

<210> 53

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 53

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
20

10

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 54

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr  
1 5 10

20

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Cys Gly

1

5

10

<210> 56

<211> 13

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Acido amino-heptanoico

<400> 56

Cys Xaa Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Cys Gln Glu Gly  
1 5 10

5

<210> 57  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(1)  
<223> /nota="Acetilado en N-term"

15

<400> 57

Pro Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Cys  
1 5 10

Ala

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal 1H7 anti-sinucleína, o 1H7 humanizado o quimérico, en donde el anticuerpo 1H7 es producido por el hibridoma JH17.1H7.4.24.34 depositado como número de acceso PTA-8220 de la ATCC.
- 5 2. El anticuerpo monoclonal anti-sinucleína de la Reivindicación 1, que es 1H7 humanizado producido al injertar las CDRs de 1H7 sobre regiones de armazón y constantes humanas, en donde restos de armazón de región variable humana seleccionados están opcionalmente sustituidos del modo siguiente:  
  
un resto de armazón de región variable humana seleccionado está sustituido por un aminoácido de armazón equivalente del anticuerpo 1H7 de ratón cuando el aminoácido (1) se une directa y no covalentemente al antígeno, (2) está adyacente a una región CDR, (3) si no, interacciona con una región CDR, o (4) participa en la interfase VL-VH; o  
10 un aminoácido de armazón humana que es infrecuente para una inmunoglobulina humana en esa posición está sustituido por un aminoácido de la posición equivalente del anticuerpo dador de ratón o de la posición equivalente de una inmunoglobulina humana más típica.
- 15 3. Un método para humanizar el anticuerpo monoclonal 1H7 producido por el hibridoma depositado como número de acceso PTA-8220 de la ATCC, método que comprende:  
  
determinar la secuencia de aminoácidos de regiones CDR del anticuerpo monoclonal;  
  
seleccionar un anticuerpo aceptor; y  
  
producir un anticuerpo humanizado que comprenda las CDRs del anticuerpo monoclonal y armazones de región variable del anticuerpo aceptor.
- 20 4. Un método para producir una forma quimérica del anticuerpo monoclonal 1H7 producido por el hibridoma depositado como número de acceso PTA-8220 de la ATCC, método que comprende:  
  
determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal;  
  
seleccionar la región constante de las cadenas pesada y ligera; y  
25 producir un anticuerpo quimérico que comprenda una cadena ligera que comprenda la región variable de cadena ligera fusionada con la región constante de cadena ligera, y una cadena pesada que comprenda la región variable de cadena pesada fusionada con la región constante de cadena pesada.
5. El anticuerpo de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro.
- 30 6. El anticuerpo de la Reivindicación 5, para el uso de esa reivindicación, en donde la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.
7. El anticuerpo de la Reivindicación 5 o la Reivindicación 6, para el uso de esa reivindicación, en donde el anticuerpo es de isotipo IgG1 humano.
8. El anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 7, para el uso de esa reivindicación, en donde el anticuerpo se administra en múltiples dosis a lo largo de al menos seis meses.
- 35 9. El anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 5 a 7, para el uso de esa reivindicación, en donde el anticuerpo se administra por una vía periférica.
10. Una célula del hibridoma JH17.1H7.4.24.34 depositado como número de acceso PTA-8220 de la ATCC.

N° de resto 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55  
 (ID. SEC. n° 1) MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKBEGVVHGVATVAE

N° de resto 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110  
 (ID. SEC. n° 1) KTKBQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNBEGAPQE

(ID. SEC. n° 2) EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV (restos 61-95)

(ID. SEC. n° 3) KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (restos 60-87)

N° de resto 115 120 125 130 135 140  
 (ID. SEC. n° 1) GILEDMPVDPDNBAAYEMPSEEGYQDYEP EA (restos 1-140)

Fig. 1



La inmunización con  $\alpha$ -sinucleína reduce la formación de inclusiones SYN (+)

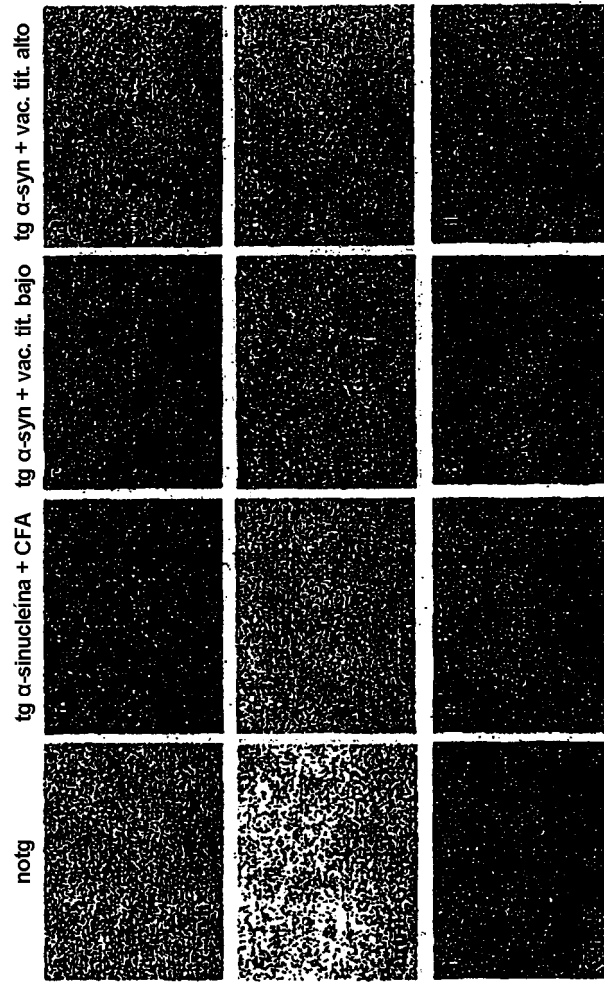
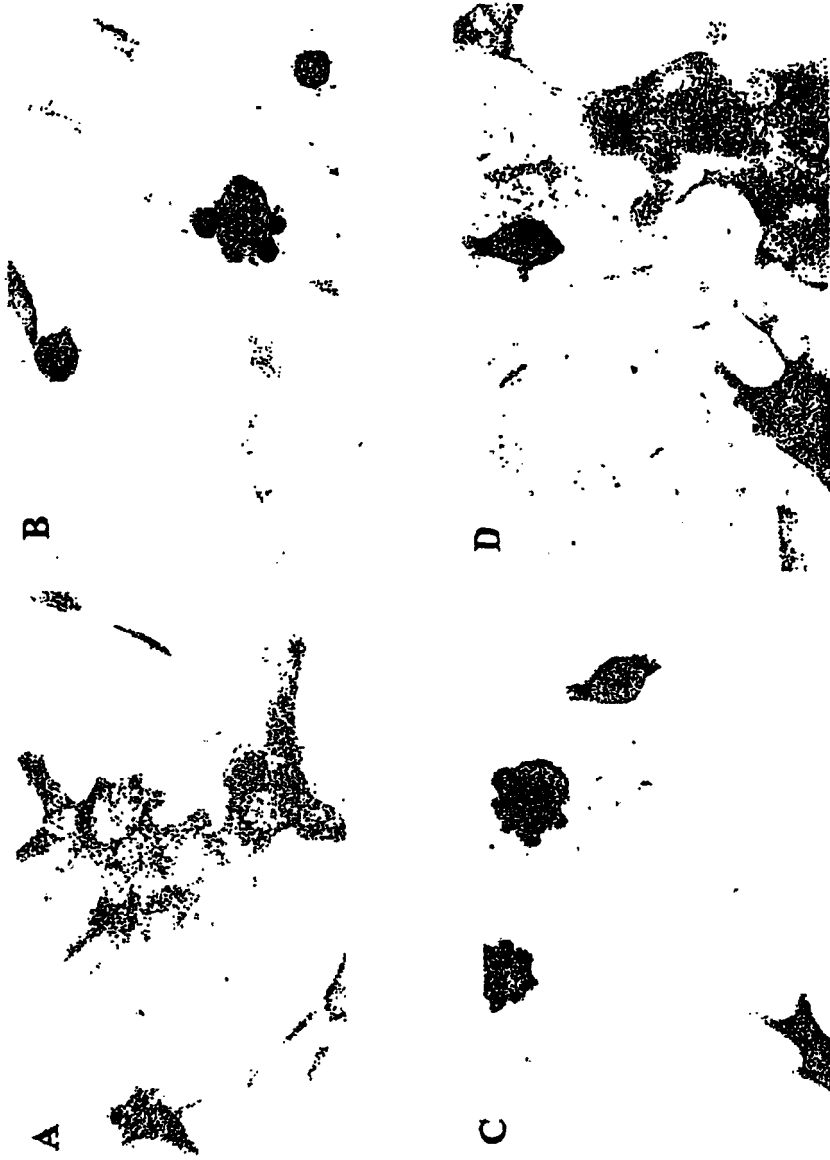
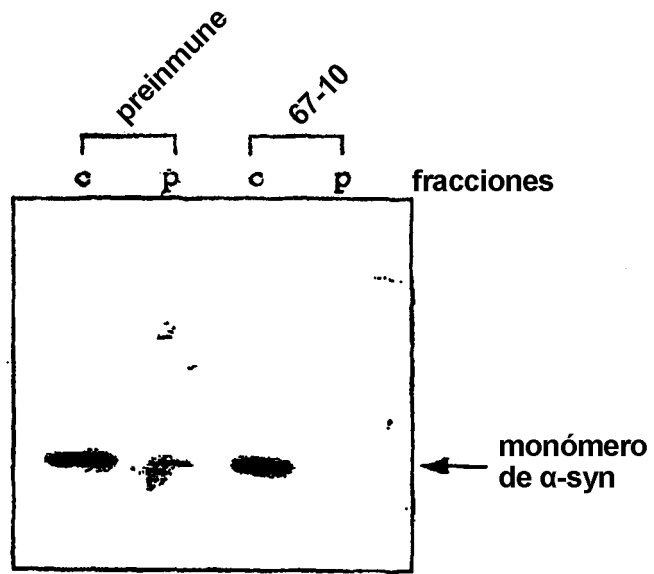


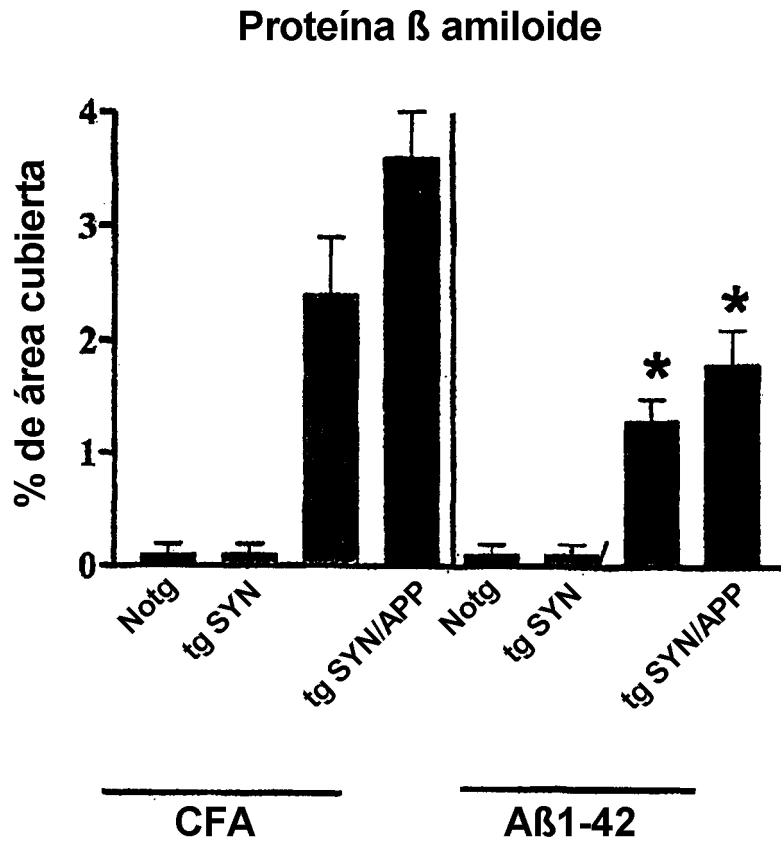
Fig. 2



**Figs. 3A-D**



**Fig. 4**



**Fig. 5**

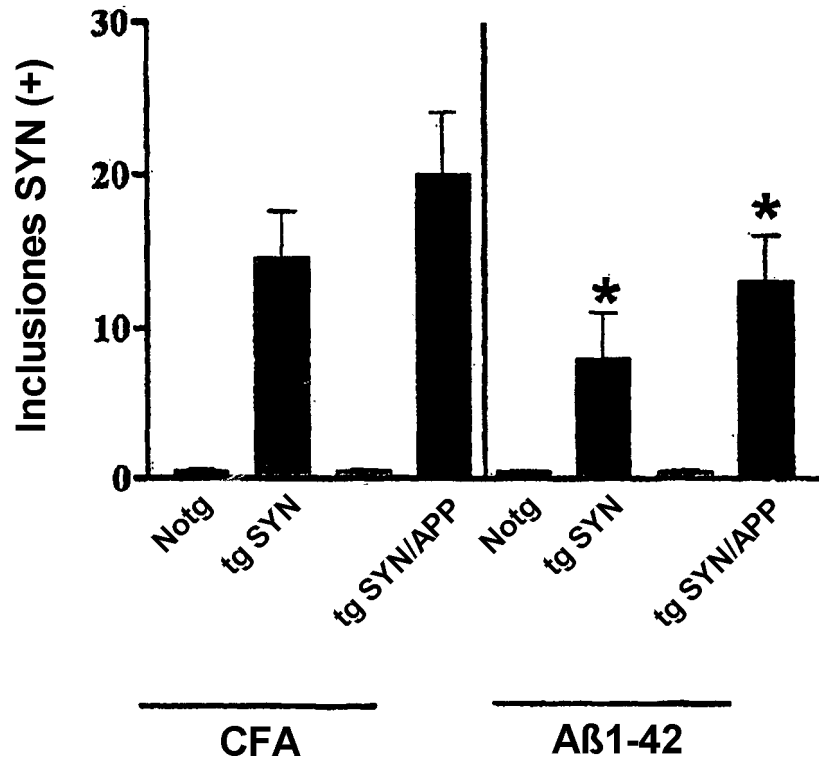


Fig. 6

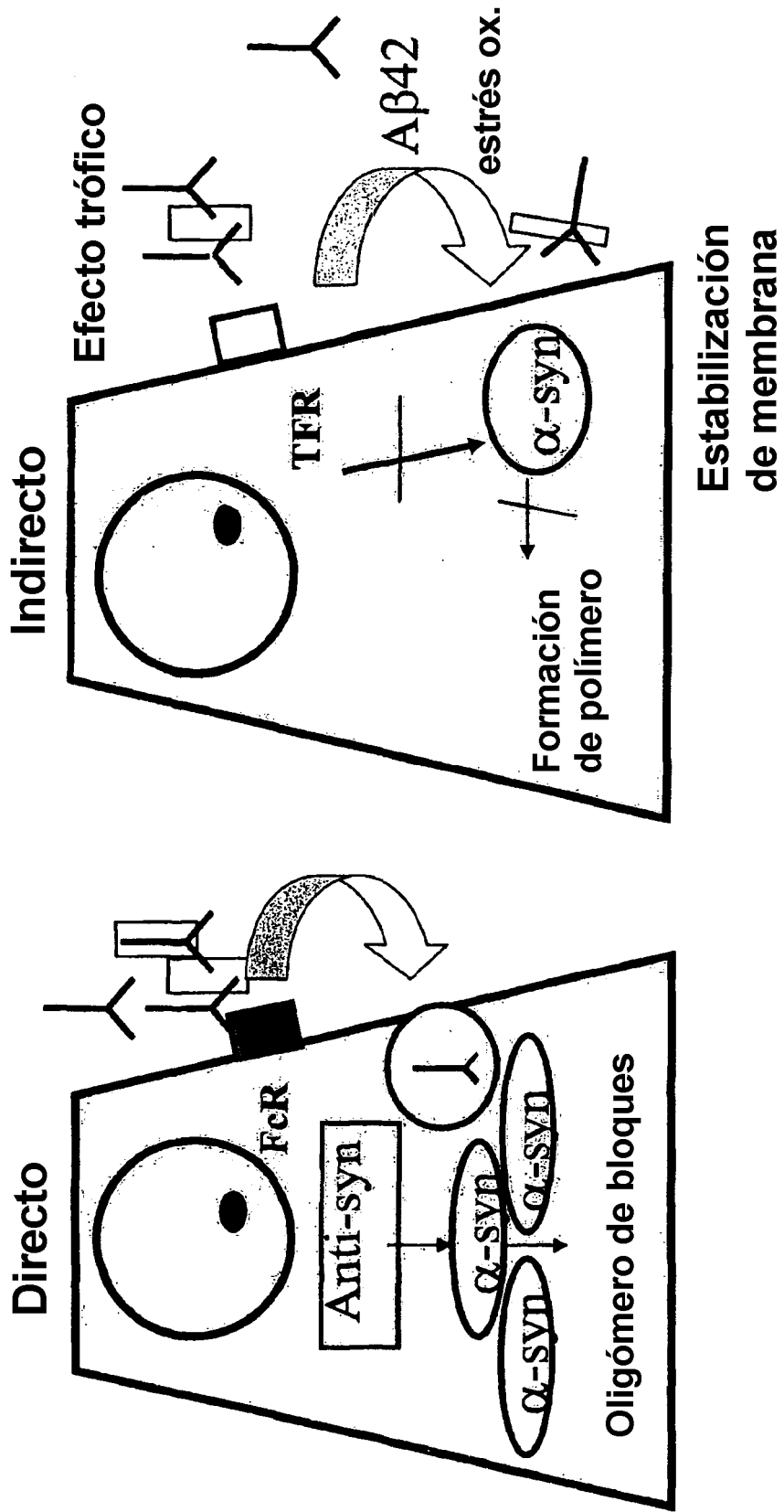


Figura 7

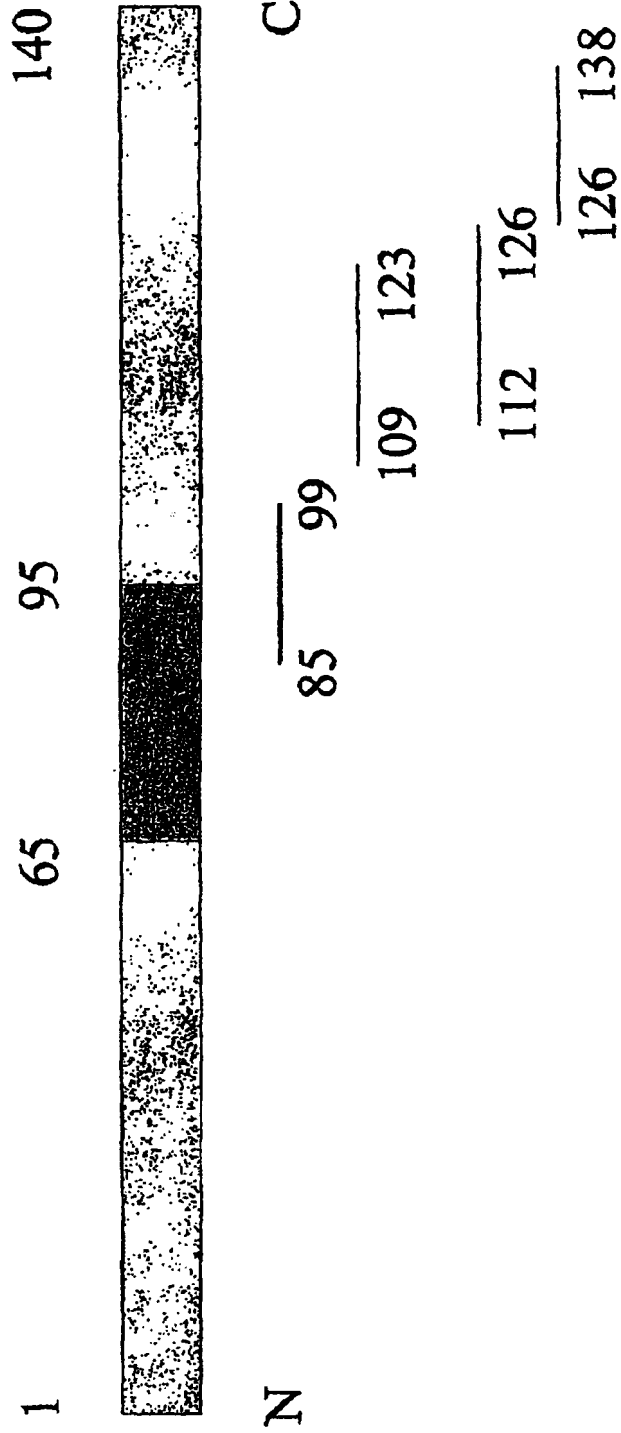


Fig. 8

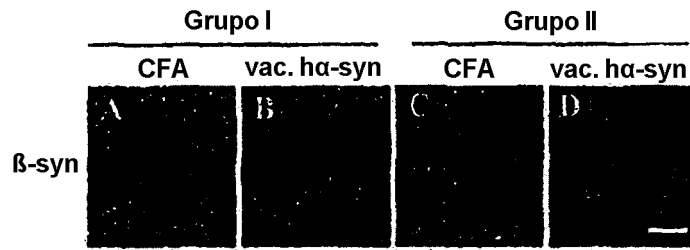


Fig. 9



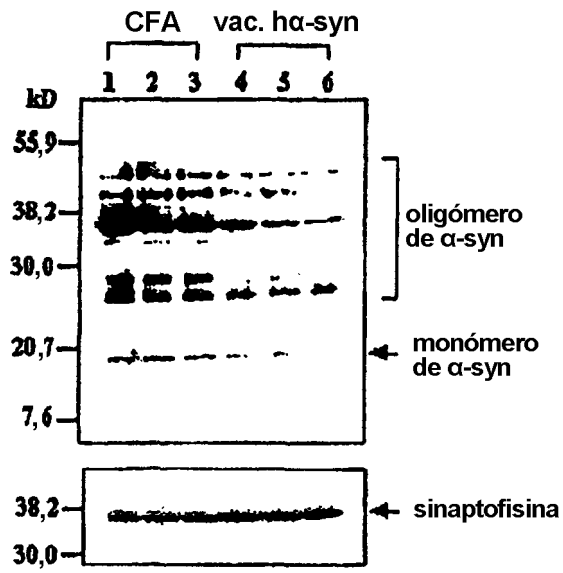


Fig. 10

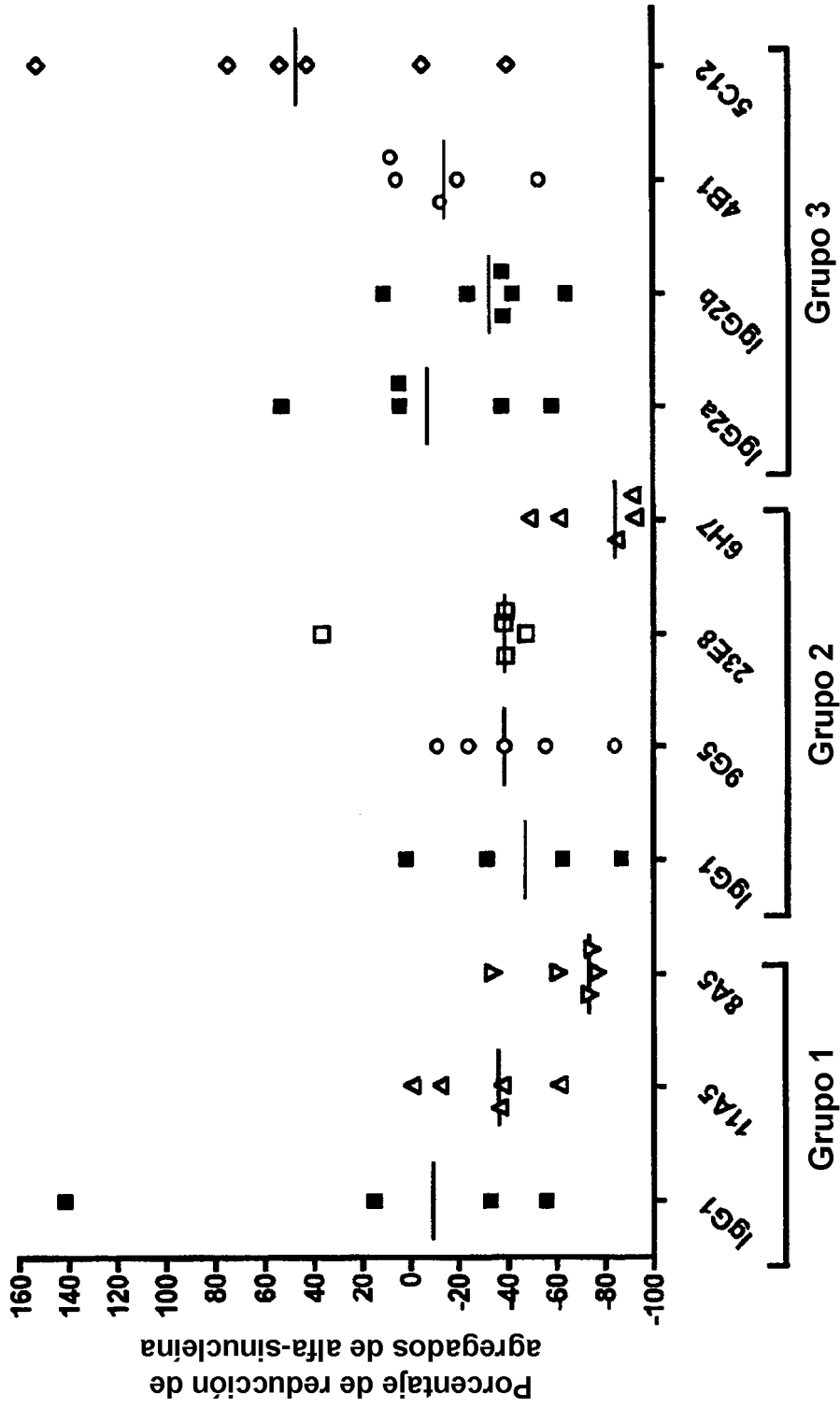
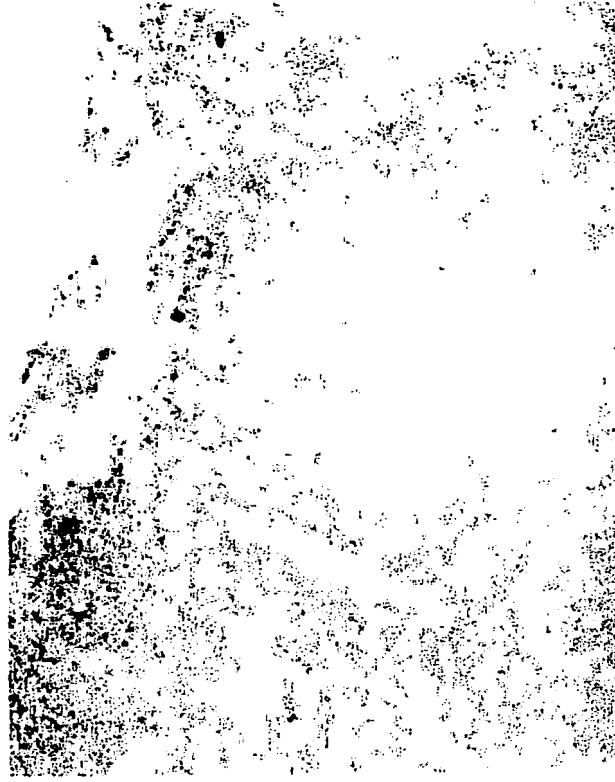
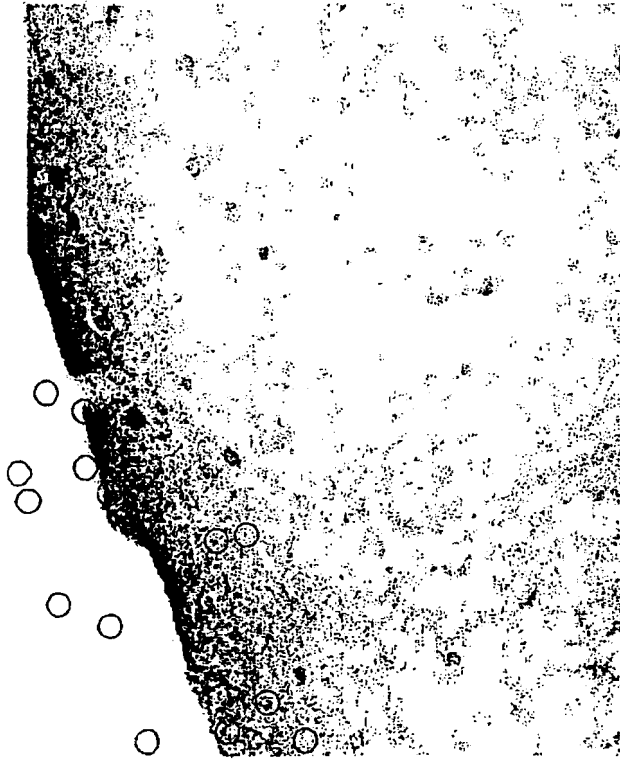


Figura 11



**Cara ipsilateral**



**Cara contralateral**

**Figura 12**

Figura 13

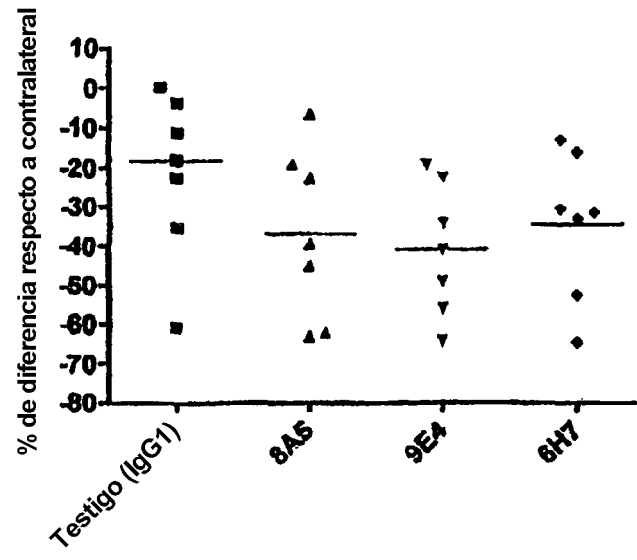


Figura 14

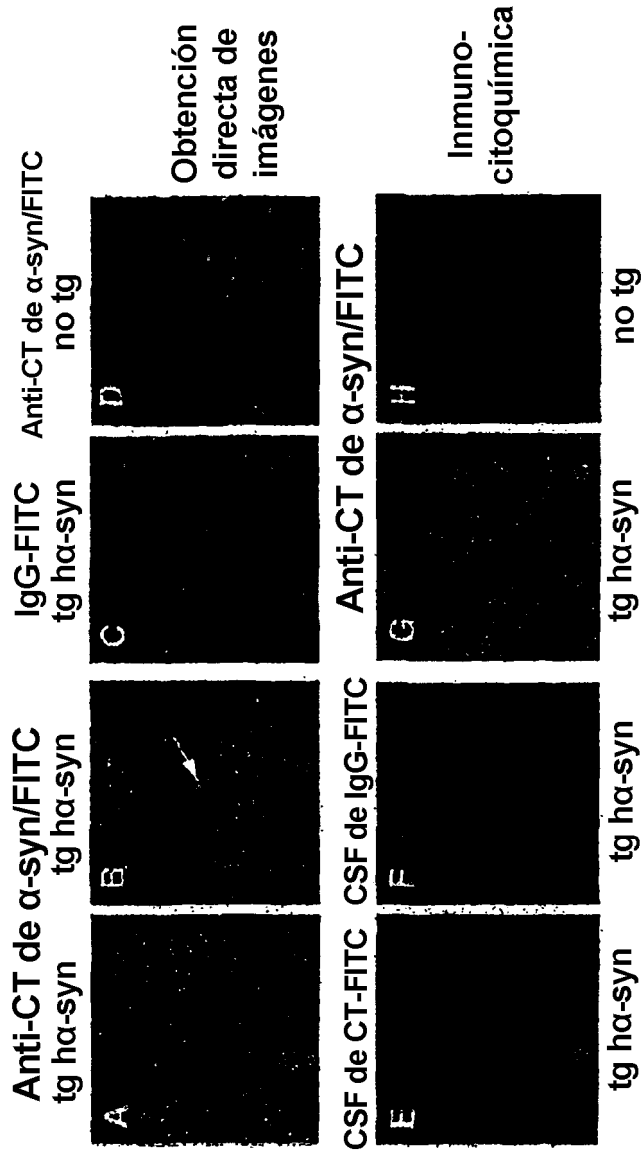
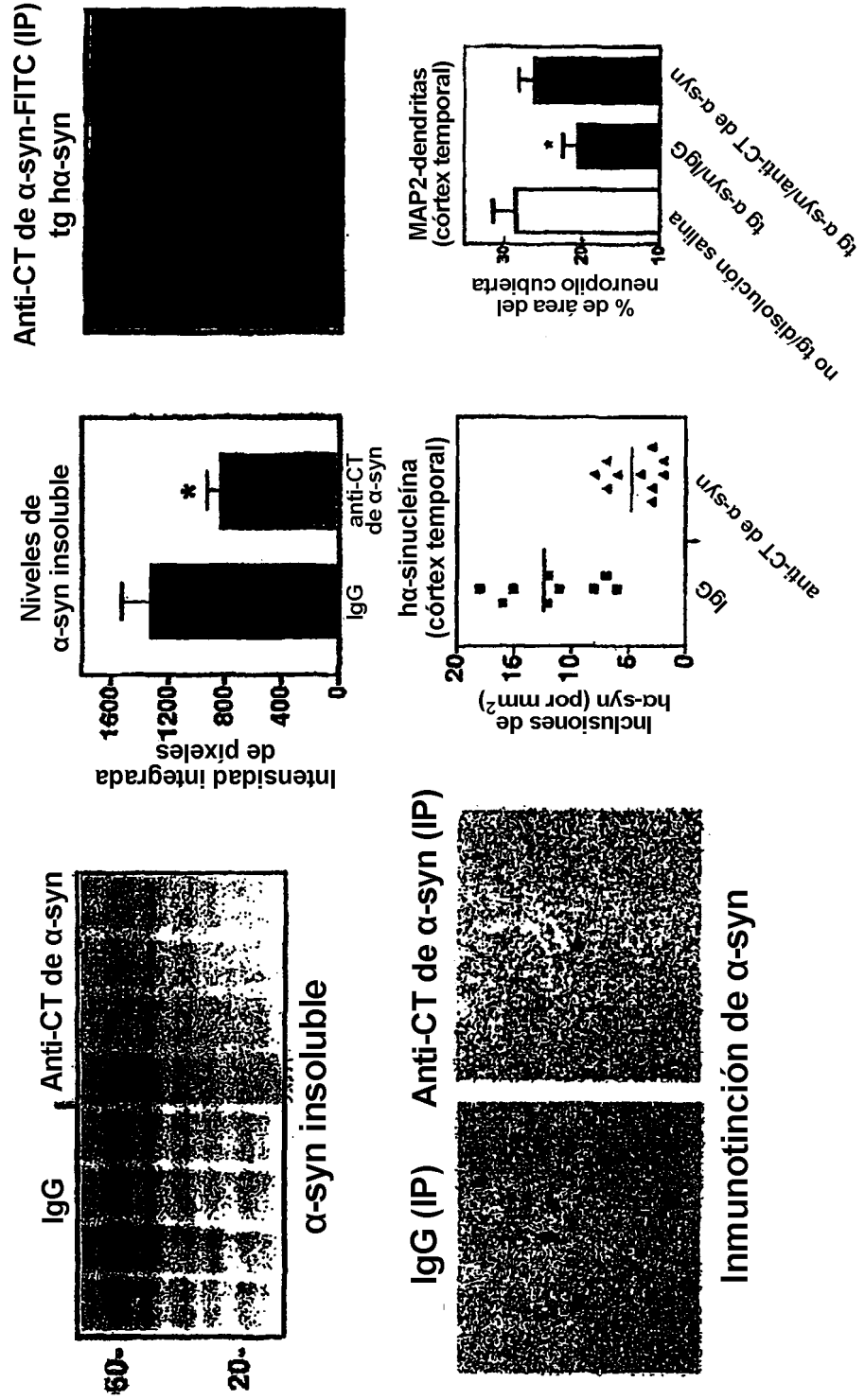


Figura 15



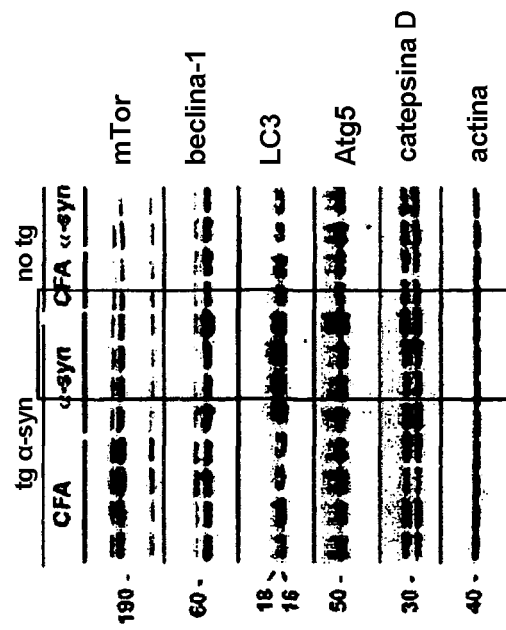


Figura 16

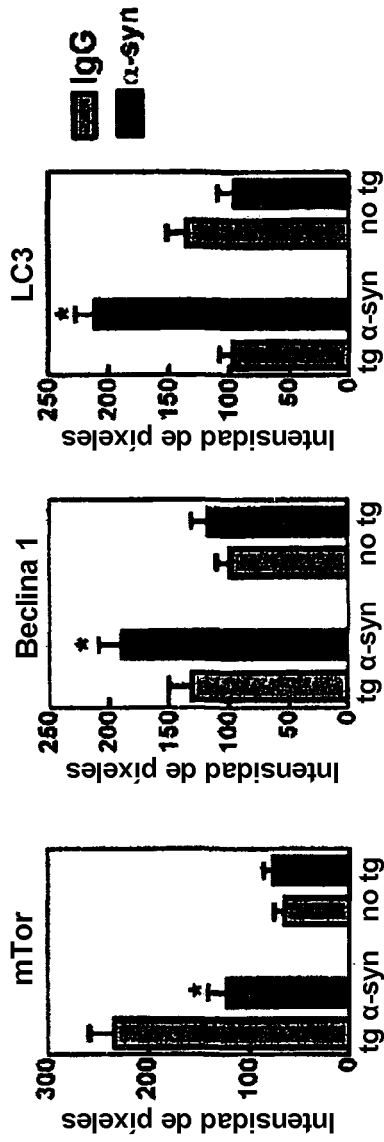


Figura 17

