

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 606**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2006 E 11175183 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2450056**

54 Título: **Prevención y tratamiento de la enfermedad sinucleinopatía y amiloide**

30 Prioridad:

**19.07.2005 US 185907**

**09.08.2005 WO PCT/US2005/028166**

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

**20.07.2017**

73 Titular/es:

**PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (50.0%)**  
**Monksland**  
**Athlone County Westmeath, 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, DORA KATE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 625 606 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).

## Prevención y tratamiento de la enfermedad sinucleinopatía y amiloide

### Descripción

#### 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0001]** Patología cerebral sinucleína alfa (alphaSN) es una característica notable de varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la Enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), atrofia de múltiples sistemas (MSA) y neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral tipo 1 (NBIA-1). Común a todas estas enfermedades, denominadas sinucleinopatías, son inclusiones proteináceas insolubles en las neuronas y las glías que están compuestas principalmente por alfaSN.

15 **[0002]** Cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy son inclusiones intraneuronales que están compuestas principalmente de alphaSN. Los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy son los signos neuropatológicos de la Enfermedad de Parkinson (EP). EP y otras enfermedades sinucleinopáticas se han denominado colectivamente enfermedad de cuerpos de Lewy (LBD). LBD se caracteriza por la degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deterioro cognitivo y formación de cuerpos de Lewy (LBs). (McKeith et al., Clinical and pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the CDLB International Workshop, *Neurology* (1996) 47:1113-24). Otros LBD incluyen la enfermedad difusa de cuerpo de Lewy (DLBD), la variante del cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), la enfermedad de Alzheimer (EA) y la atrofia de múltiples sistemas. Demencia con cuerpos de Lewy (DLB) es un término acuñado para conciliar diferencias en la terminología de LBDs.

25 **[0003]** Trastornos con LBs siguen siendo una causa común para los trastornos del movimiento y el deterioro cognitivo en el envejecimiento de la población (Galasko et al., Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias. *Arch. Neurol.* (1994) 51:888-95). Aunque su incidencia continúa aumentando, creando un serio problema de salud pública, hasta la fecha estos trastornos no son curables ni evitables y la comprensión de las causas y patogénesis de la DP es crítica para el desarrollo de nuevos tratamientos (Tanner et al., Epidemiology of Parkinson's disease and kinetic syndromes, *Curr. Opin. Neurol.* (2000) 13:427-30). La causa de la EP es controvertida y múltiples factores se han propuesto para desempeñar un papel, incluyendo diversas neurotoxinas y factores de susceptibilidad genética.

35 **[0004]** En los últimos años, ha surgido una nueva esperanza para la comprensión de la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Específicamente, varios estudios han demostrado que la proteína sináptica alfa-SN juega un papel central en la patogénesis de EP desde: (1) esta proteína se acumula en LBs (Spillantini et al., *Nature* (1997) 388: 839-40; Takeda et al., *AM J. Pathol* (1998) 152: 367-72; Wakabayashi et al., *Neurosci Lett* (1997) 239: 45-8), (2) las mutaciones en el gen de la alfa-SN co-segregan con formas familiares raras de parkinsonismo (Kruger y otros, *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: 12 65-9) y *Drosophila* (Feany et al., *Nature* (2000) 404: 394-8) imita varios aspectos patológicos de la EP. Por lo tanto, el hecho de que la acumulación de alfa-SN en el cerebro se asocie con alteraciones morfológicas y neurológicas similares en especies tan diversas como humanos, ratones y moscas sugiere que esta molécula contribuye al desarrollo de la DP.

45 **[0005]** Un fragmento de alfa-SN, previamente determinado para ser un constituyente de las placas amiloides EA, se denominó el componente no-amiloide-beta (no-A $\beta$ ), de amiloide EA (NAC) (Iwai A., *Biochim. Biophys. Acta* (2000) 1502: 95-109); Masliah et al., *AM. J. Pathol* (1996) 148: 201-10; Uéda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90: 11282 - 6). Aunque la función precisa de NAC no se conoce, puede jugar un papel crítico en eventos sinápticos, tales como la plasticidad neuronal durante el desarrollo, y el aprendizaje y la degeneración de los terminales nerviosos en condiciones patológicas en LBD, EA y otros trastornos (Hasimoto et al., *Alpha-Synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease, Brain Pathol* (1999) 9:707-20; Masliah, et al., (2000).

55 **[0006]** EA, EP, y la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) son los trastornos neurodegenerativos más comunes en los ancianos. Aunque su incidencia continúa aumentando, creando un grave problema de salud pública, hasta la fecha estos trastornos no son curables ni prevenibles. Estudios epidemiológicos recientes han demostrado una estrecha relación clínica entre EA y EP, ya que aproximadamente el 30% de los pacientes con Alzheimer también tienen EP. En comparación con el resto de la población envejecida, los pacientes con EA son, por tanto, más propensos a desarrollar EP concomitante. Además, los pacientes con DP que se convierten en demenciales generalmente han desarrollado EA clásica. Aunque cada enfermedad neurodegenerativa parece tener una predilección por regiones específicas del cerebro y poblaciones celulares, resultando en características patológicas distintas, EP, EA, DLB y LBD también comparten características patológicas comunes. Los pacientes con EA familiar, síndrome de Down, o EA esporádica desarrollan LBs en la amígdala, que son los signos neuropatológicos clásicos de la EP. Además, cada enfermedad se asocia con la degeneración de neuronas, conexiones neuronales interuronales y, finalmente, muerte celular, agotamiento de neurotransmisores y acumulación anormal de proteínas mal plegadas, cuyos precursores participan en la función normal del sistema nervioso central. Los estudios bioquímicos han confirmado el vínculo entre EA, EP y DLB.

**[0007]** Las placas neuríticas que son el sello patológico clásico de EA contienen péptido beta-amiloide (A $\beta$ ) y el péptido componente amiloide no-beta (NAC). A $\beta$  se deriva de una proteína precursora más grande denominada proteína precursora de amiloide (APP). NAC se deriva de una proteína precursora más grande denominada el componente amiloide no-beta de APP, ahora más comúnmente denominada alfa-SN. NAC comprende los residuos de aminoácidos 60-87 o 61-95 de alfa-SN. Tanto A $\beta$  como NAC se identificaron por primera vez en las placas amiloides como fragmentos proteolíticos de sus respectivas proteínas de longitud completa, para los cuales se identificaron y clonaron los ADNc de longitud completa.

**[0008]** Alpha-SN es parte de una gran familia de proteínas que incluyen sinucleína y sinoretina beta y gamma. 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 en alfa-SN humano (h) que mejoran la agregación de alfa-SN (Ala30Pro y Ala53Thr) y se asocian con formas raras de formas autosómicas dominantes de DP. El mecanismo por el cual estas mutaciones aumentan la propensión de alfa-SN al agregado son desconocidos.

**[0009]** A pesar de que un número de mutaciones se puede encontrar en APP y alfa-SN en la población, la mayoría de los casos de EA y EP 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, las razones de la acumulación excesiva de estas proteínas es desconocida. A $\beta$  se secreta de las neuronas y se acumula en las placas amiloides extracelulares. Adicionalmente A $\beta$  puede ser detectada dentro de las neuronas. Alfa-SN se acumula en las inclusiones intraneuronales llamadas LBs. Aunque las dos proteínas se encuentran típicamente juntas en placas neuronales extracelulares de EA, también se encuentran ocasionalmente juntas en inclusiones intracelulares.

**[0010]** Los mecanismos por los que la acumulación de alfa-SN conduce a la neurodegeneración y los síntomas característicos de EP no son claros. Sin embargo, la identificación del papel de los factores que promueven y/o bloquean la agregación de alfa-SN es fundamental para la comprensión de la patogénesis LBD y el desarrollo de nuevos tratamientos para sus trastornos asociados. La investigación para tratamientos de identificación se ha dirigido hacia la búsqueda de compuestos que reducen la agregación de alfa-SN (Hashimoto, *et al.*) o examinar los factores de crecimiento que promuevan la regeneración y/o la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, que son las células principalmente afectadas (Djaldetti *et al.*, New therapies for Parkinson's disease, *J. Neurol* (2001) 248:357-62; Kirik *et al.*, Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system, *J. Neurosci* (2000) 20:4686-4700). El uso de anticuerpos dirigidos al extremo C de alfa-SN para tratar LBD ha sido sugerido en la técnica (WO2004/041067, Masliah *et al.*, Effects of alpha-Synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease, *Neuron* (2005) 46:857-868). Estudios recientes en un modelo de ratón transgénico de EA han demostrado que los anticuerpos contra A $\beta$ 1-42 facilitan y estimulan la eliminación de amiloide en el cerebro, mejoran la EA como patología y resultando en una mejora en el rendimiento cognitivo (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). En contraste con las placas amiloides extracelulares que se encuentran en los cerebros de pacientes con Alzheimer, los cuerpos de Lewy son intracelulares, y los anticuerpos normalmente no entran en la célula.

**[0011]** Sorprendentemente, dada la naturaleza intracelular de LBs en el tejido cerebral, los autores han tenido éxito en la reducción del número de inclusiones en ratones transgénicos inmunizados con sinucleína. La presente descripción se dirige entre otras cosas a tratamiento de la EP y otras enfermedades asociadas con LBs mediante la administración de sinucleína, fragmentos de sinucleína, antígenos que imitan sinucleína o fragmentos de los mismos, o anticuerpos frente a ciertos epítomos de sinucleína a un paciente bajo condiciones que generan una respuesta inmune beneficiosa en el paciente. Los autores también han logrado sorprendentemente reducir el número de inclusiones en ratones transgénicos inmunizados con A $\beta$ . La presente descripción se dirige entre otras cosas a tratamiento de la EP y otras enfermedades asociadas con LBs por administración de A $\beta$ , fragmentos de A $\beta$ , antígenos que imitan A $\beta$  o fragmentos de los mismos, o anticuerpos para ciertos epítomos de A $\beta$  a un paciente bajo condiciones que generan una respuesta inmune beneficiosa en el paciente. Por tanto, la divulgación satisface una necesidad desde hace mucho tiempo para los regímenes terapéuticos para prevenir o mejorar la neuropatología y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado con EP y otras enfermedades asociadas con LBs.

#### BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

**[0012]** En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a la sinucleína alfa humana para su uso en efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad de cuerpos de Lewy, en el que el anticuerpo es: el anticuerpo 8A5 monoclonal producido por el hibridoma designado el número de acceso ATCC PTA 6909; Una forma quimérica del anticuerpo 8A5; o una versión humanizada del anticuerpo 8A5 que comprende las CDR del anticuerpo 8A5. En otro aspecto, la invención proporciona una célula del hibridoma designado con el número de acceso ATCC PTA - 6909. Los anticuerpos descritos en la presente invención pueden utilizarse en procedimientos para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación alfa-SN en el cerebro. Tales métodos implican la inducción de una respuesta inmunogénica contra la alfa-SN. Esta inducción se consigue mediante la

administración pasiva del anticuerpo a la sinucleína. En algunos métodos, el paciente está asintomático. En algunos métodos, el paciente tiene la enfermedad y es asintomático. En algunos métodos el paciente tiene 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 enfermedad de Parkinson, y la administración del agente mejora las características motoras del paciente. En algunos métodos, la enfermedad es la Enfermedad de Parkinson que administra el agente que impide el deterioro de las características motoras del paciente. En algunos métodos, el paciente está libre de la enfermedad de Alzheimer.

El anticuerpo usado 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 inmunizado humano con péptido alfa-SN y el humano puede ser el paciente a ser tratado con anticuerpo. En algunos métodos, el anticuerpo se une a la superficie externa de células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el anticuerpo se internaliza dentro de células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy.

**[0013]** En algunos procedimientos, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica. En algunos métodos, el anticuerpo se administra a una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferiblemente, al menos 1 mg/kg de anticuerpo de peso corporal. En algunos métodos, el anticuerpo se administra en múltiples dosis durante un período prolongado, por ejemplo, al menos seis meses. En algunos métodos pueden administrarse anticuerpos como una composición de liberación sostenida. El anticuerpo puede administrarse, por ejemplo, de forma periférica, intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosa. En algunos métodos, se monitoriza al paciente en cuanto al nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

**[0014]** En algunos procedimientos, el anticuerpo se administra mediante la administración de un polinucleótido que codifica al menos una cadena de anticuerpo al paciente. 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.

**[0015]** Esta invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo quimérico o humanizado como se define en la reivindicación 1.

**[0016]** La divulgación también proporciona procedimientos de prevención o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación alfa-SN en el cerebro que comprende la administración de un agente que induce una respuesta inmunogénica contra alfa-SN, y además comprende la administración de un segundo agente que induce una respuesta inmunogénica contra A $\beta$  para el paciente. En algunos métodos, el agente es un  $\beta$  o un fragmento activo del mismo. En algunos métodos, el agente es un anticuerpo para A $\beta$ .

**[0017]** La divulgación también proporciona procedimientos de prevención o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro que comprende la administración de un agente que induce una respuesta inmunogénica contra A $\beta$  a un paciente. En algunos procedimientos, el agente es un  $\beta$  o un fragmento activo del mismo. En algunos métodos, el agente es un anticuerpo para A $\beta$ . En algunos métodos la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, el paciente está libre de la enfermedad de Alzheimer y no tiene factores de riesgo de los mismos. En algunos métodos, comprenden además el control de un signo o síntoma de la Enfermedad de Parkinson en el paciente. En algunos métodos, la enfermedad es la Enfermedad de Parkinson y la administración del agente da como resultado una mejora en un signo o síntoma de la enfermedad de Parkinson.

**[0018]** Esta descripción proporciona 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 ha descrito anteriormente, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En algunos compuestos, el agente es alfa-SN o un fragmento activo, por ejemplo NAC, o cualquiera de los fragmentos c-terminales descritos en la solicitud. La descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo específico para un componente de un cuerpo de Lewy.

**[0019]** Esta descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un agente eficaz para provocar una respuesta inmune contra un componente sinucleína-NAC de una placa amiloide en un paciente. En algunos compuestos, el agente es alfa-SN o un fragmento activo, por ejemplo NAC, o cualquiera de los fragmentos C-terminales de sinucleína alfa descritos en la solicitud, y, opcionalmente, un adyuvante. En otros compuestos, el agente es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente al alfa-SN o un fragmento del mismo, y, opcionalmente, un vehículo farmacéutico.

**[0020]** La divulgación también proporciona procedimientos de cribado de un anticuerpo para la actividad en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con cuerpos de Lewy. Tales métodos implican poner en contacto una célula neuronal que expresa sinucleína con el anticuerpo. Entonces se determina si el contacto reduce los depósitos de sinucleína en las células en comparación con las células de control no contactadas con el anticuerpo.

**[0021]** La divulgación también proporciona procedimientos de cribado de un anticuerpo para la actividad en el tratamiento o prevención de una enfermedad de cuerpos de Lewy en el cerebro de un paciente. Tales métodos implican poner en contacto el anticuerpo con un polipéptido que comprende al menos cinco aminoácidos contiguos de alfa-SN. A continuación, se determina si el anticuerpo se une específicamente al polipéptido, la unión específica proporciona una indicación de que el anticuerpo tiene actividad en el tratamiento de la enfermedad. La descripción proporciona además métodos para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de sinucleína alfa en el cerebro.

**[0022]** También se describen métodos de efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de sinucleína alfa en el cerebro. En una realización, los métodos comprenden la administración a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad de un régimen eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de sinucleína alfa humana, estando los residuos numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. En otra realización, los métodos comprenden la administración a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad de un régimen eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-40 de sinucleína alfa humana, estando los restos numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 1. En otra realización más, los métodos comprenden la administración a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad de un régimen eficaz de un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-40 de sinucleína alfa humana y un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 70-140 de sinucleína alfa humana, estando los residuos numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

**[0023]** Cuando el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de la sinucleína alfa humana, los residuos se numeran de acuerdo con SEQ ID NO: 1, opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 83-140 de sinucleína alfa humana, siendo los restos numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 120-140 de sinucleína alfa humana. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente dentro de un epítipo dentro de un segmento de alucinucleína humana seleccionada del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128 y SN124-140, los residuos están numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

**[0024]** Cuando el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-40 de la sinucleína alfa humana, los residuos se numeran de acuerdo con SEQ ID NO: 1, opcionalmente el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20, o dentro de los residuos 1-10, siendo los restos numerados según SEQ ID NO: 1.

**[0025]** Cuando un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-40 de la sinucleína alfa humana y un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de la sinucleína alfa humana, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, opcionalmente el segundo anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 120 - 140 de sinucleína alfa 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.

**[0026]** Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Opcionalmente, el anticuerpo es una población policlonal de anticuerpos que carecen de unión específica a residuos de sinucleína alfa fuera del epítipo. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Opcionalmente, el anticuerpo es anticuerpo humano. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG1 humano. Opcionalmente, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica. Opcionalmente, el anticuerpo se administra a una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferiblemente, al menos 1 mg/kg de anticuerpo de peso corporal. Opcionalmente, el anticuerpo se administra en dosis múltiples durante al menos seis meses. Opcionalmente, el anticuerpo se administra como una composición de liberación sostenida. Opcionalmente, el anticuerpo se administra por vía intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosa. Opcionalmente, el anticuerpo se internaliza dentro de células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, el anticuerpo se une a la superficie externa de células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, el anticuerpo se une a sinucleína alfa en la superficie externa de células neuronales que promueven la reticulación de la sinucleína alfa. Donde la etapa de administración desagrega los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, la etapa de administración reduce los niveles de oligómeros de sinucleína alfa humana en las sinapsis. Opcionalmente, la etapa de administración limpia sinucleína alfa humana mediante la activación de una vía lisosómica. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a la sinucleína alfa humana desnaturalizada según se determina por inmunotransferencia. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a sinucleína alfa humana desnaturalizada con una afinidad de al menos  $10^9 M^{-1}$ . Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a las sinapsis según se determina por inmunocitoquímica.

**[0027]** La divulgación también proporciona una composición para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de sinucleína alfa en el cerebro, que comprende un primer anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20 de la sinucleína alfa humana y un segundo anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 (y preferiblemente residuos 120-140) de sinucleína alfa humana, estando los restos numerados de acuerdo con

SEQ ID NO: 1.

**[0028]** La divulgación también proporciona un kit para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de sinucleína alfa 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 sinucleína alfa humana y un segundo contenedor que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 (y preferiblemente residuos 120-140) de sinucleína alfa humana, estando los residuos numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 1.

**[0029]** La descripción proporciona además métodos para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de sinucleína alfa en el cerebro. Los métodos comprenden la administración a un paciente que sufre o está en riesgo de la enfermedad de un régimen eficaz de un agente que induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de sinucleína alfa humana, siendo los residuos numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 1, realizando de esta manera la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica está libre de anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-69 de alucinucleína humana, estando los restos numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente dentro de un segmento de alucinucleína humana seleccionada del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128 y SN124-140, los residuos están numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 1.

**[0030]** La descripción proporciona además métodos de cribado para un agente que tiene actividad útil en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy. Los métodos comprenden la puesta en contacto del agente con un animal transgénico no humano dispuesto para desarrollar una característica de una enfermedad del cuerpo de Lewy con el agente; y determinar si el agente afecta la extensión o velocidad de desarrollo de la característica relativa a un animal transgénico no humano de control. El agente es (i) un fragmento de sinucleína alfa que induce anticuerpos que se unen específicamente a al menos un epítipo dentro de los residuos 70-140 de sinucleína alfa humana o (ii) un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo con los residuos 70-140 de sinucleína alfa, siendo los restos numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 1.

**[0031]** Opcionalmente, el animal no humano transgénico comprende un transgén que expresa sinucleína alfa humana. Opcionalmente, el método comprende además el cribado de una pluralidad de anticuerpos de prueba para la unión a sinucleína alfa humana desnaturalizada y la selección del anticuerpo de unión más alto como agente. Opcionalmente, el método comprende además cribar una pluralidad de anticuerpos de prueba para unirse a depósitos de sinucleína en una sección de tejido por inmunocitoquímica, y seleccionar el anticuerpo de unión más alto como agente.

**[0032]** La invención proporciona además un método de anticuerpo monoclonal humanizante 8A5 producido por el hibridoma que tiene el número de acceso ATCC PTA-6909, que comprende: la determinación de la secuencia de aminoácidos de las CDR del anticuerpo monoclonal; seleccionar un anticuerpo aceptor; y producir un anticuerpo humanizado que comprende las CDR del anticuerpo monoclonal y marcos de regiones variables del anticuerpo aceptor.

**[0033]** La invención proporciona además un método para producir una forma quimérica de anticuerpo monoclonal 8A5 producido por el hibridoma que tiene el número de acceso ATCC PTA-6909, que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo monoclonal de cadena ligera y pesada; seleccionar la región constante de cadena pesada y ligera; producir un anticuerpo quimérico que comprende una cadena ligera que comprende la región variable de cadena ligera fusionada a la región constante de cadena ligera y una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada fusionada a la región constante de cadena pesada.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

##### **[0034]**

FIG. 1 muestra la secuencia de aminoácidos de alfa-SN (SEQ ID: 1) en alineación con dos secuencias de aminoácidos NAC, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente.

FIG. 2 muestra cortes cerebrales inmunohisturados de ratones no transgénicos (paneles A, E y I), ratones transgénicos alfa-SN inmunizados con adyuvante solo (paneles B, F, J) y ratones transgénicos alfa-SN inmunizados con alfa-SN que desarrollaron títulos bajos (paneles C, G y K) y títulos altos (paneles D, H, e I) de anticuerpos a alfa-SN. Las secciones se sometieron a tinción con un anticuerpo anti-alfa-sinucleína para detectar los niveles de sinucleína (paneles EA), un anticuerpo anti-IgG para determinar los niveles de IgG totales presentes en la sección (paneles EH) y para la Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), Un marcador de las células astrogiales.

FIG. 3 muestra los efectos de anticuerpo policlonal anti-mSYN en agregación de sinucleína en las células transfectadas de GT1-7 como se ve por microscopía de luz.

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

FIG. 5 muestra los resultados de estudios sobre el efecto de deposición amiloide de inmunización A $\beta$ 1-42 en los cerebros de los ratones no transgénicos, SYN, APP y SYN/APP transgénicos. Los niveles de amiloide detectables observados en APP y ratones SYN/APP se reducen por inmunización A $\beta$ 1-42.

FIG. 6 muestra los resultados de estudios sobre el efecto de inmunización A $\beta$ 1-42 sobre formación de inclusiones de sinucleína en los cerebros de ratones no transgénicos, SYN, APP y SYN/APP transgénicos. Inclusiones de sinucleína detectadas en ratones SYN y SYN/APP se reducen por inmunización A $\beta$ 1-42.

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

FIG. 8 muestra la cartografía de epítomos de anticuerpos. Los anticuerpos de los ratones que muestran altos títulos y anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína anti-humanos de alta afinidad se mapearon utilizando una técnica ELISA. En la mayoría de muestras anti-sueros de ratones vacunados, los epítomos reconocidos estaban dentro de la región C-terminal de  $\alpha$ -sinucleína humana. En los sueros de los controles tratados con CFA, no se detectaron epítomos.

La FIG. 9 muestra el análisis de imagen de los niveles de inmunoreactividad  $\alpha$ -sinucleína humana y otros marcadores de la neurodegeneración. (A) El número medio de inclusiones positivas por h $\alpha$ -sinucleína en la corteza temporal. La vacunación con  $\alpha$ -sinucleína humana resultó en una disminución significativa en el número de inclusiones en comparación con los controles. Este efecto fue más pronunciado en los ratones del grupo II en comparación con el grupo I. (B) El área porcentual del neuropilo ocupada por los terminales sinaptofisina-inmunorreactivos en la corteza frontal. En ratones transgénicos (tg) tratados sólo con CFA, el número de terminales inmunomarcados de sinaptofisina disminuyó en un 20%, mientras que los niveles de inmunoreactividad de sinaptofisina por sinapsis permanecieron sin cambios. (C) Los niveles de inmunoreactividad CD45 (marcador microglial) en la corteza temporal fueron ligeramente superiores en los cerebros de ratones vacunados  $\alpha$ -sinucleína humanos. (D) El área porcentual del neuropilo ocupado por terminales inmunorreactivas de  $\alpha$ -sinucleína humanos en la corteza temporal. En ratones tg vacunados con  $\alpha$ -sinucleína humano, hubo una disminución en la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en terminales de sinaptofisina-inmunorreactivos. \* = diferencia significativa en comparación con ratones tg  $\alpha$ -sinucleína humanos tratados con CFA solo ( $p < 0,05$ , prueba T de Student).

FIG. 10 muestra el análisis de transferencia Western de los niveles de  $\alpha$ -sinucleína humana y la inmunoreactividad de sinaptofisina en los animales vacunados. En comparación con los cerebros de ratones tg tratados con CFA solo (carriles 1-3), en ratones tg vacunados de h $\alpha$ -sinucleína (carriles 4-6), los niveles tanto de oligómeros como monómeros  $\alpha$ -sinucleína humanos se redujeron (panel superior), mientras que los niveles de la inmunoreactividad de sinaptofisina se aumentaron en el último grupo (panel inferior).

FIG. 11 muestra el análisis de agregados de  $\alpha$ -sinucleína intraneuronal después de inyección intracerebral de anticuerpos de anti- $\alpha$ -sinucleína. El anticuerpo C-terminal 8A5 y el anticuerpo N-terminal 6H7 tuvieron un efecto compensador. IgG1, IgG2a e IgG2b fueron controles de isotipo. Las barras horizontales representan la mediana.

FIG. 12 muestra secciones del lado contralateral (panel izquierdo; puntos redondos marrón dentro de la sección son agregados de  $\alpha$ -sinucleína) y el lado ipsilateral (panel derecho) de un ratón inyectado con el anticuerpo monoclonal 8A5. La inmunotinción se realizó con un anticuerpo policlonal para  $\alpha$ -sinucleína. Agregados intraneuronales  $\alpha$ -sinucleína en el lado contralateral se rodearon.

## DEFINICIONES

**[0035]** El término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos 65 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 80 o 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia o más (*por ejemplo*, identidad de secuencia de 99 por ciento o superior). Preferiblemente, las posiciones de residuo que no son idénticas se diferencian por sustituciones conservativas de aminoácidos.

**[0036]** Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la que las secuencias de prueba se comparan. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, las coordenadas de subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de

secuencias calcula entonces la identidad de secuencia por ciento para la secuencia de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

5 **[0037]** La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, *por ejemplo*, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Mates. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nacional. Acad. Sci. EE.UU. 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase *generalmente* Ausubel *et al.*, *supra*). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de  
10 identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Típicamente, los parámetros del programa por defecto se pueden utilizar para realizar la comparación de secuencias, aunque también pueden usarse parámetros  
15 personalizados. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89, 10915 (1989)).

20 **[0038]** Para los propósitos de clasificación de sustituciones de aminoácidos como ácidos conservativos o no conservativos, aminoácidos son agrupados del siguiente modo: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales neutras hidrófilas): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservativas  
25 constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

30 **[0039]** Los agentes terapéuticos de la invención son típicamente sustancialmente puros a partir de contaminante no deseado. Esto significa que un agente es típicamente al menos una pureza de aproximadamente 50% en peso (peso/peso), así como que está sustancialmente libre de proteínas y contaminantes interferentes. A veces los agentes tienen al menos aproximadamente una pureza de 80% en peso y, más preferiblemente al menos 90 o aproximadamente 95% en peso. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, los péptidos homogéneos de al menos el 99% en peso puede obtenerse.

35 **[0040]** 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 otros productos biológicos. Así, bajo condiciones de inmunoensayo designadas, una molécula especificada se une preferentemente a una diana particular y no se une en una cantidad significativa a otros biológicos presentes en la muestra. La unión específica de un anticuerpo para un objetivo en tales condiciones requiere que el anticuerpo se seleccione por su especificidad a la diana. Una variedad de formatos de inmunoensayo se puede usar para seleccionar anticuerpos  
40 específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, inmunoensayos de ELISA en fase sólida se utilizan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, *por ejemplo*, Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que se pueden utilizar para determinar la inmunorreactividad específica. La unión específica entre dos entidades significa una afinidad de al  
45 menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9 M^{-1}$ , o  $10^{10} M^{-1}$ . Se prefieren afinidades mayores que  $10^8 M^{-1}$ .

50 **[0041]** El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se usa para incluir anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Normalmente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que se derivan para la unión a un antígeno específico. Los fragmentos incluyen cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, Fab, Fab' F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, y Fv. Los fragmentos se producen por técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye una o más cadenas de inmunoglobulina que se conjugan químicamente a, o se expresan como proteínas de fusión con otras proteínas. El término "anticuerpo" también incluye anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos  
55 biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridótipos o unión de fragmentos Fab'. Véase, *por ejemplo*, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992). El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos de cadena única en el que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos a través de un espaciador.

60 **[0042]** APP<sup>695</sup>, APP<sup>751</sup>, y APP<sup>770</sup> se refieren, respectivamente, a la 695, 751, y 770 polipéptidos largos de residuos aminoácidos codificados por el gen APP humano. Véase Kang *et al.*, Nature 325, 773 (1987); Ponte *et al.*, Nature 331, 525 (1988); y Kitaguchi *et al.*, Nature 331, 530 (1988). A los aminoácidos dentro de la proteína precursora amiloide humana (APP) se les asignan números según la secuencia de la isoforma APP770. Los términos tales como Aβ<sub>39</sub>, Aβ<sub>40</sub>, Aβ<sub>41</sub>, Aβ<sub>42</sub> y Aβ<sub>43</sub> se refieren a un péptido Aβ que contiene residuos de aminoácidos 1-39, 1-  
65 40, 1-41, 1-42 y 1-43.

**[0043]** Un "antígeno" es una entidad a la que un anticuerpo se une específicamente.

**[0044]** El término "epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que responden células B y/o T. Epítomos de células B se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se retienen en la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítomos formados por el plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítopo incluye normalmente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 o 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítomos incluyen cristalografía de rayos X, por ejemplo, y de resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, *por ejemplo*, Epitope Mapping Protocols en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. Células T reconocen epítomos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para las células CD8 o aproximadamente 13-15 aminoácidos para las células CD4. Las células T que reconocen el epítopo pueden identificarse mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, como se determina por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina por las células T cebadas en respuesta a un epítopo (Burke et al., *J. Inf. Dis.* 170, 1110-1119 (1994)), por eliminación dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos citotóxicos T, Tigges et al., *J. Immunol.* 156, 3901 a 3910) o mediante la secreción de citoquinas.

**[0045]** El término respuesta "inmunológica" o "inmune" es el desarrollo de una respuesta humoral beneficiosa (mediada por anticuerpo) y/o una respuesta celular (mediada por células T específicas de antígeno o sus productos de secreción) dirigida contra un péptido amiloide en un paciente receptor. Tal respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpo o células T cebadas. Una respuesta inmune celular se provoca por la presentación de epítomos polipeptídicos en asociación con moléculas MHC de clase I o clase II para activar células T colaboradoras CD4<sup>+</sup> y/o células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>. La respuesta también puede implicar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de microglia, eosinófilos u otros componentes de la inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante ensayos de proliferación (Células T CD4<sup>+</sup>) o ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos) (véase Burke, *supra*; Tigges, *supra*). Las contribuciones relativas de las respuestas humoral y celular al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno pueden distinguirse aislando separadamente anticuerpos y las células T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

**[0046]** Un "agente inmunogénico" o "inmunógeno" es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí misma en la administración a un mamífero, opcionalmente junto con un adyuvante.

**[0047]** El término "todo-D" se refiere a péptidos que tienen  $\geq 75\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 85\%$ ,  $\geq 90\%$ ,  $\geq 95\%$ , y 100% de aminoácido de configuración D.

**[0048]** El término "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido no complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos a veces se clonan en un vector plásmido.

**[0049]** El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra junto con un antígeno aumenta la respuesta inmune al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmune al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunitaria mediante varios mecanismos que incluyen el reclutamiento de linfocitos, de estimulación de células B y/o T, y la estimulación de los macrófagos.

**[0050]** El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento ya sea profiláctico o terapéutico.

**[0051]** La competencia entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que la inmunoglobulina bajo ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como alfa-SN. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo de enzima directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competición de sandwich (véase Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9: 242- 253 (1983)); EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (véase Kirkland et al., *J. Immunol* 137: 3614 a 3619 (1986)); ensayo de marcado directo en fase sólida, ensayo sandwich marcado directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, *Antibodies*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); marcador directo RIA en fase sólida usando etiqueta I-125 (véase Morel et al., *Molec Immunol* 25 (1): 7-15 (1988)); EIA de biotina-avidina en fase sólida directa (Cheung et al., *Virology* 176: 546-552 (1990)); y RIA directo marcado (Moldenhauer et al., *Scand J. Immunol* 32: 77-82 (1990)). Típicamente, un ensayo tal implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de éstos, una inmunoglobulina de ensayo no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Por lo general, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados mediante el ensayo de competición (anticuerpos que compiten) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia y los anticuerpos que se unen a un epítopo adyacente

suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para el impedimento estérico que se produzca. Por lo general, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 50% o 75%.

5 **[0052]** El término "síntoma" o "síntoma clínico" se refiere a una prueba subjetiva de una enfermedad, tal como marcha alterada, como percibida por el paciente. Una "señal" se refiere a la evidencia objetivo de una enfermedad como se observa por un médico.

10 **[0053]** La frase "en combinación", cuando se refiere a la administración de dos o más anticuerpos de sinucleína alfa anti-humana (es decir, cada uno que reconoce un epítipo diferente) o administración de dos o más polipéptidos o inmunógenos que inducen una respuesta de anticuerpos contra la sinucleína alfa 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 conjugado (*por ejemplo*, físicamente vinculados entre sí), una co-formulación (*por ejemplo*, en el que los agentes se combinan o se componen en una forma de dosificación, *por ejemplo*, una liberación sostenida o depósito de formulación), la administración como composiciones separadas dentro de unos pocos minutos o dos horas una de la otra (co-administración), o administración como composiciones separadas en 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 de la misma condición. Cada agente se puede administrar una vez o múltiples veces. Por ejemplo, un agente puede ser administrado primero y el segundo agente administrado el siguiente día o semana siguiente. Del mismo modo, los dos agentes pueden ser administrados cada uno más de una vez, por ejemplo, en días secuenciales, días alternos, semanas alternas, o de acuerdo con otros horarios (por ejemplo, de tal manera que se espera que el beneficio para el paciente supere el de la administración de cualquiera agente solo).

25 **[0054]** Un fragmento designado en la forma SNx-y significa un fragmento de sinucleína alfa que comienza en el aminoácido X y termina en el aminoácido Y. Tal fragmento puede estar unido a un polipéptido heterólogo, pero no a otros aminoácidos de la sinucleína alfa humana tal que el fragmento comienza antes de X o termina después de Y.

30 **[0055]** Los residuos en sinucleína alfa o un fragmento de los mismos están numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 1 cuando sinucleína alfa o el fragmento es máximamente alineado con SEQ ID NO: 1 como se ha descrito anteriormente utilizando los parámetros por defecto.

35 **[0056]** Las composiciones o métodos "que comprenden" uno o más elementos recitados pueden incluir otros elementos no específicamente indicados. Por ejemplo, una composición que comprende el péptido alfa-SN que abarca tanto un péptido aislado de alfa-SN como péptido alfa-SN como un componente de una secuencia polipeptídica más grande.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

#### 40 I. GENERAL

**[0057]** La invención proporciona anticuerpos para uso en métodos de prevención o tratamiento de varias enfermedades y condiciones caracterizadas por la presencia de depósitos de péptido alfa-SN agregados a una masa insoluble en el cerebro de un paciente, en forma de cuerpos de Lewy. Tales enfermedades se denominan colectivamente como enfermedades con cuerpos de Lewy (LBD) e incluyen la Enfermedad de Parkinson (EP). Tales enfermedades se caracterizan por los agregados de alfa-SN que tienen una estructura de lámina plegada  $\beta$  y mancha con tioflavina-S y Congo rojo (véase Hasimoto, *Ibid*). Los métodos de prevención o tratamiento de tales enfermedades utilizan un agente que puede generar una respuesta inmunogénica a la alfa-SN. La respuesta inmunogénica actúa para prevenir la formación de, o borrar, depósitos de sinucleína dentro de las células en el cerebro. Aunque una comprensión de mecanismo no es esencial para la práctica de la invención, la respuesta inmunogénica puede inducir la eliminación como consecuencia de anticuerpos a sinucleína que se internalizan en las células, solos o con sinucleína alfa. Los resultados presentados en los ejemplos muestran que anticuerpos a la sinucleína alfa administrados periféricamente cruzan la barrera de sangre del cerebro, y se internalizan, ya sea solo o con sinucleína alfa, dentro de las células que contienen depósitos de sinucleína alfa. Anticuerpos internalizados pueden promover la degradación de sinucleína alfa a través de la activación de vías lisosomales. Anticuerpos internalizados con afinidad por sinucleína alfa en forma desnaturalizada también pueden estabilizar la molécula en forma no agregada. Alternativamente o adicionalmente, los anticuerpos pueden interferir con la agregación de sinucleína en la superficie exterior de la célula. Por ejemplo, los anticuerpos a la sinucleína alfa pueden reconocer y reticular anormalmente proteínas conformadas en la superficie de células neuronales. En algunos procedimientos, la respuesta de eliminación puede efectuarse al menos en parte por fagocitosis mediada por el receptor Fc. La inmunización con sinucleína puede reducir la acumulación de sinucleína en las sinapsis y cuerpos celulares neuronales en el cerebro. Aunque una comprensión de mecanismo no es esencial para la práctica de la invención, este resultado puede explicarse por anticuerpos a sinucleína que se absorbe por las células neuronales (por ejemplo, por las vesículas sinápticas).

65 **[0058]** Opcionalmente, agentes generadores de una respuesta inmunogénica contra alfa-SN se pueden utilizar en

combinación con agentes que generan una respuesta inmunogénica a A $\beta$ . La respuesta inmunogénica es útil en la limpieza de los depósitos de A $\beta$  en individuos que tienen tales depósitos (por ejemplo, los individuos que tienen tanto enfermedad de Alzheimer como de Parkinson); sin embargo, la respuesta inmunogénica también tiene actividad en la limpieza de los depósitos de sinucleína. Por lo tanto, la presente descripción utiliza dichos agentes solo, o en combinación con agentes de generación de una respuesta inmunogénica a alfa-SN en individuos con LBD pero que no está sufriendo o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

**[0059]** La descripción proporciona además composiciones farmacéuticas y métodos para prevenir y tratar la enfermedad amiloidogénica. Se ha demostrado que la sinucleína alfa y beta están involucradas en la nucleación de los depósitos amiloides en ciertas enfermedades amiloides, especialmente la enfermedad de Alzheimer. (Clayton, DF, et al., TINS 21 (6): 249-255, 1998). Más específicamente, un fragmento del dominio NAC de sinucleína alfa y beta (residuos 61-95) ha sido aislado de placas amiloides en pacientes de Alzheimer; de hecho, este fragmento comprende aproximadamente 10% de la placa que queda insoluble después de la solubilización con sulfato de dodecilo sódico (SDS). (George, J.M., et al Neurosci News 1: 12-17, 1995). Además, tanto alfa-SN de longitud completa como el fragmento NAC han sido informados para acelerar la agregación de péptido  $\beta$ -amiloide en amiloide insoluble *in vitro*. (Clayton, *supra*). El componente de NAC de placas amiloides de identificación sirve como diana para tratamientos basados inmunológicamente de la presente invención, como se detalla a continuación. De acuerdo con un aspecto, la divulgación incluye composiciones farmacéuticas que comprenden agentes eficaces para provocar una respuesta inmune contra un componente de sinucleína-NAC de una placa amiloide en un paciente. Tales composiciones pueden ser eficaces para prevenir, retardar, o reducir la deposición de la placa en la enfermedad amiloide.

## II. AGENTES QUE GENERAN UNA RESPUESTA INMUNOGÉNICA FRENTE A SINUCLEÍNA ALFA

**[0060]** Una respuesta inmunogénica puede ser activa, como cuando se administra un inmunógeno para inducir anticuerpos reactivos con alfa-SN en un paciente, o pasivos, como cuando se administra un anticuerpo que se une a la alfa-SN en un paciente; la invención reivindicada es pasiva.

**[0061]** Sinucleína alfa se identificó originalmente en el cerebro humano como la proteína precursora del componente no  $\beta$ -amiloide de (NAC) de las placas EA. (Ueda et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 90 (23): 11282 a 11286 (1993). Alfa-SN, también denominada el precursor del componente no A $\beta$  de amiloide EA (NACP), es un péptido de 140 aminoácidos alfa-SN tiene la secuencia de aminoácidos:

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVV  
 HGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGTFVKKDQLGKNE  
 EGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYPEA (SEQ ID NO:1)

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

**[0062]** El componente no A $\beta$  de amiloide EA (NAC) se deriva de alfa-SN. NAC, un dominio altamente hidrofóbico dentro de sinucleína alfa, es un péptido que consiste de al menos 28 residuos aminoácidos (residuos 60-87) (SEQ ID NO: 3) y, opcionalmente, 35 residuos de aminoácidos (residuos 61-95) (SEQ ID NO : 2). Véase FIG. 1. NAC muestra una tendencia a formar una estructura de hoja beta (Iwai, et al., Biochemistry, 34: 10.139-10.145). Jensen *et al.* han informado que NAC tiene la secuencia de aminoácidos:

EQVTNVGGAWTGTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV (SEQ ID NO: 2) (Jensen et al., Biochem J. 310 (Pt 1): 91-94 (1995); número de acceso GenBank S56746).

Ueda *et al.* han informado de que NAC tiene la secuencia de ácido:

KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (SEQ ID NO: 3)

(Ueda et al., PNAS EE.UU. 90: 11.282-11.286 (1993).

**[0063]** Alfa-SN desagregados o fragmentos de los mismos, incluyendo NAC, significa unidades peptídicas monoméricas. Alfa-SN desagregados o fragmentos de los mismos son generalmente solubles, y son capaces de auto-agregación para formar oligómeros solubles. Los oligómeros de alfa-SN y fragmentos de los mismos son por lo general solubles y existen predominantemente como hélices alfa. Alfa-SN monomérica puede prepararse *in vitro* mediante la disolución de péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La solución resultante se centrifuga para eliminar cualquier partícula insoluble. Alfa-SN agregados o fragmentos de los mismos, incluyendo NAC, significa oligómeros de alfa-SN o fragmentos de los mismos que se han asociado en conjuntos de hoja beta insolubles. Alfa-SN agregados o fragmentos de los mismos, incluyendo NAC, significa también polímeros fibrilares. Las fibrillas son generalmente insolubles. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN o fragmentos de los mismos, ya sea soluble o Alfa-

SN agregados o fragmentos de los mismos. Algunos anticuerpos se unen a oligómeros de sinucleína alfa más fuertemente que a las formas monoméricas o formas fibrilares. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN tanto soluble como agregada o fragmentos de los mismos, y formas opcionalmente oligoméricas también.

5 **[0064]** La referencia a alfa-SN incluye las secuencias de aminoácidos humanos naturales indicados anteriormente, así como análogos incluyendo alélico, especies y variantes inducidas, las formas de longitud completa y fragmentos inmunogénicos de los mismos. Sinucleína alfa humana, lo que significa una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos como SEC NO: 1 o variantes alélicas de los mismos, se prefiere en todas las realizaciones. Los análogos típicamente difieren de los péptidos de origen natural en una, dos o unas pocas posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservadoras. Los análogos presentan típicamente al menos 80 o 90% de identidad de secuencia con los péptidos naturales. A las posiciones de aminoácidos en análogos de sinucleína alfa naturales se les asignan números de aminoácidos en sinucleína alfa natural correspondiente cuando la sinucleína alfa natural y analógica se alinean máximamente. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de N o C terminales de los ácidos aminados en una, dos o unas pocas posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido glutámico natural, en la posición 139 de alfa-SN puede reemplazarse con ácido iso-aspártico. Ejemplos de aminoácidos no naturales son aminoácidos D, alfa, alfa-disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, 4-hidroxi-prolina, gamma-carboxiglutamato, epsilon-N,N,N-trimetilisina, epsilon-N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilina, omega-N-metilarginina, beta-alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido butírico gamma-amino, homoserina, citrulina, y ácido isoaspártico.

#### 1. Agentes de la respuesta inmune pasiva

25 **[0065]** Los agentes terapéuticos de la invención, según se reivindica, son anticuerpos que se unen específicamente a alfa-SN. Los anticuerpos inmunorreactivos para alfa-SN son conocidos (véase, por ejemplo, Arima, et al., Brian Res 808: 93-10 0 (1998); Crowther et al., Neuroscience Lett 292: 12 8-130 (2000); Spillantini, et al. Nature 388: 839-840 (1997) tales anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Algunos de tales anticuerpos se unen específicamente a los agregados insolubles de alfa-SN sin unirse específicamente a la forma monomérica soluble. Algunos se unen específicamente específicamente a la forma monomérica soluble sin unirse a la forma agregada insoluble. Algunos se unen específicamente a las dos formas monoméricas agregadas y solubles. Algunos de tales anticuerpos se unen específicamente a una forma corta natural de alfa-SN (por ejemplo, NAC) sin unirse a una forma natural de alfa-SN de longitud completa. Algunos anticuerpos se unen específicamente a una forma larga sin unirse a una forma corta. Algunos anticuerpos se unen específicamente a la alfa-SN sin unirse a otros componentes de LBs. Algunos anticuerpos se unen específicamente a alfa-SN sin unirse específicamente o otros componentes de las placas amiloides. Véase la publicación de la patente PCT WO 05/0138889 y en la solicitud de Estados Unidos N° 60/471.929 presentada el 19 de mayo de 2003, proporciona anticuerpos específicos de gama que se unen específicamente a fragmentos de sinucleína alfa sin unirse específicamente a sinucleína alfa intacta per se. Estos anticuerpos son útiles en métodos de prevención y tratamiento de la enfermedad sinucleinopática y amiloidogénica.

40 **[0066]** En experimentos llevados a cabo en apoyo de la invención, un ensayo predictivo *ex vivo* (Ejemplo VII) se utilizó a la limpieza de prueba de un anticuerpo que se une específicamente a sinucleína-NAC. Un anticuerpo a NAC se puso en contacto con una muestra de tejido cerebral que contenía placas de amiloide y células microgliales. El suero de conejo se usó como un control. El control posterior mostró una marcada reducción en el número y tamaño de placas indicativas de la actividad de liquidación del anticuerpo.

45 **[0067]** A partir de estos datos, es evidente que la carga de placa amiloide asociada con la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades amiloides pueden disminuirse en gran medida por la administración de reactivos inmunológicos dirigidos contra epítomos de NAC, que son eficaces para reducir la carga de placa amiloide. Se entiende además que una amplia variedad de anticuerpos se puede utilizar en tales composiciones. Como se discutió anteriormente, la Solicitud de EE.UU. N° 60/471.929 presentada el 19 de mayo de 2003, proporciona anticuerpos específicos de gama que se unen específicamente a fragmentos de sinucleína alfa sin unirse específicamente a sinucleína alfa intacta per se.

55 **[0068]** Los anticuerpos utilizados en los métodos terapéuticos por lo general tienen una región constante intacta o al menos suficiente de la región constante para interactuar con un receptor de Fc. Isotipo IgG1 humano es preferido debido a que tiene mayor afinidad de los isotipos humanos por el receptor FcRI en células fagocíticas. Fragmentos biespecíficos Fab también se pueden utilizar, en los que un brazo del anticuerpo tiene especificidad para alfa-SN, y el otro para un receptor de Fc. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN, opcionalmente en una forma desnaturalizada, tal como cuando se tratan con SDS, con una afinidad de unión mayor que o igual a aproximadamente  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ , o  $10^{10}M^{-1}$ . Algunos anticuerpos de la invención se unen específicamente a sinucleína alfa humana en las sinapsis o cuerpos de células neuronales como se determinó por inmunocitoquímica.

65 **[0069]** Los sueros policlonales típicamente contienen poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen a varios epítomos a lo largo de la longitud de la alfa-SN. Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos para un segmento particular de alfa-SN, como NAC. Los sueros policlonales que son específicos para un segmento particular contiene 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 epítipo específico dentro de alfa-SN que pueden ser un epítipo conformacional o no conformacional. Epítipos no conformacionales permanecen presentes cuando alfa-SN se desnaturaliza con SDS. La eficacia profiláctica y terapéutica de anticuerpos puede ensayarse usando los procedimientos de modelo animal transgénico descrito en los Ejemplos.

5 Algunos anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo dentro de NAC. En algunos métodos, se utilizan varios anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión a epítipos diferentes. Tales anticuerpos se pueden administrar secuencialmente o simultáneamente. Los anticuerpos para los componentes del cuerpo de Lewy distintos de alfa-SN también se pueden utilizar. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser dirigidos a los neurofilamentos, ubiquitina, o sinfilina. Los agentes terapéuticos también incluyen anticuerpos generados contra análogos de alfa-SN y fragmentos de los mismos. Algunos agentes terapéuticos de la invención son péptidos todo-D, *por ejemplo*, alfa-SN todo-D o NAC todo-D.

15 **[0070]** Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítipo dentro de restos especificados, tales como alfa-SN 1-5, por ejemplo, lo que se entiende 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 necesariamente contacta con cada residuo dentro de alfa-SN 1-5. Tampoco cada sustitución de aminoácido simple o delección con alfa-SN1-5 necesariamente afecta significativamente a la afinidad de unión. La especificidad de epítipo de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, formando una biblioteca de presentación en fagos en la que diferentes miembros presentan diferentes subsecuencias de alfa-SN. La biblioteca de presentación de fagos se selecciona a continuación para los miembros de unión específica a un anticuerpo bajo ensayo. Se aísla una familia de secuencias. Típicamente, una tal familia contiene una secuencia central común, y diversas longitudes de secuencias flanqueantes en los diferentes miembros. La secuencia central más corta que muestra unión específica al anticuerpo define el epítipo unido por el anticuerpo. Los anticuerpos también pueden ensayarse para determinar la especificidad de epítipo en un ensayo de competición con un anticuerpo cuya especificidad de epítipo ya se ha determinado.

30 **[0071]** Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de NAC. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de una forma glicosilada de 22 kilodalton de sinucleína, *por ejemplo*, P22-sinucleína (H. Shimura et al., Science 2001 Jul 13:293 (5528): 224-5).

35 **[0072]** Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en el N-terminal de alfa-SN (por ejemplo, un epítipo dentro de los aminoácidos 1-20 o los aminoácidos 1-10 de la sinucleína alfa numerada de acuerdo con SEQ ID NO: 1). Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en el que el residuo N-terminal del epítipo es el residuo N-terminal de alfa-SN de longitud completa. Dichos anticuerpos no se unen a los mutantes de delección de sinucleína alfa en la que falta el residuo 1. Algunos de estos anticuerpos no se unen a sinucleína alfa de longitud completa en la que se une el aminoácido N-terminal a un polipéptido heterólogo. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-69 o residuos 1-20 de la sinucleína alfa humana. Algunos anticuerpos específicamente se unen a un epítipo dentro de los residuos 1-20 de la sinucleína alfa humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo con un segmento de sinucleína alfa humana seleccionada de los restos 1 a N<sub>a</sub> de SEQ ID NO.: 1, donde N<sub>a</sub> es de 5 a 20; los residuos 2 a N<sub>b</sub> de la SEQ ID NO.: 1, donde N<sub>b</sub> es de 6 a 21; o residuos de 3- N<sub>c</sub> de la SEQ ID NO.: 1 donde N<sub>c</sub> es de 7 a 22. Algunos anticuerpos se unen a un epítipo dentro de un segmento de sinucleína alfa humana seleccionada 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.

45 **[0073]** Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en o cerca del extremo C-terminal 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 el que el residuo C-terminal del epítipo es el residuo C-terminal de alfa-SN (de longitud completa). Dichos anticuerpos no se unen a los mutantes de delección de sinucleína alfa en los que el residuo 140 no se encuentra. Algunos de estos anticuerpos no se unen a sinucleína alfa de longitud completa en la que se une el aminoácido C-terminal a un polipéptido heterólogo. En algunos procedimientos, el anticuerpo se une específicamente a NAC sin unirse a alfa-SN de longitud completa.

55 **[0074]** Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 o 83-140 de sinucleína alfa humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 120-140 de la sinucleína alfa humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo con un segmento de sinucleína alfa humana seleccionada de 83-101, 107-125, 110-128 y 124-140. Algunos anticuerpos se unen a un epítipo dentro de un segmento de sinucleína alfa humana seleccionada del grupo que consiste en SN124-140, SN12 5-140, SN126-140, SN127-140, SN128-140, SN 129-140, SN130-140, SN131- 140, SN132-140, SN133-140, SN134-140, SN135-140, SN136-140, SN137-140, SN124-139, SN12 5-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN124-139, SN12 5-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN 129-139, SN130-139, SN131-139, SN132-139, SN133-139, SN134-139, SN135-139, SN136-139, SN137 -139, SN124-138, SN124-138, SN12 5-138, SN126-138, SN127-138, SN128-138, SN 129-138, SN130-138, SN131-138, SN132-138, SN133-138, SN134- 138, SN135-138, SN136-138, SN124-137, SN12 5-137, SN126-137, SN127-137, SN128-137, SN 129-137, SN130-137, SN131-137, SN132-137, SN133-137, SN134-137, SN135-137, SN124-136, SN12 5-136, SN126-136, SN127-136, SN128-136, SN 129-136, SN130-136, SN131-136, SN132-136, SN133-136, y SN134-136.

**[0075]** Los anticuerpos monoclonales que se unen a epítomos C-terminales se unen preferiblemente con alta afinidad, por ejemplo, al menos  $10^8$ ,  $10^9$  o  $10^{10}M^{-1}$  a sinucleína alfa humana.

**[0076]** 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 una serie de ventajas con respecto a anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o sueros policlonales a alfa-SN intacta. En primer lugar, para dosificaciones de masa igual, las dosificaciones de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una dosis más alta molar de anticuerpos eficaces en la limpieza de placas de amiloide. En segundo lugar, los anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de eliminación contra LBs sin inducir una respuesta de eliminación contra alfa-SN intacta, reduciendo así el potencial de efectos secundarios.

**[0077]** Opcionalmente, los anticuerpos pueden ser examinados para la actividad profiláctica o terapéutica en animales transgénicos de enfermedad LB como se describió anteriormente. Opcionalmente, una colección de anticuerpos se preevalúa para unión relativa a sinucleína alfa humana desnaturalizada o un fragmento del mismo. Las afinidades de unión relativas se pueden estimar a partir de las intensidades relativas de la señal en un inmunotransferencia. Un anticuerpo que tiene afinidad de unión relativa por encima de la media, o preferiblemente, el anticuerpo que tiene la más alta afinidad de unión probada se selecciona para su posterior detección en animales transgénicos. Exploración previa similar se puede realizar para examinar los anticuerpos por la unión a los agregados de sinucleína alfa en secciones de tejidos por inmunocitoquímica. Las secciones de tejido se pueden obtener desde el cerebro de un paciente enfermo o un modelo de animal transgénico.

**[0078]** En una realización el anticuerpo designado 8A5 se usa para la inmunización pasiva. La descripción también proporciona el anticuerpo designado 6H7, o un anticuerpo que compite con 6H7 para la unión a sinucleína alfa, que puede utilizarse para la inmunización pasiva específica. En algunas realizaciones 6H7 y 8A5 se utilizan en combinación entre sí o con otros anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína.

i. Inmunización para iniciar una respuesta inmune contra epítomos en ambos extremos de la sinucleína alfa

**[0079]** Como se describe aquí, la administración de anticuerpos que reconocen epítomos en el terminal amino y regiones terminales carboxi de agregados de sinucleína alfa de sinucleína alfa reducida (*es decir*, 8A5 y 6H7) en el cerebro de ratones transgénicos que sobreexpresan la sinucleína alfa humana (véase, por ejemplo, el Ejemplo IX). Basado en parte en este descubrimiento, se contempla que la administración en combinación de anticuerpos que reconocen epítomo C-terminal (*por ejemplo*, como se describe anteriormente) y los anticuerpos que reconocen un epítomo C-terminal (*por ejemplo*, como se describe anteriormente) será particularmente eficaz en la profilaxis y la terapia. Por lo tanto, se describe un método para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de sinucleína alfa en el cerebro mediante la administración en combinación para un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad un régimen eficaz de un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítomo dentro de los residuos 1-20 de la sinucleína alfa humana, los residuos se numeran de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y la administración de un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítomo dentro de los residuos 70-140 de la sinucleína alfa humana. Preferiblemente, el primer anticuerpo se une a un epítomo de sinucleína alfa dentro de la secuencia de los residuos 1 a  $N_a$  de SEQ ID NO.: 1, donde  $N_a$  es de 5 a 20; dentro de la secuencia de los residuos 2 a  $N_b$  de la SEQ ID NO.: 1, donde  $N_b$  es de 6 a 21; y/o dentro de la secuencia de residuos de 3 a  $N_c$  de la SEQ ID NO.: 1, y  $N_c$  es de 7 a 22. Preferentemente, el segundo anticuerpo se une específicamente a un epítomo dentro de los residuos 120-140 de sinucleína alfa humana. El primer y segundo anticuerpo se pueden administrar simultáneamente (*por ejemplo*, coformulados), el mismo día, el mismo mes y/o como parte del mismo curso de la terapia.

ii. Composiciones y Kits

**[0080]** Las composiciones se describen para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación alfa-sinucleína en el cerebro que comprende uno o más anticuerpos que se unen a una región terminal de la sinucleína alfa, *por ejemplo*, que tiene una especificidad descrita anteriormente. Las composiciones incluyen formas de dosificación y formulaciones que contienen dos o más anticuerpos. Las formulaciones ejemplares (*aptas para anticuerpos de co-formulación*) son conocidas en la técnica e incluyen las descritas más adelante en la Sección VII ("Regímenes de Tratamiento").

**[0081]** La divulgación también proporciona kits para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de sinucleína alfa en el cerebro. Los kits incluyen dos (o más) anticuerpos que un primer anticuerpo se une a un epítomo en el extremo N-terminal de la sinucleína alfa humana y el segundo anticuerpo se une a un epítomo en el extremo C-terminal de la sinucleína alfa humana. Los anticuerpos se pueden combinar en una sola preparación o kit para uso simultáneo. Alternativamente, los anticuerpos pueden ocupar contenedores separados (*por ejemplo*, viales, jeringas, tubos, o similares) en un kit para uso simultáneo, secuencial o separado. Estos anticuerpos opcionalmente se pueden administrar en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de la enfermedad de Lewy Body. Los kits también pueden incluir agentes que aumentan el paso de los anticuerpos de la invención a través de la barrera sangre-cerebro, otros

adyuvantes y materiales para la administración al paciente.

### iii. Características generales de las inmunoglobulinas

5 **[0082]** La unidad estructural básica del anticuerpo es conocida por comprender un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora.

10 **[0083]** Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. (Véase *en general*, Fundamental Immunology, Paul, W., ed., 2ª ed., Raven Press, Nueva York, 1989, Ch. 7.

15 **[0084]** Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Todas las cadenas muestran la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, permitiendo la unión a un epítipo específico. De N-terminal a C-terminal, cadenas tanto ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, 1987 y 1991); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); o Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989).

### 20 Iv. Producción de anticuerpos no humanos

30 **[0085]** Los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen la misma o similar especificidad de unión y afinidad como un ratón u otro anticuerpo no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena tanto ligeros como pesados se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos (C), tales como IgG1 e IgG4. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana. Los anticuerpos IgM se pueden usar también en algunos métodos. Un anticuerpo quimérico típico es por lo tanto una proteína híbrida que consiste en dominio de unión a V o antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio C o efector de un anticuerpo humano.

35 **[0086]** Los anticuerpos humanizados tienen residuos de marco de región variable sustancialmente de un anticuerpo humano (denominado un anticuerpo aceptor) y regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de un ratón de anticuerpo, (referido como la inmunoglobulina donante). Véase, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 10029-10033 (1989), WO 90/07861, US 5.693.762, US 5.693.761, US 5.585.089, US 5.530.101, y Winter, US 5.225.539. La región constante, si está presente, también es sustancial o completamente una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos suelen ser elegidos a partir de anticuerpos humanos cuyas secuencias de marco presentan un alto grado de identidad de secuencia con los dominios de región variable de murina a partir de los cuales se derivaron las CDR. Los residuos de marco de región variable de cadena pesada y ligera pueden derivar de las mismas o diferentes secuencias de anticuerpo humano. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos naturales o pueden ser secuencias de consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Carter et al., WO 92/22653. Ciertos aminoácidos de los restos de marco de región variable humana se seleccionan para la sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de CDR y/o la unión a antígeno. La investigación de tales influencias posibles es por modelado, examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

40 **[0087]** Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto de marco de región variable murina y un residuo de marco de región variable humana seleccionada, el aminoácido del marco humano debería normalmente sustituirse por el valente de aminoácidos del marco valente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- 45 (1) se une de forma no covalente al antígeno directamente,  
 50 (2) es adyacente a una región CDR,  
 55 (3) interacciona de otra manera con una región CDR (por ejemplo, dentro de aproximadamente 6 Å de una región CDR), o

(4) participa en la interfaz VL-VH.

**[0088]** Otros candidatos para la sustitución son aceptores humanos aminoácidos de marco que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donante de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos de marco humanos aceptores que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Los marcos de región variable de inmunoglobulinas humanizadas habitualmente muestran al menos 85% de identidad de secuencia con una secuencia de marco de región variable humana o consenso de dichas secuencias.

**[0089]** Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de regiones determinantes (CDRs) de complementariedad derivadas de anticuerpo monoclonal de ratón mAb 6H7 o anticuerpo monoclonal de ratón mAb 8A5. La línea celular designada JH17.6H7.1.54.28 que produce el anticuerpo 6117 tiene el número de acceso ATCC PTA-6010 habiéndose depositado bajo las disposiciones del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA 20108) el 4 de agosto 2005. La línea celular designada JH4.8A5.25.7.36 que produce el anticuerpo 8A5 tiene el número de acceso PTA-6909 ATCC habiéndose depositado en agosto 4,2005.

**[0090]** Como se señaló anteriormente, un número de métodos son conocidos para la producción de anticuerpos quiméricos y humanizados utilizando una línea de células que expresan anticuerpos (por ejemplo, hibridoma). Por ejemplo, las regiones variables de inmunoglobulina de anticuerpos de ratón 8A5 y/o 6H7 pueden ser clonados y secuenciados usando métodos bien conocidos. En un método, para la ilustración y no limitación, la región variable VH de cadena pesada se clona por RT-PCR usando ARNm preparado a partir de células de hibridoma. Cebadores de consenso se emplean para péptido líder de la región VH que abarca el codón de iniciación de la traducción como el cebador 5' y cebador 3' g2b constante específico a regiones. Cebadores ejemplares se describen en la publicación de patente estadounidense US 2005/0009150 por Schenk et al. (en adelante, "Schenk"). Las secuencias de clones múltiples, independientemente derivados, se pueden comparar para asegurar que cambios no se introducen durante la amplificación. La secuencia de la región VH también puede determinarse o confirmarse por secuenciación de un fragmento de VH obtenido por metodología 5' RACE RT-PCR y el cebador específico 3' g2b.

**[0091]** La región variable de cadena ligera VL de 8A5 o 6H73 D6 se puede clonar de una manera análoga como la región VH. En un enfoque, un conjunto de cebadores de consenso diseñados para la amplificación de regiones VL murinas está diseñado para hibridar con la región VL que abarca el codón de iniciación de la traducción, y un cebador 3' específico para la región Ck murina aguas abajo de la región de unión VJ. En un segundo enfoque, se emplea la metodología 5' RACE RT-PCR para clonar ADNc de codificación VL. Cebadores ejemplares se describen en Schenk. Las secuencias clonadas se combinan a continuación con secuencias que codifican las regiones constantes humanas.

**[0092]** En un enfoque, las regiones variables de cadena pesada y ligera están rediseñados para codificar secuencias donadoras de empalme aguas abajo de las respectivas uniones VDJ o VJ, y se clonaron en el vector de expresión de mamífero, tal como pCMV-hyl para la cadena pesada, y pCMV-HID para la cadena ligera. Estos vectores codifican regiones constantes I<sub>L</sub> y C<sub>k</sub> humanas como fragmentos exónicos aguas abajo del casete de región variable insertado. Después de la verificación de secuencia, los vectores de expresión de cadena pesada y de cadena ligera pueden co-transfectarse en células COS para producir anticuerpos quiméricos. El medio acondicionado se recoge 48 horas después de la transfección y se ensayó por análisis de transferencia western para la producción de anticuerpo o ELISA para la unión al antígeno. Los anticuerpos quiméricos se humanizan como se describió anteriormente.

v. Los anticuerpos humanos

**[0093]** Los anticuerpos humanos contra alfa-SN son proporcionados por una variedad de técnicas descritas a continuación. Algunos anticuerpos humanos son seleccionados por experimentos de unión competitiva, o de otra manera, para tener la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular, tal como uno de los anticuerpos monoclonales de ratón descritos en el Ejemplo XI. Los anticuerpos humanos también se pueden cribar para una especificidad de epítipo particular mediante el uso de sólo un fragmento de alfa-SN como el inmunógeno, y/o mediante el cribado de anticuerpos contra una colección de mutantes de delección de alfa-SN. Los anticuerpos humanos tienen preferiblemente IgG1 humana de especificidad de isotipo.

(1) Metodología del trioma

**[0094]** El enfoque básico y una pareja de fusión celular ejemplar, SPAZ-4, para uso en este método han sido descritos por Oestberg et al., Hybridoma 2: 361-367 (1983); Oestberg, Patente de EE.UU. N° 4.634.664; y Engleman et al., Patente de EE.UU. 4.634.666. Las líneas celulares productoras de anticuerpos obtenidas mediante este procedimiento se denominan triomas, debido a que descienden de tres células: dos humanas y una de ratón. Inicialmente, una línea de mieloma de ratón se fusiona con un linfocito B humano para obtener una célula híbrida xenogénica no productora de anticuerpos, tales como la línea celular SPAZ-4 descrita por Oestberg, supra. La célula xenogénica se fusiona entonces con un linfocito B humano inmunizado para obtener una línea celular de trioma

productora de anticuerpos. Se ha encontrado que triomas producen anticuerpos de forma más estable que los hibricúpulas ordinarios hechos de células humanas.

**[0095]** Los linfocitos B inmunizados se obtienen de la sangre, el bazo, los ganglios linfáticos o médula ósea de un donante humano. Si se desean anticuerpos frente a un antígeno o epítipo específico, es preferible usar ese antígeno o epítipo del mismo para la inmunización. La inmunización puede ser o bien *in vivo* o *in vitro*. Para la inmunización *in vivo*, las células B se aíslan típicamente a partir de un humano inmunizado con alfa-SN, un fragmento del mismo, polipéptido mayor que contiene alfa-SN o fragmento, o un anticuerpo anti-idiotípico a un anticuerpo a alfa-SN. En algunos procedimientos, las células B se aíslan del mismo paciente al que últimamente se administra terapia de anticuerpos. Para la inmunización *in vitro*, los linfocitos B están típicamente expuestos a antígeno durante un periodo de 7-14 días en un medio tal como RPMI-1640 (véase Engleman, *supra*) suplementado con plasma humano al 10%.

**[0096]** Los B-linfocitos inmunizados se fusionan a una célula híbrida xenogénica tal como SPAZ-4 por métodos bien conocidos. Por ejemplo, las células se tratan con polietilenglicol 40-50% de MW 1000-4000, en aproximadamente 37°C, durante aproximadamente 5-10 min. Las células se separan de la mezcla de fusión y se propagan en medio selectivo para los híbridos deseados (*por ejemplo*, HAT o AH). Los clones que secretan anticuerpos que tienen la especificidad de unión requerida son identificados mediante el ensayo del medio de cultivo del trioma para la capacidad de unirse a la alfa-SN o un fragmento del mismo. Los triomas que producen anticuerpos humanos que tienen la especificidad deseada se subclonan por la técnica de dilución limitante y se cultivan *in vitro* en medio de cultivo. Las líneas de células de trioma obtenidas se ensayaron para determinar la capacidad de unir alfa-SN o un fragmento del mismo.

**[0097]** Aunque triomas son genéticamente estables no producen anticuerpos en niveles muy altos. Los niveles de expresión pueden aumentarse clonando genes de anticuerpos del trioma en uno o más vectores de expresión, y transformando el vector en mamíferos estándar, las líneas celulares bacterianas o de levadura.

(2) Mamíferos no humanos transgénicos

**[0098]** Los anticuerpos humanos contra alfa-SN también se pueden producir a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de inmunoglobulina humana. Por lo general, el locus de inmunoglobulina endógena de dichos mamíferos transgénicos está funcionalmente inactivado. Preferiblemente, el segmento del locus de inmunoglobulina humana incluye secuencias no reorganizadas de componentes de la cadena pesada y ligera. Tanto la inactivación de genes de inmunoglobulina endógena como la introducción de genes de inmunoglobulina exógenas puede lograrse por recombinación homóloga dirigida, o por introducción de cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos resultantes de este proceso son capaces de reorganizar funcionalmente las secuencias componentes de inmunoglobulina, y expresar un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humana, sin expresar los genes de inmunoglobulina endógenos. La producción y propiedades de los mamíferos que tienen estas propiedades se describen en detalle por, *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. Ratones transgénicos son particularmente adecuados. Los anticuerpos anti-alfa-SN se obtienen mediante la inmunización de mamíferos no humanos transgénicos, tal como se describe por Lonberg o Kucherlapati, *supra*, con alfa-SN o un fragmento del mismo. Los anticuerpos monoclonales se preparan mediante, *por ejemplo*, la fusión de células B de dichos mamíferos a líneas celulares de mieloma adecuadas utilizando tecnología Kohler- Milstein convencional. Anticuerpos policlonales humanos también se pueden proporcionar en la forma de suero de seres humanos inmunizados con un agente inmunógeno. Opcionalmente, tales anticuerpos policlonales se pueden concentrar mediante purificación por afinidad usando alfa-SN u otro péptido amiloide como un reactivo de afinidad.

(3) Métodos de presentación de fagos

**[0099]** Un enfoque adicional para obtener anticuerpos anti-alfa-SN humanos consiste en cribar una biblioteca de ADN de células B humanas según el protocolo general esbozado por Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989). Como se ha descrito para la metodología de trioma, tales células B se pueden obtener a partir de un 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 a partir de un paciente que en última instancia ha de recibir el tratamiento con anticuerpos. Se seleccionan anticuerpos que se unen a alfa-SN o un fragmento del mismo. Las secuencias que codifican tales anticuerpos (o fragmentos de unión) se clonan a continuación y se amplifican. El protocolo descrito por Huse se hace más eficiente en combinación con tecnología de presentación de fagos. Véase, *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 bibliotecas de fago en las que los miembros presentan diferentes anticuerpos en sus superficies exteriores. Los anticuerpos generalmente se muestran como fragmentos Fv o Fab. Fagos que presentan anticuerpos con una especificidad deseada se seleccionan mediante enriquecimiento por afinidad a un péptido alfa-SN o fragmento del mismo.

[0100] En una variación del método de presentación de fagos, pueden producirse anticuerpos humanos que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado. Véase Winter, el documento WO 92/20791. En este método, ya sea la región variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo murino seleccionado se usa como un material de partida. Si, por ejemplo, una región variable de cadena ligera se selecciona como el material de partida, una biblioteca de fagos se construye en la que elementos representan la misma región de variable de cadena ligera (es decir, el material de partida murino) y una cadena pesada de la región variable diferente. Las regiones variables de cadena pesada se obtienen a partir de una biblioteca de regiones variables de cadena pesada humanas reordenadas. Se selecciona un fago que muestra una fuerte unión de alfa-SN específica (por ejemplo, al menos  $10^8$  y preferiblemente al menos  $10^9 M^{-1}$ ). La cadena pesada de la región variable humana de este fago sirve a continuación como material de partida para la construcción de una biblioteca de fagos adicional. En esta biblioteca, cada fago muestra la misma región variable de cadena pesada (es decir, la región identificada a partir de la primera biblioteca de presentación) y una región variable de cadena ligera diferente. Las regiones variables de cadena ligera se obtienen a partir de una biblioteca de regiones de cadena ligera variable humanas reordenadas. Una vez más, se selecciona el fago que muestra una fuerte unión de alfa-SN específica. Estos fagos muestran las regiones variables de los anticuerpos anti-alfa-SN completamente humanos. Estos anticuerpos por lo general tienen la misma o similar especificidad de epítipo que el material de partida murino.

#### VI. Selección de la región constante

[0101] Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos pueden estar enlazadas para al menos una porción de una región constante humana. La elección de región constante depende, en parte, de si se desea complemento dependiente de anticuerpo y/o toxicidad mediada por células. Por ejemplo, los isótopos IgG1 e IgG3 tienen actividad del complemento e isotipos IgG2 e IgG4 no lo tienen. La elección de isotipo también puede afectar el paso del anticuerpo en el cerebro. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab' F(ab')<sub>2</sub>, y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla en los que los dominios variables de cadena pesada y ligera están vinculados a través de un espaciador.

#### vii. Expresión de anticuerpos recombinantes

[0102] Anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos se producen típicamente mediante la expresión recombinante. Construcciones de polinucleótidos recombinantes incluyen típicamente una secuencia de control de la expresión unida operativamente a las secuencias codificantes de cadenas de anticuerpo, incluyendo regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas. Preferiblemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

[0103] Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección, por ejemplo, resistencia a ampicilina o resistencia a higromicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

[0104] *E. coli* es un huésped procarionta particularmente útil para clonar las secuencias de ADN de la presente descripción. Los microbios, tales como levaduras también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de deshidrogenasa de alcohol, isocitocromo C, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

[0105] Las células de mamífero son un huésped preferido para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos. Ver Winnacker, desde los genes a Clones, (VCH Publishers, Nueva York, 1987). Un número de líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas se han desarrollado en la técnica, e incluyen líneas de células CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, células L, células de riñón embrionario humano, y líneas celulares de mieloma. Preferiblemente, las células son no humanas. Vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, y similares. Véase Co et al., J. Immunol. 148: 1149 (1992).

[0106] Alternativamente, las secuencias codificantes de anticuerpos pueden incorporarse en transgenes para la

introducción en el genoma de un animal transgénico y la expresión posterior en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, US 5.741.957, US 5.304.489, US 5.849.992). Transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas en unión operativa con un promotor y potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, tal como caseína o lactoglobulina beta.

**[0107]** Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés se pueden transferir en la célula huésped por procedimientos bien conocidos, dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus puede utilizarse para otros huéspedes celulares. Otros métodos utilizados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación, y microinyección (véase en general, Sambrook *et al.*, supra). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden microinyectarse en ovocitos fertilizados, o pueden incorporarse en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de dichas células transferidas a oocitos enucleados.

**[0108]** Una vez expresados, los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo purificación HPLC, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase generalmente, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

### III. EXPLORACIÓN ANTICUERPOS PARA LA ACTIVIDAD DE LIQUIDACIÓN

**[0109]** La descripción proporciona procedimientos de cribado de un anticuerpo para la actividad en la limpieza de un cuerpo de Lewy o cualquier otro antígeno, o entidad biológica asociada, para la que se desea la actividad de compensación. Para explorar la actividad contra un cuerpo de Lewy, una muestra de tejido de un cerebro de un paciente con Enfermedad de Parkinson o un modelo animal que tiene la patología característica de Parkinson se pone en contacto con células fagocíticas que lleva un receptor 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 procedimientos, los componentes se combinan en un portaobjetos de microscopio para facilitar el control microscópico. En algunos métodos, múltiples reacciones se realizan en paralelo en los pocillos de una placa de microtitulación. En un formato de este tipo, un portaobjetos de microscopio en miniatura separado se puede montar en los pocillos separados, o un formato de detección no microscópica, tal como detección ELISA de alfa-SN se puede utilizar. Preferiblemente, una serie de mediciones se hace de la cantidad de cuerpos de Lewy en la mezcla de reacción *in vitro*, partiendo de un valor basal antes de que la reacción haya procedido, y uno o más valores de ensayo durante la reacción. El antígeno puede detectarse por tinción, por ejemplo, con un anticuerpo marcado con fluorescencia a alfa-SN u otros componentes de LBs. El anticuerpo usado para la tinción puede ser o no ser el mismo que el anticuerpo que se está examinando para la actividad de liquidación. Una reducción relativa a la línea basal durante la reacción de los LBs indica que el anticuerpo bajo ensayo tiene actividad de liquidación. Tales anticuerpos son probablemente útiles en la prevención o el tratamiento de EP y otras LBD.

**[0110]** Métodos análogos se pueden utilizar para detectar anticuerpos para la actividad en la liquidación de otros tipos de entidades biológicas. El ensayo se puede usar para detectar la actividad de liquidación contra prácticamente cualquier tipo de entidad biológica. Típicamente, la entidad biológica tiene alguna función en la enfermedad humana o animal. La entidad biológica puede proporcionarse como una muestra de tejido o en forma aislada. Si se proporciona como una muestra de tejido, la muestra de tejido es preferiblemente no fijada para permitir el fácil acceso a los componentes de la muestra de tejido y para evitar perturbar la conformación de los componentes relacionados con la fijación. Los ejemplos de muestras de tejido que pueden examinarse en este ensayo incluyen tejido canceroso, tejido precanceroso, tejido que contiene crecimientos benignos tales como verrugas o lunares, tejido infectado con microorganismos patógenos, tejido infiltrado con células inflamatorias, tejido que lleva matrices patológicas entre células (por ejemplo, pericarditis fibrinosa), tejido teniendo antígenos aberrantes, y tejido cicatrizal. Los ejemplos de entidades biológicas aisladas que pueden usarse incluyen alfa-SN, antígenos virales o virus, proteoglicanos, antígenos de otros microorganismos patógenos, antígenos tumorales, y moléculas de adhesión. Dichos antígenos pueden obtenerse de fuentes naturales, expresión recombinante o síntesis química, entre otros medios. La muestra de tejido o entidad biológica aislada se pone en contacto con células fagocíticas que llevan receptores Fc, tales como monocitos o células microgliales, y un anticuerpo a ensayar en un medio. El anticuerpo puede estar dirigido a la entidad biológica bajo ensayo o a un antígeno asociado con la entidad. En la última situación, el objeto consiste en examinar si la entidad biológica se fagocita indirectamente con el antígeno. Por lo general, aunque no necesariamente, el anticuerpo y la entidad biológica (a veces con un antígeno asociado) se ponen en contacto entre sí antes de añadir las células fagocíticas. La concentración de la entidad biológica y/o el antígeno asociado, si está presente, que queda en el medio se controla a continuación. Una reducción en la cantidad o concentración de antígeno o la entidad biológica asociada en el medio indica que el anticuerpo tiene una respuesta de eliminación contra el antígeno y/o entidad biológica asociada junto con las células fagocíticas.

**[0111]** Los anticuerpos u otros agentes también pueden ser examinados para la actividad en la limpieza de cuerpos de Lewy utilizando el ensayo *in vitro* descrito en el Ejemplo II. Las células neuronales transfectadas con un vector de expresión que expresa sinucleína forman inclusiones de sinucleína que se pueden visualizar microscópicamente. La

actividad de un anticuerpo u otro agente en la limpieza de tales inclusiones se puede determinar comparando la apariencia o el nivel de sinucleína en células transfectadas tratadas con el agente con la apariencia o el nivel de sinucleína en células de control no tratadas con el agente. Una reducción en el tamaño o la intensidad de las inclusiones de sinucleína o una reducción en el nivel de la actividad de señales sinucleína en la limpieza de

5 sinucleína. La actividad se puede controlar ya sea mediante la visualización de inclusiones de sinucleína microscópicamente o mediante la ejecución de extractos de células en un gel y la visualización de una banda de sinucleína. Como se ha indicado en el ejemplo 1, sección 2, el cambio en el nivel de sinucleína es más marcado si los extractos se fraccionaron en fracciones citosólicas y de membrana, y se analiza la fracción de membrana.

10 **[0112]** Los anticuerpos u otros agentes también pueden ser examinados para la actividad en la limpieza de cuerpos de Lewy utilizando el ensayo *in vivo* descrito en el Ejemplo IX. Brevemente, un anticuerpo de prueba se inyecta en la neocorteza de ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína humana y tienen agregados de  $\alpha$ -sinucleína intraneuronales. En un enfoque, los animales utilizados son ratones transgénicos heterocigotos de 4 a 8 meses de edad, que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína humana de tipo salvaje en el cerebro bajo el control transcripcional del

15 promotor PDGF (véase Maliah, 2000, Science 287: 12 65-1269). El anticuerpo y los controles de prueba (*por ejemplo*, anticuerpos de control irrelevantes, emparejados con isotipo) se disuelven en una solución adecuada (*por ejemplo*, solución salina tamponada con fosfato estéril) para la inyección en ratones. Para cada ratón, 2  $\mu$ l de una solución de anticuerpo 2 mg/ml se inyecta estereotácticamente bajo anestesia en las capas profundas de la corteza cerebral parietal del hemisferio cerebral derecho (lado ipsilateral). Los hemisferios izquierdos (lado contralateral) sirven como un control de línea de base para cada ratón. Los sitios de inyección se suturan y se monitorean los ratones hasta recuperarse de la anestesia. Dos semanas después de la inyección, los ratones se sacrificaron, los cerebros se removieron y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 48 h, y se cortaron coronalmente a un espesor de 40  $\mu$ m. Secciones de todo el sitio de la inyección se tiñeron con un anticuerpo  $\alpha$ -sinucleína (*por ejemplo*, ELADW-47, reconociendo anticuerpo  $\alpha$ -sinucleína 115-122). Para cada sección, agregados de  $\alpha$ -sinucleína intraneuronales se cuentan en 4 campos microscópicos (20x objetivo) alrededor del sitio de inyección en el hemisferio ipsilateral, y en 4 campos correspondientes en el hemisferio contralateral de control. Para cada animal los recuentos de agregado de  $\alpha$ -sinucleína para dos secciones se añaden y la diferencia entre el recuento total de agregado  $\alpha$ -sinucleína entre los dos hemisferios es para determinar el efecto del anticuerpo de prueba en el aclaramiento total para cada ratón individual. Una reducción en recuento agregado total de  $\alpha$ -sinucleína en el hemisferio tratado es indicativa de que los anticuerpos u otro agente tiene actividad en la liquidación de cuerpos de Lewy. Preferiblemente, se observó 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%.

#### 35 IV. PACIENTES SUSCEPTIBLES A LOS REGÍMENES DE TRATAMIENTO COMPONENTE ANTI-CUERPOS DE LEWY

**[0113]** Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de una enfermedad sinucleinopática pero que no muestran síntomas, así como pacientes que muestran actualmente síntomas. Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de la enfermedad de un LBD pero que no muestran síntomas, así como pacientes que muestran síntomas actualmente. Tales enfermedades incluyen la Enfermedad de Parkinson (incluyendo la Enfermedad de Parkinson idiopática), DLB, EDCL, LBVAD, fallo autonómico puro, disfgia de cuerpo de Lewy, LBD incidental, LBD heredada (por ejemplo, mutaciones del gen de alfa-SN, PARK3 y PARK4) y atrofia de múltiples sistemas (por ejemplo, la atrofia de olivopontocerebelosa, la degeneración estriatonigral y síndrome de Shy-Drager). Por lo tanto, los presentes procedimientos pueden administrarse profilácticamente a individuos que tienen un riesgo genético conocido de un LBD. Tales individuos incluyen los que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia EP incluyen mutaciones en los genes de sinucleína o Parkin, UCHLI, y CYP2D6; particularmente mutaciones en la posición 53 del gen de la sinucleína. Las personas que actualmente padecen la Enfermedad de Parkinson pueden ser reconocidas a partir de sus manifestaciones clínicas, incluyendo temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural.

**[0114]** En algunos métodos, el paciente es libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de cualquier enfermedad amiloidogénica y sufre de al menos una enfermedad sinucleinopática. En algunos métodos, el paciente es libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de cualquier enfermedad caracterizada por depósitos amiloides extracelulares. En algunos métodos, el paciente es libre de enfermedades caracterizadas por depósitos amiloides de péptido A $\beta$ . En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo, leve deterioro cognitivo y síndrome de Down. En algunos métodos, el paciente tiene la enfermedad de Alzheimer concurrente y una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el paciente tiene la enfermedad de Alzheimer concurrente y una acumulación de sinucleína enfermedad caracterizada. En algunos métodos, el paciente tiene enfermedad concurrente de Alzheimer y Parkinson.

**[0115]** En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (*por ejemplo*, 10, 20, o 30). Por lo general, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcance 40, 50, 60, o 70. El tratamiento típicamente implica múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. El tratamiento puede

monitorizarse mediante el ensayo de anticuerpo, o activa las respuestas de células B de células T o al agente terapéutico (*por ejemplo*, péptido alfa-SN o A $\beta$ , o ambos) con el tiempo. Si la respuesta cae, se indica una dosis de refuerzo.

- 5 [0116] Opcionalmente, la presencia de la ausencia de síntomas, signos o factores de riesgo de una enfermedad se determina antes de comenzar el tratamiento.

#### V. REGÍMENES DE TRATAMIENTO

10 [0117] 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, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible a, o de otra manera en riesgo de un LBD o **otra enfermedad sinucleinopática** en régimen que comprende una cantidad y frecuencia de la administración de la composición o medicamento suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicamentos se administran a un paciente que se sospecha de, o que ya sufre de una enfermedad como en un régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición suficiente para curar, o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad (fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, en algunos métodos el tratamiento efectúa al menos parcial liquidación de cuerpos de Lewy, al menos desagregación parcial de cuerpos de Lewy y/o reduce los niveles de oligómeros de sinucleína alfa en las sinapsis. Una cantidad adecuada para conseguir el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Una combinación de cantidad y la frecuencia de dosificación adecuada para conseguir el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como un régimen terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Tanto en regímenes láctico como terapéuticos, los agentes se administran por lo general en varias dosificaciones hasta que se consiga una respuesta inmune suficiente. Típicamente, la respuesta inmune se controla y dosis repetidas se administran si la respuesta inmune empieza a disminuir.

30 [0118] En algunos métodos, la administración de un agente resulta en la reducción de los niveles intracelulares de sinucleína agregada. En algunos métodos, la administración de un agente resulta en la mejora de un síntoma clínico de un LBD, tales como la función motora en el caso de la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la reducción en los niveles intracelulares de sinucleína agregada o mejora en un síntoma clínico de la enfermedad se controla a intervalos después de la administración de un agente.

40 [0119] Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las condiciones descritas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, de sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un humano pero mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos también pueden ser tratados. Las dosificaciones de tratamiento necesitan titularse para optimizar la seguridad y la eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si el adyuvante también se administra, con dosis más altas que se requieren en la ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunógeno para su administración en ocasiones varía de 1-500  $\mu\text{g}$  por paciente y más habitualmente de 5-500  $\mu\text{g}$  por inyección para la administración humana. En ocasiones, se utiliza una dosis mayor de 1-2 mg por inyección. Típicamente aproximadamente 10, 20, 50 o 100  $\mu\text{g}$  se utiliza para cada inyección humana. La masa de inmunógeno también depende de la relación de masa del epítipo inmunogénico en el inmunógeno para la masa de inmunógeno como un todo. Típicamente,  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  micromoles de epítipo inmunogénico se utilizan para microgramos de inmunógeno. El horario de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, a una vez al año, a una vez cada década. En cualquier día dado que se da una dosificación de inmunógeno, la dosificación es mayor que 1  $\mu\text{g}$ /paciente y habitualmente mayor que 10  $\mu\text{g}$ /paciente si adyuvante también se administra, y mayor que 10  $\mu\text{g}$ /paciente y habitualmente mayor que 100  $\mu\text{g}$ /paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consta de una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo a intervalos de tiempo, tales como intervalos de 6 semanas. Otro régimen consta de una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen supone una inyección cada dos meses de por vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser de forma irregular tal como se indica mediante la monitorización de la respuesta inmune.

60 [0120] Para la inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg o, en otras palabras, 70 mgs o 700 mgs o dentro del intervalo de 70-700 mg, respectivamente, para un paciente de 70 kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos procedimientos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los rangos indicados. El anticuerpo se administra habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también

pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo a alfa-SN en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 ug/ml y en algunos métodos de 25 - 300 ug/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere menos administración frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguido por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos a veces se requiere hasta la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de ello, se puede administrar un régimen profiláctico al paciente.

**[0121]** Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican inmunógenos oscilan desde aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10-100, o más, viriones por dosis.

**[0122]** Los agentes para inducir una respuesta inmunitaria pueden administrarse por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutáneos, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal o medios intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La ruta más típica de administración de un agente inmunogénico es subcutánea aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza más típicamente en los músculos de la pierna o el brazo. En algunos procedimientos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo inyección intracraneal. La inyección intramuscular o infusión intravenosa se prefieren para la administración del anticuerpo. En algunos procedimientos, en particular anticuerpos terapéuticos se inyectan directamente en el cráneo. En algunos procedimientos, los anticuerpos se administran como una composición de liberación sostenida o dispositivo, tal como un dispositivo Medipad™.

**[0123]** Como se ha señalado anteriormente, los agentes que inducen una respuesta inmunogénica contra alfa-SN y Aβ respectivamente se pueden administrar en combinación. Los agentes se pueden combinar en una sola preparación o kit para uso simultáneo, secuencial o separado. Los agentes pueden ocupar viales separados en la preparación o kit o pueden combinarse en un único vial. Estos agentes de la invención opcionalmente pueden administrarse en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de LBD. En el caso de síndrome de la enfermedad de Down y de Parkinson, en el que LBs se producen en el cerebro, los agentes de la invención también se pueden administrar en combinación con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera sangre-cerebro.

**[0124]** Los agentes de la invención se administran a menudo como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase, *Pharmaceutical Science* de Remington (15a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). Por lo tanto, cualquier agente (por ejemplo, fragmento de sinucleína alfa o anticuerpo se une específicamente a sinucleína alfa) se puede utilizar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad sinucleinopática. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y solicitud terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores no tóxicos farmacéuticamente aceptables o diluyentes, que se definen como vehículos comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para la administración animal o humana. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación también puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizadores no terapéuticos, no inmunogénicos no tóxicos y similares.

**[0125]** Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como sefarsa funcionalizada con látex (TM), agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos ácidos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores (es decir, adyuvantes).

**[0126]** Para la administración parenteral, los agentes de la invención se pueden administrar como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como aceites en agua, solución salina, glicerol, o etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes del pH y similares pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos se pueden administrar en la forma

de una inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de una manera tal que permita una liberación sostenida del ingrediente activo. Una composición ejemplar comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso que consiste en 50 mM de L-histidina, 150 mM NaCl, ajustado a pH 6,0 con HCl. Las composiciones para administración parenteral son típicamente sustancialmente estériles, sustancialmente isotónicas y fabricadas bajo condiciones GMP de la FDA o cuerpo similar. Por ejemplo, composiciones que contienen productos biológicos normalmente se esterilizan mediante esterilización por filtración. Las composiciones se pueden formular para administración de dosis única.

**[0127]** Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección también se pueden preparar. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida, o copolímero para el efecto adyuvante mejorado, como se discutió anteriormente (véase Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997)). Los agentes de esta invención se pueden administrar en forma de una preparación de inyección de depósito o implante que se puede formular de una manera tal que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Las composiciones pueden ser formuladas en forma de dosificación unitaria (es decir, la formulación contiene ingrediente activo suficiente para una dosificación a un paciente).

**[0128]** Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen la vía oral, intranasal, y formulaciones pulmonares, supositorios, y aplicaciones transdérmicas.

**[0129]** Para supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 10%, preferiblemente 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10%-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25%-70%.

**[0130]** La aplicación tópica puede resultar en la liberación transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse mediante coadministración del agente con toxina del cólera o derivados o subunidades desintoxicadas de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (Véase Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1998)). La co-administración se puede lograr mediante el uso de los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas por reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

**[0131]** Alternativamente, la administración transdérmica puede lograrse usando una ruta de la piel o usando transferosomas (Paul et al., *Eur J. Immunol* 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., *Biochem Biophys Acta* 13 68, 201-15 (1998)).

## VI. MÉTODOS DE VIGILANCIA Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

**[0132]** La descripción proporciona métodos para detectar una respuesta inmune contra el péptido alfa-SN y/o péptido A $\beta$  en un paciente que sufre de o es susceptible a un LBD. Los métodos son particularmente útiles para el seguimiento de un curso de tratamiento que se administra a un paciente. Los métodos se pueden utilizar para controlar tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. Los métodos son útiles para controlar tanto la inmunización activa (*por ejemplo*, anticuerpo producido en respuesta a la administración de inmunógeno) como la inmunización pasiva (*por ejemplo*, medir el nivel de anticuerpo administrado).

### 1. Inmunización activa

**[0133]** Algunos métodos implican determinar un valor de línea de base de una respuesta inmune en un paciente antes de administrarse una dosificación de agente, y comparar este con un valor para la respuesta inmune después del tratamiento. Un aumento significativo (*es decir*, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales mediciones) en el valor de la respuesta inmunitaria señala un resultado de tratamiento positivo (*es decir*, que la administración del agente ha logrado o aumentado una respuesta inmune). Si el valor para la respuesta inmune no cambia significativamente, o disminuye, un resultado de tratamiento negativo se indica. En general, se espera que los pacientes sometidos a un ciclo inicial de tratamiento con un agente inmunogénico para mostrar un aumento de la respuesta inmunitaria con las dosificaciones sucesivas, que finalmente alcanza un tope. La administración de agente se continúa generalmente mientras que la respuesta inmune está aumentando. El logro de la meseta es un indicador de que la administrada de tratamiento puede ser suspendida o reducida en la dosificación o frecuencia.

**[0134]** En otros procedimientos, un valor de control (*es decir*, una media y desviación estándar) de la respuesta inmune se determina para una población control. Típicamente los individuos en la población control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos de respuesta inmune en un paciente después de la administración de un agente terapéutico se comparan entonces con el valor de control. Un aumento significativo con respecto al valor de

control (*por ejemplo*, mayor que una desviación estándar de la media) indica un resultado de tratamiento positivo. La falta de aumento significativo o una disminución indica un resultado de tratamiento negativo. La administración del agente se continúa generalmente mientras que la respuesta inmunitaria se aumenta con respecto al valor de control. Como antes, el logro de un tope con respecto a los valores de control es un indicador de que la administración de tratamiento puede interrumpirse o reducirse en la dosificación o frecuencia.

**[0135]** En otros procedimientos, un valor de control de la respuesta inmune (*por ejemplo*, una media y desviación estándar) se determina a partir de una población de control de individuos que han experimentado tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas inmunes han alcanzado un tope en respuesta al tratamiento. Los valores medidos de respuesta inmune en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (*por ejemplo*, más de una desviación estándar) del valor de control, el tratamiento puede interrumpirse. Si el nivel en un paciente es significativamente inferior al valor de control, está justificada la administración continuada de agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control, entonces un cambio en el régimen de tratamiento, por ejemplo, puede estar indicado el uso de un adyuvante diferente.

**[0136]** En otros procedimientos, un paciente que no está recibiendo actualmente tratamiento pero se ha sometido a un curso previo de tratamiento se controla para la respuesta inmune a determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de respuesta inmune en el paciente puede ser comparado con un valor de respuesta inmune previamente conseguido en el paciente después de un curso previo de tratamiento. Una disminución significativa con respecto a la medición anterior (*es decir*, mayor que un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que el tratamiento puede reanudarse. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de someterse a un curso de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que permanecen libres de síntomas de la enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran una mejora de características de la enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa relativa al nivel de control (*es decir*, más de una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en un paciente.

**[0137]** La muestra de tejido para el análisis es típicamente sangre, plasma, suero, fluido mucoso o cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza para la indicación de una respuesta inmune a cualquier forma de alfa-SN, típicamente NAC, o A $\beta$ . La respuesta inmunitaria puede determinarse a partir de la presencia de, *por ejemplo*, anticuerpos o células T que se unen específicamente a alfa-SN o AB. Métodos ELISA de detección de anticuerpos específicos para alfa-SN se describen en la sección de Ejemplos. Los métodos para detectar células T reactivas se han descrito anteriormente (véase Definiciones). En algunos procedimientos, la respuesta inmune se determinó usando un ensayo de compensación, tal como se describe en la Sección III anterior. En tales métodos, una muestra de tejido o de sangre de un paciente que está siendo sometido a un ensayo se pone en contacto con LBs (*por ejemplo*, a partir de un ratón transgénico de sinucleína/hAPP) y células fagocíticas que llevan receptores Fc. Se supervisa la liquidación subsiguiente de los LBs. La existencia y el grado de limpieza de respuesta proporciona una indicación de la existencia y nivel de anticuerpos eficaces para eliminar alfa-SN en la muestra de tejido del paciente bajo prueba.

## 2. Inmunización pasiva

**[0138]** En general, los procedimientos para controlar la inmunización pasiva son similares a aquellos para controlar la inmunización activa descrita anteriormente. Sin embargo, el perfil de anticuerpos después de la inmunización pasiva típicamente muestra un pico inmediato en la concentración de anticuerpo seguido de una caída exponencial. Sin una dosificación adicional, la caries se aproxima a los niveles de pretratamiento dentro de un período de días a meses dependiendo de la semivida del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la vida media de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

**[0139]** En algunos procedimientos, una medida de referencia del anticuerpo a alfa-SN en el paciente se hace antes de la administración, una segunda medición se realiza poco después para determinar el nivel de anticuerpo máximo, y una o más medidas están hechos a intervalos para controlar la descomposición de los niveles de anticuerpos. Cuando el nivel de anticuerpo se ha reducido al valor basal o un porcentaje predeterminado del pico menos la línea de base (*por ejemplo*, 50%, 25% o 10%), se administra la administración de una dosificación adicional de anticuerpo. En algunos procedimientos, niveles máximos o medidos de modo subsiguiente menos fondo se comparan con niveles de referencia determinados previamente para 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) la administración de una dosificación adicional de anticuerpo se indica.

## 3. Kits de diagnóstico

**[0140]** La descripción proporciona además kits de diagnóstico para realizar los métodos de diagnóstico descritos anteriormente. Típicamente, dichos kits contienen un agente que se une específicamente a los anticuerpos a alfa-

SN. El kit también puede incluir una etiqueta. Para la detección de anticuerpos a alfa-SN, la etiqueta está típicamente en forma de anticuerpos anti-idiotípicos marcados. Para la detección de anticuerpos, el agente puede suministrarse preunido a una fase sólida, tal como a los pocillos de una placa de microtitulación. Los kits también contienen típicamente etiquetado que proporciona instrucciones de uso del kit. El etiquetado puede incluir también un gráfico u otros que correlacionan los niveles de régimen de correspondencia de marcador medido con niveles de anticuerpos a alfa-SN. El término etiquetado se refiere a cualquier material escrito o registrado que está unido a, o de otra manera acompaña a un kit en cualquier momento durante su fabricación, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término etiquetado abarca folletos publicitarios y folletos, materiales de embalaje, instrucciones, cintas de audio o de vídeo, discos informáticos, así como la escritura impresa directamente en los kits.

**[0141]** La divulgación también proporciona kits de diagnóstico para la realización de imágenes *in vivo*. Dichos kits típicamente contienen un anticuerpo de unión a un epítipo de alfa-SN, preferiblemente dentro de NAC. Preferiblemente, el anticuerpo está marcado o un reactivo de marcaje secundario se incluye en el kit. Preferiblemente, el kit está etiquetado con instrucciones para realizar un ensayo de formación de imágenes *in vivo*.

## VII. IMAGEN *IN VIVO*

**[0142]** La descripción proporciona métodos de LBs de imagen *in vivo* en un paciente. Tales métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de la EP, o de otra enfermedad asociada con la presencia de LBs en el cerebro, o la susceptibilidad a la misma. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene LBs, entonces es probable que el paciente sufre de, *por ejemplo*, EP. Los métodos también se pueden utilizar en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos anormales de amiloide indica la susceptibilidad a la enfermedad sintomática futura. Los métodos también son útiles para controlar la progresión y/o respuesta de la enfermedad al tratamiento en pacientes que han sido diagnosticados previamente con la enfermedad de Parkinson.

**[0143]** Los métodos funcionan mediante la administración de un reactivo, tal como un anticuerpo que se une a alfa-SN en el paciente y después detectan el agente después de que se ha unido. Los anticuerpos preferidos se unen a depósitos de alfa-Sn en un paciente sin unirse a polipéptido de longitud completa NACP. Anticuerpos que se unen a un epítipo de alfa-SN dentro de NAC son particularmente preferidos. Si se desea, la respuesta de eliminación puede evitarse usando fragmentos de anticuerpo que carecen de una región constante de longitud completa, tales como Fab. En algunos procedimientos, el mismo anticuerpo puede servir como un tratamiento y reactivo de diagnóstico. En general, los anticuerpos que se unen a epítipos N-terminal de alfa-SN no muestran señal tan fuerte como anticuerpos que se unen a epítipos C-terminales, presumiblemente porque los epítipos N-terminales son inaccesibles en LBs (Spillantini et al PNAS, 1998). Por consiguiente, dichos anticuerpos son menos preferidos.

**[0144]** Reactivos de diagnóstico pueden administrarse por inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro por inyección intracraneal o taladrando un agujero a través del cráneo. La dosificación de reactivo debe 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 es no marcado y un agente de marcaje secundario se usa para unirse al reactivo primario. La elección del marcador depende de los medios de detección. Por ejemplo, un marcador fluorescente es adecuado para la detección óptica. El uso de marcadores paramagnéticos es adecuado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Los marcadores radiactivos también pueden detectarse usando PET o SPECT.

**[0145]** El diagnóstico se lleva a cabo comparando el número, tamaño y/o la intensidad de loci marcado a valores de la línea base correspondiente. Los valores de la línea base pueden representar los niveles medios en una población de individuos no enfermos. Valores de la línea base también pueden representar niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de línea de base pueden determinarse en un paciente antes de comenzar el tratamiento, y los valores medidos a partir de entonces en comparación con los valores de la línea base. Una disminución en los valores relativos a la línea de base señala una respuesta positiva al tratamiento.

## EJEMPLOS

Ejemplo I. La inmunización de ratones transgénicos de sinucleína alfa humana con sinucleína alfa humana resulta en la producción de anticuerpos anti-alfa-sinucleína de alto título que atraviesan la barrera hematoencefálica

**[0146]** de longitud completa humana recombinante alfa-SN se resuspendió a una concentración de 1 mg/ml en 1X solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para cada inyección, 50 µl de alfa-SN se utilizó; dando una concentración final de 50 µg por inyección a la que 150 µl de 1X PBS se añadió. Adyuvante completo de Freund (CFA) se añadió 1: 1 a alfa-SN o PBS solo (control), con vórtex y se sonicó para resuspender completamente la emulsión. Para las inyecciones iniciales, ocho ratones de línea D alfa-SN humanos transgénicos (Tg) únicos transgénicos de 4-7 meses de edad única (Masliah, et al Science 287: 12 65-1269 (2000) recibieron inyecciones de alfa-SN humana en CFA y, como control, los ratones tg alfa-SN humanos de cuatro líneas D recibieron inyecciones de PBS en CFA. Los ratones recibieron un total de 6 inyecciones. Tres inyecciones se realizaron a intervalos de dos semanas y luego 3 inyecciones a intervalos de un mes. Los animales se sacrificaron utilizando las directrices del NIH

para el tratamiento humano de animales 5 meses después de la iniciación del experimento. Después se recogieron muestras de sangre para la determinación de los títulos de anticuerpos, los cerebros fueron fijados por inmersión durante 4 días en 4% de paraformaldehído en PBS. Los niveles de anticuerpos contra alfa-SN humano por ELISA se muestran en la Tabla 1. Los ratones tratados se dividen en dos grupos por título. El primer grupo desarrolló un título moderado de 2-8.000. El segundo grupo desarrolló un alto título de 12000 a 30000. Ningún título se encontró en los ratones de control. Análisis neuropatológica mostró que los ratones que producen títulos elevados tenían una marcada disminución en el tamaño de inclusiones de sinucleína. Los ratones que producen títulos moderados mostraron una disminución más pequeña. FIG. 2 (paneles a-d) muestran inclusiones de sinucleína en (a) un ratón no transgénico, (b) un ratón transgénico tratado con CFA solamente, (c) un ratón transgénico inmunizado con sinucleína alfa y CFA que desarrolló un título moderado y (d) un ratón transgénico inmunizado con sinucleína alfa y CFA que desarrolló un título más alto. Las muestras se visualizaron por inmunotinción con un anticuerpo alfa-SN anti-humano. FIG. 2 muestra inclusiones de sinucleína en el panel (b), pero no el panel (a). En el panel (c), el ratón tratado, los títulos moderados, las inclusiones se reducen en cierta medida en intensidad. En el panel (d) las inclusiones se reducen notablemente en intensidad. Paneles (e) - (h) muestran niveles de anti-IgG en los cerebros mismos cuatro ratones como paneles (a) a (d), respectivamente. Se puede observar que la IgG está presente en los paneles (g) y en mayor medida en el panel (h). Los datos muestran que los anticuerpos administrados periféricamente a alfa-SN atraviesan la barrera hematoencefálica y llegan al cerebro. Paneles (i) a (l) que muestran tinción para GAP, un marcador de células astrogliales, de nuevo por los mismos cuatro ratones como en las dos primeras filas de la FIG. Se puede observar que los paneles (k) y (l) muestran moderadamente el aumento de la tinción en comparación con (i) y (j). Estos datos muestran que la liquidación de los depósitos de sinucleína se acompaña de una astrogliosis suave y reacción microglial.

Tabla 1

Grupo	Genotipo	n =	Edad a Sac	Tratamiento/Longitud	Títulos	Syn (+) inclusiones/ mm2
I	Syn Tg	4	10-13 mo	a-syn+CFA 50 ug/inj para 3mo sac'd 3mo más tarde	2,000 - 8,000	15-29
II	Syn Tg	4	10-13 mo	a-syn+CFA 50 ug/inj para 3mo sac'd 3mo más tarde	12,000 - 30,000	10-22
III	Syn Tg	4	10-13 mo	PBS+CFA para 3mo sac'd 3mo más tarde	0	18-29

Ejemplo II. Exploración *In Vitro* para anticuerpos que liquidan inclusiones de sinucleína

**[0147]** Celular neuronal GT1-7 (Hsue et al Am J. Pathol 157: 401-410 (2000)) se transfectaron con un vector de expresión pCR3.1-T (Invitrogen, Carlsbad, CA) que expresa alfa-SN murino y comparación con las células transfectadas con el vector de expresión por sí sola (FIG. 3, los paneles B y A respectivamente). Las células transfectadas con el vector solo (panel A) tienen una apariencia fibroblástica mientras que las células transfectadas con alfa-SN están redondeadas, con cuerpos de inclusión en la superficie celular visible a través de la luz y microscopía de barrido confocal. Las células transfectadas se trataron después con suero preinmune de conejo (panel C) o 67 a 10, un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad contra residuos terminales C alfa-SN murinos 131-140 (Iwai, et al., Neuron 14: 467 (1995) (panel D). Se puede ver que los cuerpos de inclusión se tiñen menos fuertemente en el panel D que en el panel C que indica que el anticuerpo contra sinucleína alfa era eficaz en la compensación o la prevención del desarrollo de las inclusiones. La FIG. 4 muestra un análisis en gel de partículas y las fracciones citosólicas de GT1-7 transfectaron células tratadas con el suero preinmune de conejo y anticuerpo policlonal 67-10. Se puede observar que los niveles de sinucleína en la fracción citosólica es en gran medida sin cambios por el tratamiento con suero preinmune o un anticuerpo a alfa-SN. Sin embargo, la banda alfa-SN desaparece en la fracción de membrana de las células GT1-7 tratadas con el anticuerpo a alfa-SN. Estos datos indican que los resultados de la actividad de anticuerpo sinucleína alfa en la liquidación de sinucleína asociada con la membrana celular.

**[0148]** Las células GT1-7 transfectadas pueden usarse para cribar anticuerpos para la actividad en la liquidación de inclusiones de sinucleína con la detección, ya sea por análisis inmunohistoquímico, microscopía de luz como en la FIG. 3 o mediante análisis en gel como en la FIG. 4.

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

i. Inmunización de ratones tg de sinucleína alfa humana

**[0149]** Para este estudio, ratones transgénicos alfa-SN humanos heterocigotos (tg) (Línea D) (Masliah et al., Science 286: 1265-1269) y controles no transgénicos (sin Tg) se utilizan. Los animales experimentales se dividieron en 3 grupos. Para el grupo I, se examinaron los efectos preventivos de inmunización temprana por los ratones inmunizantes durante 8 meses, comenzando a los 2 meses de edad. Para el grupo II, los ratones adultos jóvenes

son vacunados 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 la patología moderada se había establecido. Para el grupo III, los ratones de más edad se inmunizan durante 4 meses comenzando a la edad de 12 meses para determinar si la inmunización puede reducir la gravedad de los síntomas una vez que se ha establecido una patología robusta. Para todos los grupos, los ratones se inmunizaron con o bien SN alfa humana recombinante más CFA o CFA solo, y para cada experimento se utilizan 20 tg y 10 ratones sin Tg. De ellos, 10 ratones tg se inmunizan con alfa-SN humano + CFA y otros 10 tg con CFA solo. De manera similar, 5 ratones sin Tg se inmunizan con alfa-SN humano + CFA y el otro 5 con CFA solo. Brevemente, el protocolo de inmunización consiste en una inyección inicial con recombinante alfa-SN humano purificado (2 mg/ml) en CFA, seguido de una reinyección 1 mes más tarde con alfa-SN humano en combinación con IFA. Los ratones se reinyectan a continuación, con esta mezcla una vez al mes. En un pequeño subconjunto de tg alfa-SN humana (n=3/cada uno; 6 meses de edad) y ratones no Tg (n = 3/cada uno; 6 meses de edad), los experimentos adicionales consistentes de la inmunización con sinucleína beta humano alfa-SN murina (m), o alfa-SN humana mutante (A53T) se llevan a cabo.

**[0150]** Los niveles de anticuerpo alfa-SN se determinan utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con 0,4 µg por pocillo de alfa-SN purificado de longitud completa por incubación durante la noche a 4°C en tampón de carbonato de sodio, pH 9,6. Los pocillos se lavan 4 veces con 200 µl conteniendo cada PBS 0,1% de Tween y se bloquearon durante 1 hora en PBS-BSA al 1% a 37°C. Las muestras de suero se diluyeron en serie "en-pocillo", 1: 3, comenzando en la fila A, que van desde una dilución de 1: 150 a 1: 328.050. Para los experimentos de control, una muestra de anticuerpo monoclonal de ratón se ejecuta en alfa-SN, ninguna proteína, y blancos de solo tampón. Las muestras se incuban durante la noche a 4°C seguido de una incubación de 2 horas con anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina de IgG anti-ratón de cabra (1: 7500, Promega, Madison, WI). A continuación se añade sustrato fluorescente de fosfatasa alcalina Atto-Phos® durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lee a una longitud de onda de excitación de 450 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. Los resultados se representan en un gráfico semi-log con unidades de fluorescencia relativas en la dilución de ordenadas y suero en la abscisa. El título de anticuerpos se define como la dilución a la que había una reducción del 50% a partir de la unión máxima de anticuerpos.

**[0151]** Para cada grupo, al final del tratamiento, los ratones se someten a evaluación de motor en el rotarod, como se describe (Masliah, *et al.* (2000)). Después del análisis, los ratones se sacrificaron y los cerebros se retiraron para el análisis neuroquímico y neuropatológico detallado tal como se describe a continuación. Brevemente, el hemisferio derecho se congela y se homogeneiza durante determinaciones de inmunoreactividad alfa-SN humana agregada y no agregada por Western blot (Masliah, *et al.* (2000)). El hemisferio izquierdo se fija en 4% de paraformaldehído, en serie seccionada en el vibratoma para inmunocitoquímica y análisis ultraestructural.

ii. Análisis inmunocitoquímico y neuropatológico.

**[0152]** Con el fin de determinar si la inmunización se disminuye, las secciones de agregación de alfa-SN humanos están inmunoteñidas con un anticuerpo policlonal de conejo contra alfa-SN humana (1: 500). Después de una incubación durante la noche a 4°C, las secciones se incuban con anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado seguido de complejo de peroxidasa Avidina D-Rábano (HRP) (1: 200, ABC Elite, Vector). Las secciones también se inmunotienen con biotinilado anti-conejo, ratón o humano solo secundario. Los experimentos con el anti-ratón secundario determinan si los anticuerpos contra alfa-SN humano se desplazan al cerebro. La reacción se visualizó con 0,1% 3,3'-tetraclorhidrato de diaminobenzidina (DAB) en 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) con 0,001% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y secciones están entonces montadas en deslizado bajo Entellan. Los niveles de inmunoreactividad se evalúan semicuantitativamente por densitometría óptica usando el Quantimet 570C. Estas secciones también se estudian por análisis de imagen para determinar el número de inclusiones inmunoreactivas alfa-SN y esta medida fiable de los actos de agregación de alfa-SN como un índice valioso de los efectos anti-agregación de la vacunación (Masliah, *et al.* (2000)).

**[0153]** El análisis de los patrones de neurodegeneración se logra mediante el análisis de densidades sinápticas y dendríticas en el hipocampo, la corteza frontal, corteza temporal y los ganglios basales utilizando secciones de vibratoma doble inmunomarcadas para sinaptofisina y proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) y se visualizaron con LSCM. El análisis adicional de la neurodegeneración se consigue determinando la inmunoreactividad de hidroxilasa de tirosina (TH) en el caudoputamen y la sustancia negra (SN) como se describe previamente (Masliah, *et al.* (2000)). Las secciones se visualizarán con el LSCM y cada imagen individual se dimensiona interactivamente de tal modo que se incluyan los terminales TH-inmunoreactivos que muestran intensidad de los píxeles dentro de un intervalo lineal. Una escala se ajusta para determinar la relación de píxel a µm. A continuación, esta información se utiliza para calcular el % de área de la neurópila cubierta por los terminales TH-inmunoreactivos. Estas mismas secciones también se utilizan para evaluar el número de neuronas TH en el SN.

**[0154]** Para evaluar los patrones de respuesta inmune a la inmunización, inmunocitoquímica y análisis ultraestructural con anticuerpos contra GFAP humana, MCH de clase II, Mac 1, TNF-alfa, IL-1 beta y IL6 se llevan a cabo en secciones cerebrales de ratones no Tg y alfa-SN tg inmunizados con alfa-SN humano recombinante y inmunógenos de control.

## iii. Análisis del comportamiento.

**[0155]** Para actividad locomotora, ratones se analizaron durante 2 días en los instrumentos de rotarod (San Diego), San Diego, CA), como se ha descrito previamente (Masliah, *et al.* (2000)). En el primer día los ratones están capacitados para 5 pruebas: la primera a 10 rpm, la segunda a 20 rpm y la tercera a la quinta a 40 rpm. En el segundo día, los ratones se ensayan para 7 ensayos a 40 rpm cada uno. Los ratones se colocan individualmente en el cilindro y la velocidad de rotación se aumenta de 0 a 40 rpm durante un período de 240 seg. La longitud de los ratones de tiempo permanecen en la varilla (Latenciade caída) se registra y se utiliza como una medida de la función motora.

## Ejemplo IV. Inmunización con fragmentos de sinucleína alfa

**[0156]** Ratones transgénicos alfa-SN humanos de 10-13 meses de edad se inmunizan con 9 regiones diferentes de alfa-SN para determinar qué epítomos transmiten la respuesta eficaz. Los 9 inmunógenos diferentes y un control fueron inyectados ip como se describe anteriormente. Los inmunógenos incluyen cuatro conjugados de péptido alfa-SN humanos, acoplados a IgG de oveja anti-ratón mediante un enlace de cistina. Alpha-SN y PBS se utilizan como controles positivos y negativos, respectivamente. Los títulos se controlan como anteriormente y los ratones se sacrificaron al final de 3-12 meses de inyecciones. Histoquímica, niveles de alfa-Sn, y el análisis de toxicología se determina post mortem.

## i. Preparación de inmunógenos

**[0157]** Preparación de péptidos alfa-SN acoplados: conjugados peptídicos alfa-SN H se preparan mediante el acoplamiento a través de una cisteína artificial añadida al péptido alfa-SN usando el reactivo de reticulación sulfo-EMCS. Los derivados de péptidos alfa-SN se sintetizan con las siguientes secuencias finales de aminoácidos. En cada caso, la ubicación del residuo de cisteína insertada se indica mediante subrayado.

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

NH<sub>2</sub>-KEQVTNVCGGAVVT-COOH (SEQ ID NO: 54)

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

NH<sub>2</sub>-GVTAVAQKTVECG-COOH (SEQ ID NO: 55)

péptido de sinucleína alfa 102-112:

NHH<sub>2</sub>-C-amino-ácido heptanoico- KNEEGAPCQEG-COOH (SEQ ID NO: 56) péptido de sinucleína alfa 128-140:

Ac-NH-PSEEGYQDYEPEDA-COOH (SEQ ID NO: 57)

**[0158]** Para preparar la reacción de acoplamiento, diez mg de IgG anti-ratón de oveja (Jackson ImmunoResearch Laboratories) se dializaron durante la noche frente a tampón de borato de sodio 10 mM, pH 8,5. El anticuerpo dializado se concentra a continuación hasta un volumen de 2 mL utilizando un tubo Amicon Centriprep. Diez mg sulfo-EMCS [N (ε-maleimidocuproiloxi) succinimida] (Molecular Sciences Co.) se disuelve en un agua desionizada mL. Un exceso molar de 40 veces de sulfo-EMCS se añade gota a gota con agitación a la IgG anti-ratón de oveja y después la solución se agita durante diez minutos adicionales. La IgG anti-ratón de oveja activada se purifica y se intercambia el tampón mediante el paso sobre una columna de filtración en gel de 10 mL (Columna Pierce Presto, obtenida de Pierce Chemicals) equilibrada con 0,1 M NaPO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA, pH 6,5. Anticuerpo que contiene fracciones, identificadas mediante absorbancia a 280 nm, se reúnen y se diluyen a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, usando 1,4 mg por DO como coeficiente de extinción. Un exceso molar de 40 veces de péptido alfa-SN se disuelve en 20 mL de NaPO<sub>4</sub> de 10 mM, pH 8,0, con la excepción del péptido alfa-SN para el que se disuelve en primer lugar 10 mg en 0,5 mL de DMSO y después se diluyó a 20 mL con el tampón NaPO<sub>4</sub> 10 mM. Las soluciones de péptidos se añadieron cada uno a 10 mL de IgG anti-ratón de oveja activado y se sacudieron a temperatura ambiente durante 4 hr. Los conjugados resultantes se concentraron hasta un volumen final de menos de 10 mL usando un tubo Amicon Centriprep y luego se dializaron frente a PBS para intercambiar el tampón y eliminar el péptido libre. Los conjugados se pasaron a través de filtros de tamaño de poro de 0,22 μm para la esterilización y a continuación en alícuotas en fracciones de 1 mg y se almacenaron congelados a -20°C. Las concentraciones de los conjugados se determinaron utilizando el ensayo de proteína BCA (Pierce Chemicals) con IgG de caballo para la curva estándar. La conjugación está documentada por el aumento del peso molecular de los péptidos conjugados con respecto a la IgG anti-ratón de oveja activada.

## Ejemplo V. Inmunización pasiva con anticuerpos a la sinucleína alfa

**[0159]** Ratones alfa-SN humanos cada uno se inyectaron con 0,5 mg en PBS de monoclonales anti-alfa-SN, como

se muestra a continuación. Todas las preparaciones de anticuerpos se purifican para tener bajos niveles de endotoxina. Los monoclonales pueden prepararse frente a un fragmento inyectando el fragmento o forma más larga de alfa-SN en un ratón, preparación de hibricúpulas y cribado de los hibricúpulas para anticuerpo que se une específicamente a un fragmento deseado de alfa-SN sin unirse a otros fragmentos no solapantes de alfa-SN.

**[0160]** Los ratones se inyectaron ip, según sea necesario durante un período de 4 meses para mantener una concentración de anticuerpo circulante medida por título ELISA de más de 1: 1000 definido por ELISA a alfa-SN u otro inmunógeno. Los títulos se controlan como anteriormente y los ratones se sacrificaron al final de los 6 meses de inyecciones. Histoquímica, los niveles de alfa-Sn y toxicología se realizan post mortem.

#### Ejemplo VI. Inmunización A $\beta$ de ratones transgénicos Syn/APP

**[0161]** Este experimento compara los efectos de inmunización A $\beta$  en tres tipos de ratones transgénicos: ratones transgénicos con un transgén de sinucleína alfa (SYN), los ratones APP con un transgén APP (Games *et al.*) y ratones dobles transgénicos SYN/APP producidos por cruzar el único transgénico. Los ratones dobles transgénicos se describen en Masliah *et al.*, PNAS EE.UU. 98: 12245-12250 (2001). Estos ratones representan un modelo de individuos que tienen tanto la enfermedad de Alzheimer como la enfermedad de Parkinson. La Tabla 2 muestra los diferentes grupos, la edad de los ratones utilizados en el estudio, el procedimiento de tratamiento y el título de anticuerpos a A $\beta$ . Se puede ver que un título significativo fue generado en los tres tipos de ratones. FIG. 5 muestra el % de área cubierta por las placas amiloides de A $\beta$  en el cerebro determinado por el examen de secciones de cerebro de sujetos tratados por microscopía. Depósitos sustanciales se acumulan en el APP y ratones SYN/APP pero no en los ratones SYN o controles no transgénicos. Los depósitos son mayores en los ratones dobles transgénicos SYN/APP. La inmunización con A $\beta$ 1-42 reduce los depósitos tanto en ratones SYN/APP APP y. FIG. 6 muestra sinucleína de postula en los diferentes grupos de ratones como se detecta mediante el escaneo láser confocal y microscopía de luz. Depósitos de sinucleína se acumulan en los ratones SYN y SYN/APP tratados únicamente con CFA. Sin embargo, en los mismos tipos de ratones tratados con A $\beta$ 1-42 y CFA hay una marcada reducción en el nivel de depósito de sinucleína. Estos datos indican que el tratamiento con A $\beta$  es eficaz no sólo en la liquidación de depósitos A $\beta$ , pero también en la liquidación de los depósitos de sinucleína. Por lo tanto, el tratamiento con A $\beta$  o sus anticuerpos es útil en el tratamiento no sólo de la enfermedad de Alzheimer, sino también la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson combinada, y la enfermedad de Parkinson en pacientes libres de enfermedad de Alzheimer. El título de anticuerpos antiA $\beta$  en ratones SYN/APP se correlacionó con la formación reducida de inclusiones de sinucleína ( $r = -0,71$ ,  $p < 0,01$ ).

Tabla 2

Grupo	n =	Años	Tratamiento/Longitud	Títulos Ab
SYN	4	12-20 mo	Ab iny. 50ug/inj de 6mo	10.000-58.000
SYN	2	12-20 mo	Sal iny. para 6mo	0
APP	2	12-20 mo	Ab iny. 50ug/inj de 6mo	25000
APP	2	12-20 mo	Sal iny. para 6mo	0
SYN/APP	4	12-20 mo	Ab iny. 50ug/inj de 6mo	1.000-50.000
SYN/APP	2	12-20 mo	Sal iny. para 6mo	0

#### Ejemplo VII. Ensayo de selección *ex vivo* para actividad de un anticuerpo contra depósitos amiloides

**[0162]** Para examinar el efecto de los anticuerpos sobre la eliminación de placas, se estableció un ensayo *ex vivo* en el que las células microgliales primarias se cultivaron con secciones de criostato no fijadas de cualquiera de ratón PDAPP o cerebros EA humanos. Las células microgliales se obtuvieron de las cortezas cerebrales de ratones DBA/2N recién nacidos (1-3 días). Las cortezas se disociaron mecánicamente en HBSS<sup>-</sup> (solución salina equilibrada de Hanks, Sigma) con 50  $\mu$ g/ml de DNasa I (Sigma). Las células disociadas se filtraron con un 100  $\mu$ m de colador celular (Falcon), y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en medio de crecimiento (DMEM de alta glucosa, 10% de FBS, 25 ng/ml de rmGM-CSF), y las células se sembraron a una densidad de 2 cerebros por matraz de cultivo plástico de T-75. Después de 7-9 días, los matraces se rotaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 2 horas a 37°C. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm y se resuspendió en el medio de ensayo.

**[0163]** Secciones de criostato de 10- $\mu$ m de ratón PDAPP o cerebros de EA humanos (intervalo post-mortem <3 h) se montaron por deshielo sobre cubreobjetos de vidrio redondo recubiertos con poli-lisina y se colocaron en pocillos de placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con medio de ensayo que consiste en H-SFM (medio libre de hibridoma de suero, Gibco BRL) con FBS al 1%, glutamina, penicilina/estreptomicina, y 5 ng/ml de rmGM-CSF (R&D). Se añadieron anticuerpos de control o anti-A $\beta$  a una 2x concentración (5  $\mu$ g/ml final) durante 1 hora. Las células de la microglía fueron entonces sembradas a una densidad de  $0,8 \times 10^6$  células/ml medio de ensayo. Los cultivos se mantuvieron en un incubador humidificado (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) para las 24 horas o más. Al final de la incubación, los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con 0,1% de Triton-X100. Las secciones se tiñeron con 3D6 biotinilado seguido de un conjugado de estreptavidina/Cy3 (Jackson

ImmunoResearch). Las células microgliales exógenas se visualizaron mediante una tinción nuclear (DAPI). Los cultivos se observaron con un microscopio fluorescente invertido (Nikon, TE300) y fotomicrografías se tomaron con una cámara digital SPOT utilizando software SPOT (instrumentos diagnósticos). Para el análisis Western blot, se extrajeron los cultivos en urea 8 M, se diluyeron 1: 1 en tampón de muestra reductora de tricina y se cargaron en un gel de tricina 16% (Novex). Después de la transferencia en inmobilon, las transferencias se expusieron a 5 µg/ml de la pabAβ42 seguido de un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP, y se desarrolló con ECL (Amersham)

**[0164]** Cuando el ensayo se realizó con secciones de cerebro PDAPP en presencia de un anticuerpo contra una reducción marcada por NAC en el número y tamaño de placas indicativas de la actividad de liquidación del anticuerpo se observó. Un anticuerpo a NAC se puso en contacto con una muestra de tejido cerebral que contenía placas de amiloide y células microgliales, como se discutió anteriormente. El suero de conejo se usó como un control.

**[0165]** El mismo ensayo se realizó con secciones de cerebro PDAPP en presencia de varios anticuerpos contra Aβ. La capacidad de los anticuerpos para inducir la fagocitosis en el ensayo *ex vivo* y para reducir la carga de placa *in vivo* se comparó en estudios de transferencia pasiva. Estos resultados muestran que la eficacia *in vivo* se debe a dirigir liquidación mediada por anticuerpo de las placas dentro del SNC, y que el ensayo *ex vivo* es predictivo de eficacia *in vivo*. (Véase Tablas 16 y 17 del Ejemplo XIV del documento WO 00/72880; y, el Ejemplo XIV, Tabla 16, del documento WO 0072876.

Ejemplo VIII: Inmunización activa con sinucleína alfa

#### A. Materiales y Métodos

**[0166]** *Vacunación de ratones tg ha-sinucleína*. Para este estudio, los ratones tg heterocigotos (línea D) que expresan ha-sinucleína bajo el control regulador del promotor de factor de crecimiento derivado de plaquetas β (PDGFβ) (Maliah, 2000, Science 287: 1265-1269) fueron utilizados. Estos animales se seleccionaron porque desarrollan inclusiones inmunorreactivas de ha-sinucleína en el cerebro, así como déficits neurodegenerativos y de motor que imitan ciertos aspectos de LBD. Los animales experimentales fueron divididos en dos grupos. Para el primer grupo, un total de 20 ratones tg jóvenes (de 3 meses de edad) se inmunizaron durante 8 meses con ha-sinucleína recombinante (n = 10) o adyuvante solo (n = 10). Para el segundo grupo, un total de 20 ratones tg adultos jóvenes (de 6 meses de edad) se inmunizaron durante 8 meses con ha-sinucleína recombinante (n = 10) o adyuvante solo (n = 10). El protocolo de inmunización consistió primero de una inyección con ha-sinucleína recombinante (80 µg/ml; 100 µl) con adyuvante completo de Freund (CFA). Dos semanas más tarde los ratones recibieron otra inyección de ha-sinucleína (80 µg/ml; 100 µl) con FA incompleta, seguido de re-inyección una vez al mes (para los subsiguientes 7 meses) con ha-sinucleína (80 µg/ml; 100 µl) en solución salina tamponada con fosfato. Ha-sinucleína recombinante se preparó y se purificó como se describe en Masliah et al., 2005, Neuron 46: 857-68, y se ensayó para endotoxinas.

**[0167]** La determinación de títulos de anticuerpos y afinidad relativa a ha-sinucleína. Niveles de anticuerpos de ha-sinucleína en plasma se determinaron utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con 0,4 µg por pocillo de α-sinucleína purificada de longitud completa. Las muestras se incubaron durante la noche a 4°C seguido por el lavado y la incubación con anticuerpo conjugado por IgG alcalina fosfatasa anti-ratón de cabra, (1: 7500, Promega, Madison, WI). La placa se leyó a una longitud de onda de excitación de 450 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. Los resultados se representan en una gráfica semi-log con unidades de fluorescencia relativas en la dilución de ordenadas y suero en la abscisa. El título de anticuerpos se define como la dilución a la que había una reducción del 50% de la unión de anticuerpos máxima.

**[0168]** Para determinar la afinidad relativa para ha-sinucleína por los anticuerpos generados en los ratones vacunados, se realizaron dos conjuntos de experimentos. En los primeros de cerebro homogeneizados no inmunizados de ratones tg de ha-sinucleína se ejecutan en un aparato de minigel multicanal (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada canal se incubó con el suero diluido a partir de cada uno de los ratones, se transfirieron a nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpo anti-ratón de conejo secundario seguido de proteína A etiquetada por I<sup>125</sup> (Alford et al., J. Histochem Cytochem. 42: 283-287 (1994)). Las transferencias se visualizaron y se analizaron con el PhosphorImager (Molecular Dynamics, Piscataway, NJ). La banda inmunorreactiva se cuantificó usando el software ImageQuant (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Para el segundo conjunto de experimentos, secciones de vibratoma en serie del ratón tg de ha-sinucleína no inmunizado se incubaron en el suero diluido a partir de cada uno de los ratones tratados seguido IgG anti-ratón de caballo biotinilado (1: 100, Vector), avidina D-rábano picante peroxidasa (HRP, 1: 200, ABC Elite, Vector), y se hizo reaccionar con tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) que contiene 0,001% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Después de un examen microscópico, las secciones se puntuaron de acuerdo con el compartimento celular marcado (cuerpos celulares neuronales, sinapsis e inclusiones) y el grado de inmunorreactividad (0 = ninguna; 1 = muy leve, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = intenso).

**[0169]** *Mapeo de epítomos de anticuerpos de ha-sinucleína*. Los epítomos reconocidos por anticuerpos ha-sinucleína se determinado por ELISA que mide la unión de un anticuerpo a la superposición de péptidos lineales que cubrían toda la secuencia ha-sinucleína. Péptidos C-terminales biotinilados con secuencias de ha-sinucleína (mimotopos,

San Diego, CA) se prepararon como 15 péptidos largos de aminoácidos (aa) con un solapamiento de 12 residuos y una etapa de 3 residuos por péptido. Un total de 43 péptidos se utilizaron para caminar toda la secuencia de 140 aa de  $\alpha$ -sinucleína con el último péptido que tiene un solapamiento de 13 aa y una etapa de 2 aa. Además, los últimos 3 péptidos se repitieron, pero con la biotilación que ocurre en el N-terminal del péptido. Esto se hizo para mejorar el acceso a C-terminal de los péptidos por los anticuerpos y para permitir la identificación de anticuerpos específicos C-terminales libres. Además, se añadieron otras características para este ensayo para permitir un examen más a fondo de las interacciones entre los anticuerpos y la región componente (NAC) no-amiloide  $\beta$  (A $\beta$ ) (61-95) de  $\alpha$ -sinucleína. Dado que el 21<sup>o</sup> péptido en este ensayo ya contiene el N-terminal libre de la región de NAC, un péptido N-terminal adicional biotilado que contiene el C-terminal libre de la región de NAC se añadió para completar el ensayo con un total de 47 péptidos.

**[0170]** Para realizar el ensayo, estos péptidos biotilados se recubrieron hacia abajo durante la noche a 5 nM en placas de ELISA pre-recubiertas con estreptavidina (Pierce, Rockford, IL). A continuación, las placas se lavaron y se añadieron muestras de suero, diluidas hasta un título equivalente de 6, para una incubación de 1 hora. Las muestras de suero con títulos inferiores a 5.000 se diluyeron 1: 1000 para esta incubación. Después de otra etapa de lavado, los anticuerpos unidos se detectaron usando anticuerpos secundarios específicos de especie conjugados con HRP en un formato de ELISA colorimétrico.

**[0171]** *Procesamiento de tejidos.* Los ratones se sacrificaron y se retiraron los cerebros para el análisis neuroquímico y neuropatológico detallado tal como se describe a continuación. Brevemente, el hemiserebro derecho se congeló y se homogeneizó durante determinaciones de inmunorreactividad  $\alpha$ -sinucleína agregada y no agregada por transferencia Western (Masliah et al., 2000, supra). El hemiserebro izquierdo se fijó en 4% de paraformaldehído (PFA) y se seccionó en serie con el vibratoma (Leica, Wetzlar, Alemania) para la inmunocitoquímica (ICC) y análisis ultraestructural.

**[0172]** *Preparaciones de sinaptosomas y análisis de inmunotransferencia.* Para determinar los efectos de la vacunación en acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro de los ratones tg, las fracciones de sinaptosomas se prepararon usando gradientes de sacarosa y se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida de tris-acetato al 10% (NuPAGE<sup>TM</sup>, Invitrogen). Las inmunotransferencias se sondaron con anticuerpos primarios contra  $\alpha$ -sinucleína (LB509, 1: 1.000, Transduction Laboratories, San Diego, CA) y sinaptofisina (1:20, Chemicon, Temecula, CA) y IgG anti-ratón de cabra secundaria marcada con HRP (1: 5000, SantaCruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) y se visualizaron mediante quimioluminiscencia mejorada y se analizaron con un aparato de formación de imágenes Versadoc XL (BioRad, Hercules, CA).

**[0173]** Análisis neuropatológico e inmunocitoquímico. Brevemente, como se ha descrito previamente (Masliah et al., 2000), supra, para investigar los efectos de la vacunación sobre  $\alpha$ -sinucleína, en serie seccionada, de libre flotación, secciones de vibratoma con código oculto se incubaron durante la noche a 4°C con un anticuerpo específico anti- $\alpha$ -sinucleína de afinidad purificada (72-10, policlonal de conejo, 1: 500), preparado como se describió anteriormente (Masliah et al., 2000, supra.) por los conejos inmunizantes con péptidos sintéticos  $\alpha$ -sinucleína formados por aa 101-124. La incubación con el anticuerpo primario fue seguido de IgG anti-conejo de cabra biotilada (1: 100, Vector), Avidina D-HRP (1: 200, ABC Elite, Vector), y se hizo reaccionar con tetraclorhidrato de DAB que contiene 0,001% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las secciones se analizaron con el Quantimet 570C (Leica) con el fin de determinar el número de inclusiones inmunorreactivas de  $\alpha$ -sinucleína en el neocórtex. Para cada caso, tres secciones fueron analizadas y los resultados se promediaron y se expresaron como números por mm cuadrados. Un análisis más detallado inmunocitoquímico se realizó mediante la inmunorreacción de secciones con anticuerpos contra marcadores gliales incluyendo CD45 (1: 1000, DakoCytomation, Carpinteria, CA) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, 1: 500, Chemicon).

**[0174]** El análisis de doble inmunocitoquímica se realizó como se ha descrito previamente (Hashimoto et al., Neuron 32: 213-223 (2001) para determinar los efectos de la vacunación sobre la densidad terminal nerviosa y acumulación  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis. Para este propósito, secciones de vibratoma fueron doble marcadas con un anticuerpo policlonal contra  $\alpha$ -sinucleína (1: 1000) y con el anticuerpo monoclonal contra sinaptofisina (Chemicon). Se detectó  $\alpha$ -sinucleína con Tyramide Red (1: 2000, Roche) y sinaptofisina con el IgG anti-ratón de caballo marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para cada caso, las secciones se inmunotiquetaron por duplicado y se analizaron con el escaneo láser de microscopio confocal (LSCM) y software NIH Image 1.43 para calcular el porcentaje de área del neuropilo cubierto por terminales sinaptofisina-inmunorreactivos en el neocórtex (Mucke et al., J. Neurosci. 20: 4.050-4.058 (2000)) y la proporción de terminales sinaptofisina-inmunorreactivos que eran positivos por  $\alpha$ -sinucleína. Para confirmar la especificidad de los anticuerpos primarios, se realizaron experimentos de control en los que las secciones se incubaron durante la noche en ausencia de anticuerpo primario (suprimido), con el anticuerpo primario preadsorbido durante 48 horas con exceso de 20 veces del péptido correspondiente o con suero preimmune.

**[0175]** Todas las secciones se procesan simultáneamente en las mismas condiciones y experimentos se realizaron dos veces con el fin de evaluar la reproducibilidad de los resultados. Las secciones se visualizaron con un objetivo Zeiss 63X (N.A. 1,4) en un microscopio Axiovert 35 (Zeiss, Alemania) con un sistema de MRC1024 LSCM adjunto (BioRad, Watford, Reino Unido) (Masliah et al., 2000, supra).

**[0176]** *Análisis estadístico.* Se realizaron comparaciones estadísticas entre los grupos utilizando la prueba t de Student no pareada de dos colas. Se realizó un análisis de regresión lineal para determinar la relación entre las variables. La corrección de Bonferroni se aplicó para justificar comparaciones múltiples.

5 B. Resultados

Caracterización de los títulos de anticuerpos, la afinidad y el mapeo de epítomos

10 **[0177]** Los títulos de anticuerpos fueron analizados a 3 puntos de tiempo (2 semanas, 6 meses y 9 meses después de la vacunación) en ambos grupos experimentales. Los títulos de anticuerpos variaron considerablemente entre los ratones, en los animales pertenecientes al grupo I, los títulos de anticuerpos entre los ratones inmunizados con hα-sinucleína variaron de 200 a 20.000 (Tabla 3).

15 Tabla 3. Resumen de títulos α-sinucleína y la afinidad de inmunotransferencia (corregida para la titulación).

Grupo	Afinidad del anticuerpo por miniblót	Afinidad del anticuerpo a sinapsis	Afinidad del anticuerpo a inclusiones	Títulos de anticuerpos (primer sangrado)	Títulos de anticuerpos (segundo sangrado)	Títulos de anticuerpos (tercer sangrado)
Grupo I/α-syn	109147±2,700	1,9±0,73	1,2±0,4	2,332±500	2772±1176	3644±2365
Grupo I/IIICFA	113±113	0,4±0,1	0	19±6,7	30±12	7±4
Grupo II/α-syn	235747±74000	4,1±0,9	2,8±1,0	3813±1200	2926±976	1468±641
Grupo II/IIICFA	400±358	0,3±0,2	0,1±0,1	23±9	21±14	0,6±0,6

35 **[0178]** En este grupo los títulos de promedio se aumentaron ligeramente con el tiempo. Del mismo modo, para el grupo II, animales inmunizados con hα-sinucleína mostraron títulos que variaban de 200 a 13.000 (Tabla 3). Sin embargo, los niveles medios de titulación fueron mayores en la primera determinación y luego se disminuyeron con el tiempo. Análisis de inmunotransferencia también mostró una variabilidad significativa de ratón a ratón en su capacidad para reconocer hα-sinucleína. En general, los niveles de afinidad relativa de anticuerpo fueron mayores en los ratones del grupo II en comparación con los ratones inmunizados del grupo I (Tabla 4).

40 Tabla 4. Resumen de correlaciones entre la afinidad de inmunotransferencia, neuropatología y títulos.

Marcadores neuropatológicos	Afinidad del anticuerpo por minitransferencia	Afinidad del anticuerpo a sinapsis	Afinidad del anticuerpo a inclusiones	Afinidad del anticuerpo a neuronas	Títulos de anticuerpos (primer sangrado)
Número de inclusiones α-syn (+)	-0,11	0,04	0,12	-0,21	0,1
% de área de sinapsis de neuropilo α-syn (+)	-0,46 (p = 0,003)	-0,41 (p = 0,009)	-0,43 (p = 0,005)	0,06	-0,47 (p = 0,007)
% de área de sinapsis de sinaptofisina de neuropilo (+)	0,06	0,35 (p = 0,04)	0,01	0,04	0,12
Afinidad del anticuerpo por minitransferencia	-	0,74 (p = 0,0001)	0,70 (p = 0,0001)	-0,16	0,85 (p = 0,0001)
Títulos de anticuerpos (primer sangrado)	0,85 (p = 0,0001)	0,62 (p = 0,0001)	-0,18	0,81 (p = 0,0001)	-

Por ICC, los sueros de ratones vacunados con  $\alpha$ -sinucleína mostraron etiquetado de las neuronas, inclusiones intraneuronales y terminales presinápticos. En contraste, los ratones tratados con adyuvante solo mostraron tinción leve difusa y no específica de los cuerpos celulares). Los sueros de ratones que pertenecen al grupo II mostraron mayor afinidad en el reconocimiento de  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis y neuronas en los ratones tg en comparación con los ratones inmunizados del grupo I (Tabla 4).

**[0179]** Los estudios de mapeo de epítomos mostraron que en ratones vacunados con  $\alpha$ -sinucleína, los anticuerpos con mayor frecuencia reconocieron epítomos peptídicos dentro de la región C-terminal de  $\alpha$ -sinucleína (Figura 8). Además, los anticuerpos a epítomos adicionales también se reconocieron ocasionalmente. En contraste, no se detectaron epítomos de reactividad de anticuerpos o con los sueros de los ratones tratados con CFA solo.

#### Inmunización reduce acumulación $\alpha$ -sinucleína y preserva la densidad sináptica en el cerebro de ratones tg

**[0180]** Para determinar los efectos de la inmunoterapia en acumulación de  $\alpha$ -sinucleína, las secciones se marcaron con anticuerpos contra  $\alpha$ -sinucleína y se analizaron por microscopía de campo brillante o por LSCM. En los ratones tg, inmunoreactividad abundante de  $\alpha$ -sinucleína se observó en el neuropilo así como en inclusiones intraneuronales. En comparación con los ratones tg tratados con CFA solo, ratones de ambos grupos inmunizados mostraron una reducción comparable (a proximadamente 25%) en el número de inclusiones en la corteza temporal (Figura 9A). Por otra parte, la inmunización resultó en una disminución en inmunoreactividad de  $\alpha$ -sinucleína en el neuropilo. Cuando se compara con los ratones tg tratados con CFA solo, este efecto era mayor en los ratones del grupo II en los ratones del grupo I (Figura 9A). Para determinar si los efectos de inmunización fueron de hecho relacionados con la capacidad de los anticuerpos para reducir acumulación neuronal de  $\alpha$ -sinucleína o a efectos de ocultación, los experimentos de control se llevaron a cabo mediante la comparación de los niveles de inmunoreactividad de sinucleína  $\beta$  entre CFA solo y ratones tg vacunados con  $\alpha$ -sinucleína. Consistentes con la distribución conocida de  $\beta$  sinucleína, un homólogo cercano a  $\alpha$ -sinucleína (Iwai et al., Neuron 14: 467-475 (1994)), inmunoreactividad de  $\beta$ -sinucleína abundante se observó en el neuropilo en asociación con los terminales presinápticos e inmunoetiquetado leve se detectó en los cuerpos celulares neuronales, pero no en las inclusiones. En comparación con los ratones tg tratados con CFA solo, no se encontraron diferencias en los patrones y niveles de  $\beta$ -sinucleína en los ratones inmunizados con  $\alpha$ -sinucleína. Para investigar más la especificidad de los efectos de anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína, los niveles de inmunoreactividad  $\alpha$ -sinucleína murina (m) se compararon entre el CFA solo y ratones tg vacunados con  $\alpha$ -sinucleína. De modo similar a  $\alpha$ -sinucleína, inmunoreactividad  $m\alpha$ -sinucleína era abundante en el neuropilo en asociación con los terminales nerviosos, pero estaba ausente en los cuerpos celulares neuronales y en las inclusiones. Tanto en los ratones inmunizados con CFA como con  $\alpha$ -sinucleína, los patrones y niveles de  $m\alpha$ -sinucleína eran comparables. Tomados en conjunto, estos estudios sugieren que la vacunación afecta específicamente  $\alpha$ -sinucleína pero no a otras moléculas sinápticas relacionadas.

**[0181]** Para determinar adicionalmente los efectos de la inmunoterapia en la integridad de neuropilo, las secciones se inmunotñeron con un anticuerpo contra sinaptofisina o por microscopía electrónica. En comparación con ratones no transgénicos (sin Tg), los ratones tg tratados con CFA solo mostraron un promedio de 20% de disminución en el número de terminales inmunoetiquetados por sinaptofisina, y los niveles de inmunorreactividad de sinaptofisina por sinapsis se mantuvo sin cambios (Figura 9B). En contraste, los ratones inmunizados de ambos grupos mostraron niveles de inmunorreactividad de sinaptofisina comparables a los controles sin Tg (9B). Posterior análisis inmunocitoquímico con anticuerpos contra marcadores gliales, tales como GFAP y CD45 mostraron una tendencia hacia el aumento de la inmunorreactividad en los cerebros de ratones tg vacunados con  $\alpha$ -sinucleína (Figura 9C). De acuerdo con estos resultados, el análisis ultraestructural mostró que en los cerebros de ratones tg inmunizados con  $\alpha$ -sinucleína, el neuropilo estaba bien conservado, con terminales y dendritas presinápticas intactas y los terminales nerviosas contenían vesículas claras abundantes y densidades postsinápticas formadas. Sólo de vez en cuando se identificaron los agregados electrodensos en los procesos neuríticos y en general la mitocondria y la mielina estaban bien conservados.

**[0182]** Para caracterizar mejor los efectos de la vacunación sobre agregación  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis, se realizó análisis doble inmunocitoquímico y transferencia Western con preparaciones de sinaptosomas. Bajo condiciones fisiológicas se localiza  $\alpha$ -sinucleína principalmente a los boutons presinápticos (Iwai et al., 1994, supra) y en LBD y en los ratones tg, acumulación aumentada de la  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis está asociada con déficits funcionales y la pérdida de sinapsis (Hashimoto et al., 2001, supra). Para determinar los efectos de la vacunación sobre acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en las terminales nerviosas, los estudios dobles inmunoetiquetados con anticuerpos contra el marcador terminal presináptico sinaptofisina y  $\alpha$ -sinucleína y se realizaron análisis WB con preparaciones de sinaptosomas. La visualización confocal de secciones de doble marcado mostró que en comparación con ratones tg de  $\alpha$ -sinucleína vacunados con CFA solo (Figura 9D), aquellos que fueron inyectados con  $\alpha$ -sinucleína muestran disminución de la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en terminales de nervio inmunoactivo de sinaptofisina en el neocórtex (Figura 9D).

**[0183]** De acuerdo con los estudios inmunocitoquímicos, análisis de inmunotransferencia mostró que en los ratones tg tratados con CFA solo, hubo abundantes bandas de peso molecular más alto, posiblemente reflejando la acumulación de inclusiones inmunoactivas de  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis (Figura 10). En los ratones inmunizados hubo una considerable disminución en la acumulación de bandas de peso molecular más alto de  $\alpha$ -

sinucleína y 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 inmunoreactividad de sinaptofisina fueron mayores en las preparaciones de sinaptosomas de ratones inmunizados (Figura 10). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la inmunoterapia puede mejorar el daño neuronal en los cerebros de ratones tg mediante la reducción de 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 los terminales sinápticos

**[0184]** Para comprender mejor los factores que predicen la eficacia de la inmunoterapia, se realizó un análisis de regresión lineal entre los marcadores neuropatológicos de acumulación  $\alpha$ -sinucleína y los títulos de anticuerpos y afinidad. Este análisis mostró una correlación significativa entre la afinidad relativa de anticuerpo mediante inmunotransferencia y los niveles de inmunoreactividad de  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis, pero no con el número de inclusiones neuronales. De manera similar, la afinidad relativa del anticuerpo para reconocer sinapsis por ICC se correlacionó inversamente con los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en las sinapsis y se correlacionó directamente con el porcentaje de área ocupada por las terminales nerviosas marcadas con sinaptofisina, pero no con el número de inclusiones neuronales. Los niveles de reactividad de anticuerpos mediante inmunotransferencia y ICC fueron fuertemente correlacionados con los títulos de anticuerpos como se determina por ELISA. Los títulos de anticuerpos también se correlacionaron con el porcentaje de área del neuropilo etiquetado con el anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína pero no con el número de inclusiones en las neuronas (Tabla 4). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la reactividad de inmunotransferencia relativa de anticuerpos anti-humanos  $\alpha$ -sinucleína y en cierta medida los títulos ELISA de los anticuerpos se correlacionan con la reducción de la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína neuronal humana.

Los anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína anti-humanos se internalizan y se unen a las sinapsis y neuronas que contienen inclusión en ratones tg

**[0185]** Para determinar si los anticuerpos de tráfico reconocen los sitios neuronales característicos donde  $\alpha$ -sinucleína humana se acumula en el cerebro de los ratones tg, el análisis inmunocitoquímico simple y doble se realizó con anticuerpos IgG de anti-ratón caballo. Estos anticuerpos reconocen putativamente la  $\alpha$ -sinucleína anti-humana generada en los animales inmunizados pero no en los controles CFA. El microscopio digital de campo brillante de las secciones inmunomarcadas mostró que en ratones inmunizados con  $\alpha$ -sinucleína, la IgG anti-ratón biotinilada marcó difusamente cuerpos celulares neuronales y procesos neuríticos en el neuropilo. En los animales tg tratados con CFA solo hubo etiquetado leve de vasos sanguíneos y células ocasionales se asemejaron a la microglía. Experimentos de doble inmunotinción confirmaron que en los ratones vacunados, los cuerpos celulares neuronales marcados por IgG anti-ratón etiquetada por FITC representaron inmunoreactividad  $\alpha$ -sinucleína. En comparación con los ratones tg tratados con CFA solo, en ratones vacunados con  $\alpha$ -sinucleína, en algunas neuronas, la IgG anti-ratón y la inmunoreactividad  $\alpha$ -sinucleína se co-localizan en la periferia de los cuerpos celulares, en otras áreas se detectaron dos etiquetas en los procesos neuríticos y sinapsis. Además, en varias neuronas que contienen  $\alpha$ -sinucleína humana se detectaron los dos marcadores en las estructuras subcelulares granulares con un promedio de tamaño 0,4-0,8  $\mu$ m de diámetro. Experimentos adicionales de doble etiquetado mostraron que estas estructuras granulares muestran inmunoreactividad de catepsina D, lo que sugiere que los anticuerpos anti-humanos internalizados  $\alpha$ -sinucleína se hacen reaccionar con sinucleína dentro de los lisosomas. Consistente con este descubrimiento, el análisis ultraestructural mostró que en algunas de las neuronas de los ratones vacunados con  $\alpha$ -sinucleína humana, se identificaron estructuras laminadas electrodensas sugestivas de lisosomas y fagolisosomas. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la vacunación con  $\alpha$ -sinucleína humana puede promover degradación de esta molécula a través de la activación de una vía lisosomal.

EJEMPLO IX. Liquidación de agregados  $\alpha$ -sinucleína *in vivo* mediante la administración de anticuerpos  $\alpha$ -sinucleína

**[0186]** Este ejemplo demuestra la liquidación de agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína usando anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -sinucleína que reconocen las terminales  $\alpha$ -sinucleína. Los anticuerpos monoclonales se inyectaron en el neocórtex de los ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína humana y tienen agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína. Los dos anticuerpos, uno dirigido contra el extremo N-terminal y el otro dirigido contra el extremo C-terminal de  $\alpha$ -sinucleína, redujeron el número de agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína de hasta un 80% en comparación con anticuerpos de control irrelevantes (FIG. 11).

**[0187] Métodos.** Anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítomos de la molécula  $\alpha$ -sinucleína y anticuerpos de control irrelevantes, de isotipo coincidente se disolvieron en solución estéril tamponada con solución salina de fosfato tamponado (Tabla 5) para la inyección en ratones. Los animales utilizados fueron ratones transgénicos heterocigóticos de 4 a 8 meses de edad que expresan en exceso de  $\alpha$ -sinucleína humana de tipo salvaje en el cerebro bajo el control transcripcional del promotor PDGF. De 4 a 6 ratones transgénicos diferentes se utilizaron para cada uno de los anticuerpos.

Tabla 5. Anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína y controles utilizados para la inyección intracerebral en un modelo transgénico de sinucleopatía neuronal.

Anticuerpo monoclonal	Epítipo/Especificidad	Isotipo
11A5	$\alpha$ -sinucleína phospoSER129	IgG1
8A5	$\alpha$ -sinucleína C-terminal	IgG1
9G5	$\alpha$ -sinucleína 40-55	IgG1
23E8	$\alpha$ -sinucleína 40-54	IgG1
6H7	$\alpha$ -sinucleína N-terminal	IgG1
4B1	$\alpha$ -sinucleína C-terminal	IgG2a
5C12	$\alpha$ -sinucleína 109-120	IgG2b
27-1	control	IgG1
TY11-15	control	IgG2a
5B7	control	IgG2b

[0188] Para cada ratón, 2  $\mu$ l de una solución de anticuerpo 2 mg/ml se inyectaron estereotácticamente bajo anestesia en las capas profundas de la corteza cerebral parietal del hemisferio cerebral derecho (lado ipsilateral). Los hemisferios izquierdos (lado contralateral) sirvieron como un control de línea de base para cada ratón. Los sitios de inyección se suturaron y los ratones se monitorizaron hasta que se recuperaron de la anestesia. El investigador que realiza las inyecciones fue cegado en cuanto a qué anticuerpo se inyectó cada vez. Dos semanas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados siguiendo las directrices institucionales. Sus cerebros se retiraron, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 48 h, y se cortan coronalmente a 40  $\mu$ m de espesor usando un vibratoma Leica. Dos secciones por animal (alrededor del lugar de la inyección) se tiñeron por tinción con inmunoperoxidasa con un anticuerpo policlonal de  $\alpha$ -sinucleína (ELADW-47, reconociendo anticuerpo de  $\alpha$ -sinucleína 115-122). Para cada sección, agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína se contaron en 4 campos microscópicos (20x objetivo) alrededor del sitio de la inyección en el hemisferio ipsilateral, y en 4 campos correspondientes campos en el hemisferio contralateral de control. Los recuentos de agregado de  $\alpha$ -sinucleína para dos secciones se suman para cada hemisferio. Por último, para cada animal la diferencia entre el recuento total de  $\alpha$ -sinucleína entre los dos hemisferios se calculó aquí y se expresó como % de diferencia entre el hemisferio contralateral y el ipsilateral, proporcionando así una medida del efecto de anticuerpos  $\alpha$ -sinucleína en la liquidación de agregado para cada ratón individual. A las secciones se aplicó código oculto y el código se rompió cuando el análisis se había completado.

[0189] Los ratones se pueden categorizar en tres grupos basados en qué anticuerpos se inyectaron:

Grupo 1: Ratones inyectados con 11A5, 8A5 o un control IgG<sub>1</sub>.

Grupo 2: Ratones inyectados con 9G5, 23E8, 6H7, o un control IgG<sub>1</sub>.

Grupo 3: Ratones inyectados con 4B1, 5C12, un control IgG<sub>2a</sub> o IgG<sub>2b</sub>.

[0190] Resultados. Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 11 y 12. Agregados intraneuronales de  $\alpha$ -sinucleína se liquidaron por dos anticuerpos monoclonales: 8A5 (también llamado JH17.6H7) y 6H7 (también llamado JH4.8A5), 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 pendiente de patente N° 10/984192. MAb 6H7 se elevó contra  $\alpha$ -sinucleína humana recombinante expresada en E. coli y reconoce el amino-término de  $\alpha$ -sinucleínas humanas y de ratón. Se reconoce un epítipo que incluye los tres primeros aminoácidos de  $\alpha$ -sinucleína. MA b 6H7 es capaz de reconocer proteínas de fusión de sinucleína en la que la etiqueta de proteína se fusiona al extremo N-terminal de sinucleína, lo que sugiere que no se requiere (aunque puede ser preferible) un terminal de amino libre. MAb 8A5 se elevó contra sinucleínas bovinas purificadas (mezcla de  $\alpha$  y  $\beta$ ) y reconoce un epítipo en el extremo carboxi-terminal de  $\alpha$ -sinucleínas humanas y de ratón. MAb 8A5 puede unir sinucleína truncada que termina en el aminoácido 139. Los experimentos preliminares sugieren que 8A5 tiene una preferencia de 4-5 veces para sinucleína con un C-terminal libre en comparación con un C-terminal conjugado a biotina. Tanto mAb 6H7 como mAb 8A5 y también reconocen beta-sinucleína. MAb 4B1 reconoce la región C-terminal de sinucleína y se une sinucleína en transferencias de Western, pero no reconoce sinucleína en solución (es decir, mAb 4B1 no inmunoprecipita sinucleína). La Figura 12 muestra secciones del lado contralateral (panel izquierdo; puntos redondos marrón dentro de la sección son agregados  $\alpha$ ) y el lado ipsilateral (panel derecho) de un ratón inyectado con 8A5. La diferencia entre los ratones inyectados con 8A5 y los controles IgG<sub>1</sub> inyectados eran estadísticamente significativos (p < 0,05 por Kruskal-Wallis no paramétrico seguido de la prueba post-hoc de Dunn). Estos resultados indican que la orientación de  $\alpha$ -sinucleína C-terminal y/o N-terminal es terapéuticamente beneficiosa en sinucleopatías, tales como EP y DLB. La administración de otros anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína ensayados (Tabla 5, Fig 11) no resultó en la liquidación de los agregados.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0191]

<110> Elan Pharmaceuticals, Inc.  
 Regents of the University of California  
 Schenk, Dale B.  
 Masliah, Eliezer  
 5 Buttini, Manuel  
 Chilcote, Tamie  
 Rockenstein, Edward  
 Games, Dora

10 <120> PREVENTION AND TREATMENT OF SYNUCLEINOPATHIC AND AMYLOIDOGENIC DISEASE

<130> 015270-008960EP

<140> EP 06800177.5

15 <141> 2006-07-19

<150> WO PCT/US2006/028273

<151> 2006-07-19

20 <150> WO PCT/US2005/028166

<151> 2005-08-09

<150> US 11/185,907

<151> 2005-07-19

25 <160> 57

<170> PatentIn version 3.1

30 <210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 1

```

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

      Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
45          20          25          30

      Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
50          35          40          45

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

      Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
60          65          70          75          80

      Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
65          85          90          95

      Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
70          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
    
```

ES 2 625 606 T3

<210> 2  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 10           Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala  
               1                           5                                   10                                   15  
 15           Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr  
                                   20                                   25                                   30  
 20           Gly Phe Val  
                                   35  
 25           <210> 3  
               <211> 28  
               <212> PRT  
               <213> Homo sapiens  
 30           <400> 3  
 35           Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr  
               1                           5                                   10                                   15  
 40           Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser  
                                   20                                   25  
 45           <210> 4  
               <211> 13  
               <212> PRT  
               <213> Influenza virus  
 50           <400> 4  
 55           Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
               1                           5                                   10  
 60           <210> 5  
               <211> 16  
               <212> PRT  
               <213> Plasmodium sp.  
 65           <400> 5  
 70           Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val  
               1                           5                                   10                                   15  
 75           <210> 6  
               <211> 10

ES 2 625 606 T3

<212> PRT  
<213> Hepatitis B virus

<400> 6

5

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile  
1 5 10

10

15 <210> 7  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 7

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

25

Asn Glu Gly

<210> 8  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Mycobacterium bovis

<400> 8

35

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

40 <210> 9  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Clostridium tetani

45 <400> 9

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

50

<210> 10  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Clostridium tetani

<400> 10

60 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

65

ES 2 625 606 T3

<210> 11  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus  
5  
<400> 11

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

<210> 12  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
20  
<220>  
<223> Fusion protein  
  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
25 <223> X is preferably cyclohexylalanine, tyrosine or phenylalanine  
  
<400> 12

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
30 1 5 10

<210> 13  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
40  
<220>  
<223> Fusion protein  
  
<400> 13

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr  
45  
50 1 5 10

<210> 14  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
60  
<220>  
<223> Fusion protein  
  
<400> 14

Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Cys Gly  
65 1 5 10

ES 2 625 606 T3

5 <210> 15  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

10 <220>  
<223> Fusion protein

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> X is amino-heptanoic acid

15 <400> 15

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

25 <210> 16  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

30 <220>  
<223> Fusion protein

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> X is NAC peptide

35 <400> 16

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

45 <210> 17  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

50 <220>  
<223> Fusion protein

55 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> X = NAC peptide

60 <400> 17

65

ES 2 625 606 T3

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

5

Ser Ala Ser His Leu Glu  
20

10 <210> 18  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

15 <220>  
<223> Fusion protein

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
20 <222> (1) .. (1)  
<223> X = NAC peptide

<400> 18

25

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

30 <210> 19  
<211> 37  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

35 <220>  
<223> Fusion protein

<220>  
40 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> X= NAC peptide

<400> 19

45

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

50

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

55

Ala Ser His Leu Glu  
35

60

<210> 20  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

65

<220>  
<223> Fusion protein

ES 2 625 606 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X = cyclohexylalanine, tyrosine or phenylalanine  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> X= NAC peptide  
 10  
 <400> 20  
  
 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Xaa  
 1 5 10  
 15  
 <210> 21  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 20  
 <220>  
 <223> Fusion protein  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(3)  
 <223> X = NAC peptide  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> X= cyclohexylalanine, tyrosine, or phenylalanine  
 30  
 <400> 21  
 35  
 Xaa Xaa Xaa Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 40  
 <210> 22  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 45  
 <220>  
 <223> Fusion protein  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X= cyclohexylalanine, tyrosine, or phenylalanine  
 50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(17)  
 <223> X=NAC peptide  
 55  
 <400> 22  
 60  
 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 65  
 Xaa



ES 2 625 606 T3

<210> 26  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 5  
 <220>  
 <223> Fusion protein  
  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> X= NAC peptide  
  
 <220>  
 15 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> X= NAC peptide  
  
 <400> 26  
 20  
 Xaa Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Xaa  
 1 5 10 15  


---

 25  
 <210> 27  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 30  
 <220>  
 <223> Fusion protein  
  
 <220>  
 35 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(3)  
 <223> X = NAC Peptide  
  
 <400> 27  
 40  
 Xaa Xaa Xaa Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  


---

 45  
 <210> 28  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Fusion protein  
  
 <220>  
 55 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(2)  
 <223> X = NAC Peptide  
  
 <400> 28  
 60  
 Xaa Xaa Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  
 65

ES 2 625 606 T3

<210> 29  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 5  
 <220>  
 <223> Fusion protein  
  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(106)  
 <223> X = NAC peptide  
  
 <400> 29  
 15  
           Xaa Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Glu Lys  
           1                          5                          10                          15  
 20  
           Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Gln Tyr  
                           20                          25                          30  
 25  
           Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn  
                           35                          40                          45  
 30  
           Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His  
                           50                          55                          60  
 35  
           Leu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile  
           65                          70                          75                          80  
 40  
           Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg  
                           85                          90                          95  
 45  
           Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu  
                           100                          105  
 50  
 <210> 30  
 <211> 77  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 55  
 <220>  
 <223> Fusion protein  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(77)  
 <223> X = NAC peptide  
  
 <400> 30  
 60  
  
 65  
  
 70  
  
 75

ES 2 625 606 T3

5 Xaa Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
 1 5 10 15  
 Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val  
 20 25 30  
 10 Ser Ala Ser His Leu Glu Xaa Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
 35 40 45  
 15 Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp  
 50 55 60  
 20 Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Xaa  
 65 70 75

<210> 31  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 25 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Fusion protein  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> X = NAC peptide  
 35 <400> 31

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

<210> 32  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 45 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Fusion protein  
 50 <400> 32

55 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

<210> 33  
 60 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 33  
 65

ES 2 625 606 T3

5 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  
10 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr  
35 40

15 <210> 34  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
20 <223> Conjugate  
  
<400> 34

25 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

30  
20

35 <210> 35  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
40 <223> Conjugate  
  
<400> 35

45 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  
50

55 <210> 36  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Conjugate  
60 <400> 36

65

70

ES 2 625 606 T3

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

<210> 37  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Conjugate

25 <400> 37

30 Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe  
 1 5 10 15  
 35 Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
 20

<210> 38  
 <211> 20  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Conjugate

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> X= cycloheylalanine, tyrosine, or phenylalanine

50 <400> 38

55 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu  
 1 5 10 15  
 60 Phe Arg His Asp  
 20

<210> 39  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 65 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Conjugate

ES 2 625 606 T3

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (24)..(24)  
<223> X= cycloheylalanine, tyrosine, or phenylalanine  
5  
<400> 39

10 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 Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala  
20 25 30  
15 Ala Ala

20 <210> 40  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

25 <220>  
<223> Fusion protein

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> X= cycloheylalanine, tyrosine, or phenylalanine  
<400> 40

35 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu  
1 5 10 15  
40 Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg  
20 25 30  
His Asp

45 <210> 41  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

50 <220>  
<223> Fusion protein

55 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> X= cycloheylalanine, tyrosine, or phenylalanine

60 <400> 41

65 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu  
1 5 10 15  
Lys Ala Ala Ala  
20

ES 2 625 606 T3

<210> 42  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

5

<220>  
<223> Fusion protein

<400> 42

10

```
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
 1           5           10           15
```

15

```
Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
                20
```

<210> 43  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

20

<220>  
<223> Fusion protein

<400> 43

30

```
Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His
 1           5           10           15
```

35

```
Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
                20
```

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

40

<220>  
<223> Fusion protein

<400> 44

50

```
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
```

55

<210> 45  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

60

<220>  
<223> Fusion protein

<400> 45

ES 2 625 606 T3

5 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  
10 His Asp

<210> 46  
<211> 27  
15 <212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Fusion protein  
20 <400> 46

25 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  
30 20 25

<210> 47  
<211> 34  
35 <212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Fusion protein  
40 <400> 47

45 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  
50 Ala Thr

<210> 48  
<211> 27  
55 <212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Fusion protein  
60 <400> 48

ES 2 625 606 T3

5 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> Artificial Sequence

15 <220>  
<223> Fusion protein  
<400> 49

20 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  
25 20 25 30  
Val Phe Asn Val Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile  
35 40 45  
30 Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro  
50 55 60

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

40 <210> 50  
<211> 56  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

45 <220>  
<223> Fusion protein  
<400> 50

50 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala  
1 5 10 15  
55 Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly  
20 25 30  
60 Ile Thr Glu Leu Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro  
35 40 45  
65 Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu  
50 55

<210> 51  
<211> 44

ES 2 625 606 T3

<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

5 <220>  
<223> Fusion protein

<400> 51

```
10 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
15 Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
    35                    40
```

20 <210> 52  
<211> 51  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

25 <220>  
<223> Fusion protein

<400> 52

```
30 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
35 Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Asp Ala Glu Phe
    35                    40                    45
    Arg His Asp
    50
```

50 <210> 53  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Fusion protein

55 <400> 53

```
60 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
```

ES 2 625 606 T3

<210> 54  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5  
<400> 54  
  
Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr  
10 1 5 10  
  
<210> 55  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
15  
<400> 55  
20  
  
Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Cys Gly  
25 1 5 10  
  
<210> 56  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
30  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> X = amino-heptanoic acid  
35  
<400> 56  
  
Xaa Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Cys Gln Glu Gly  
40  
  
1 5 10  
45  
  
<210> 57  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
50  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1) .. (1)  
<223> ACETYLATION X= Aecylated proline  
55  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> X = Aecylated proline  
60  
<400> 57  
65



**Reivindicaciones**

- 5 1. Un anticuerpo que se une a la sinucleína alfa humana para su uso en efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad de cuerpos de Lewy, en el que el anticuerpo es: el anticuerpo 8A5 monoclonal producido por el hibridoma designado ATCC número de acceso PTA-6909; una forma quimérica del anticuerpo 8A5; o una versión humanizada del anticuerpo 8A5 que comprende las CDR procedentes del anticuerpo 8A5.
- 10 2. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG1 humano.
- 15 3. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo se administra a una dosis de 1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal de anticuerpos.
- 20 4. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo se administra en múltiples dosis durante al menos seis meses.
- 25 5. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo se administra por vía intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosa.
- 30 6. Una célula del hibridoma designada ATCC número de acceso PTA-6909.
- 35 7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo quimérico o humanizado como se define en la reivindicación 1.
- 40 8. Un método de humanizar el anticuerpo monoclonal 8A5 producido por el hibridoma que tiene el número de acceso ATCC PTA-6909, que comprende:  
 la determinación de la secuencia de aminoácidos de las CDR del anticuerpo monoclonal;  
 seleccionar un anticuerpo aceptor; y  
 producir un anticuerpo humanizado que comprende las CDR de anticuerpo monoclonal y la región variable de marco funciona desde el anticuerpo aceptor,  
 opcionalmente en el que el método comprende además la sustitución de un residuo de marco de región variable humana seleccionada con un marco aminoácido equivalente del anticuerpo 8A5 cuando el aminoácido (1) se une de forma no covalente al antígeno directamente, (2) es adyacente a una región CDR del anticuerpo, (3) de otro modo interactúa con una región CDR del anticuerpo, o (4) participa en la interfaz VL-VH, o la sustitución de un aminoácido de marco humano que es inusual para una inmunoglobulina humana en esa posición con un aminoácido de la posición equivalente del anticuerpo 8A5 o desde la posición equivalente de una inmunoglobulina humana más típica.
- 45 9. Un método para producir una forma quimérica del anticuerpo monoclonal 8A5 producido por el hibridoma que tiene el número de acceso ATCC PTA-6909, que comprende:  
 la determinación de la secuencia de aminoácidos de las regiones de luz y variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal; la selección de región constante de cadena pesada y ligera;  
 producir un anticuerpo quimérico que comprende una cadena ligera que comprende la región variable de cadena ligera fusionada a la región constante de cadena ligera y una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada fusionada a la región constante de cadena pesada.
- 50 10. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad es la enfermedad de Parkinson

Residuo # 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55  
 (SEQ ID NO:1) MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAE

Residuo # 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110  
 (SEQ ID NO:1) KTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQE

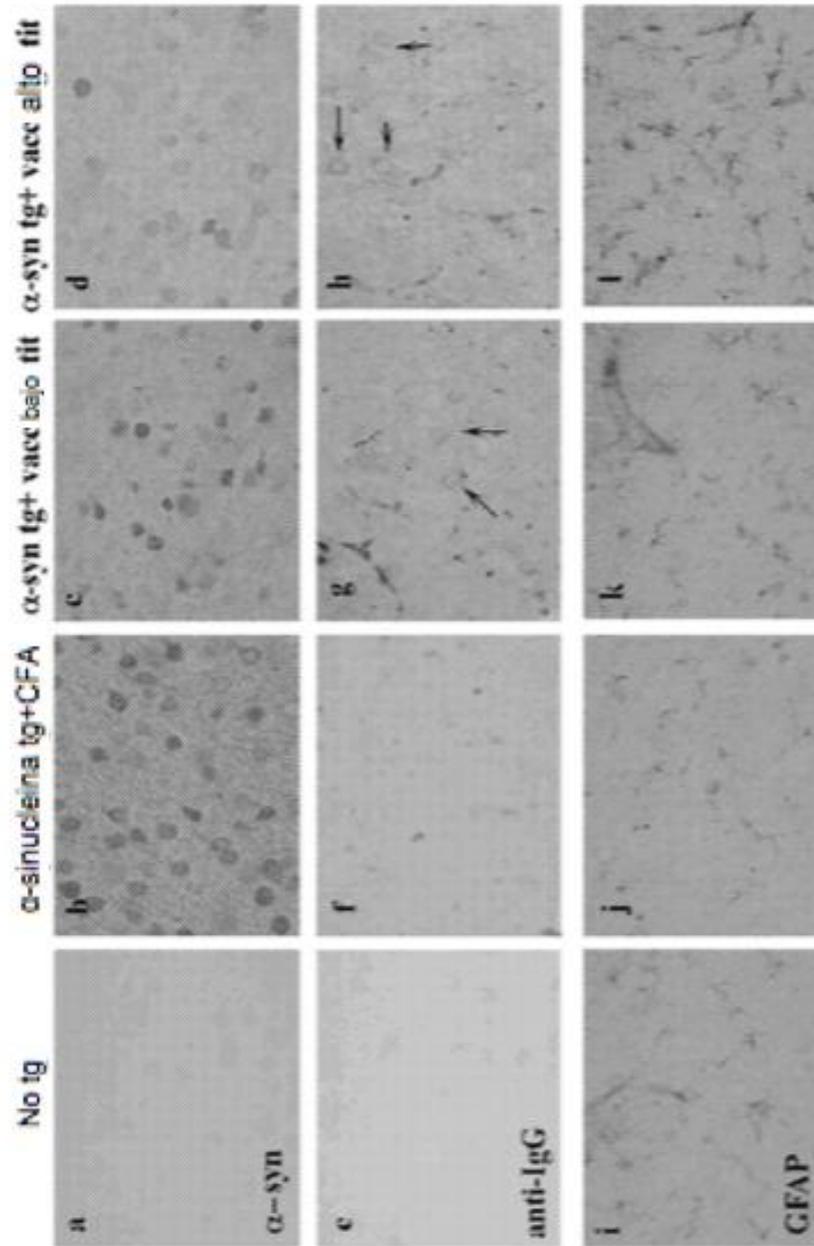
(SEQ ID NO:2) EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV (residuos 61-95)

(SEQ ID NO:3) KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (residuos 60-87)

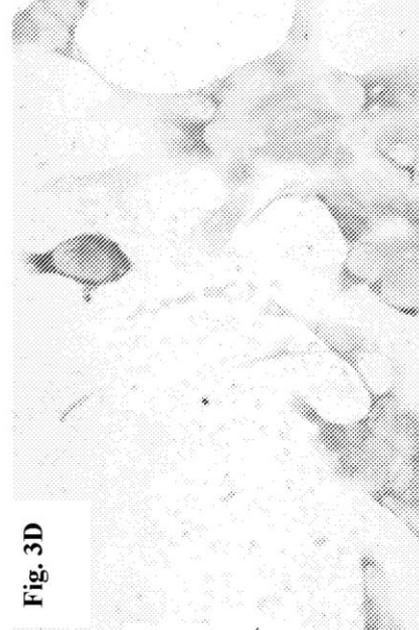
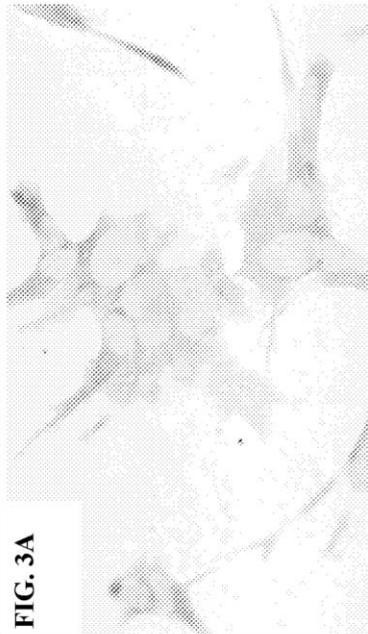
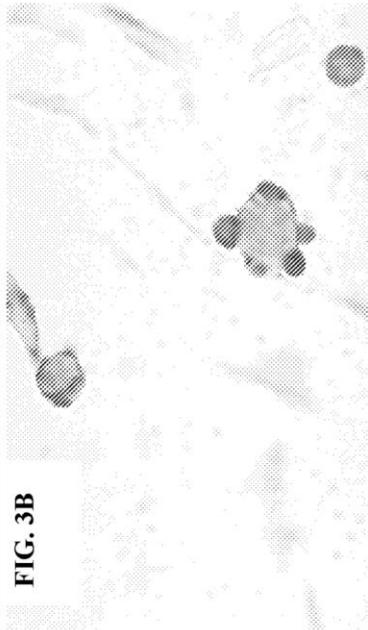
Residuo # 115 120 125 130 135 140  
 (SEQ ID NO:1) GILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (residuos 1-140)

**Fig. 1**

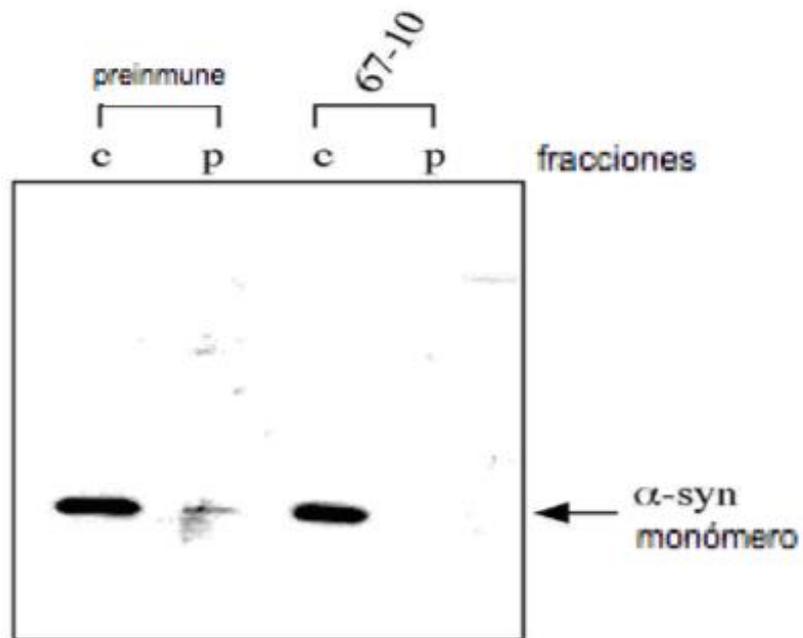
Inmunización  $\alpha$ -sinucleína reduce la formación SYN (+) inclusiones



**Fig. 2**



**FIG. 3**

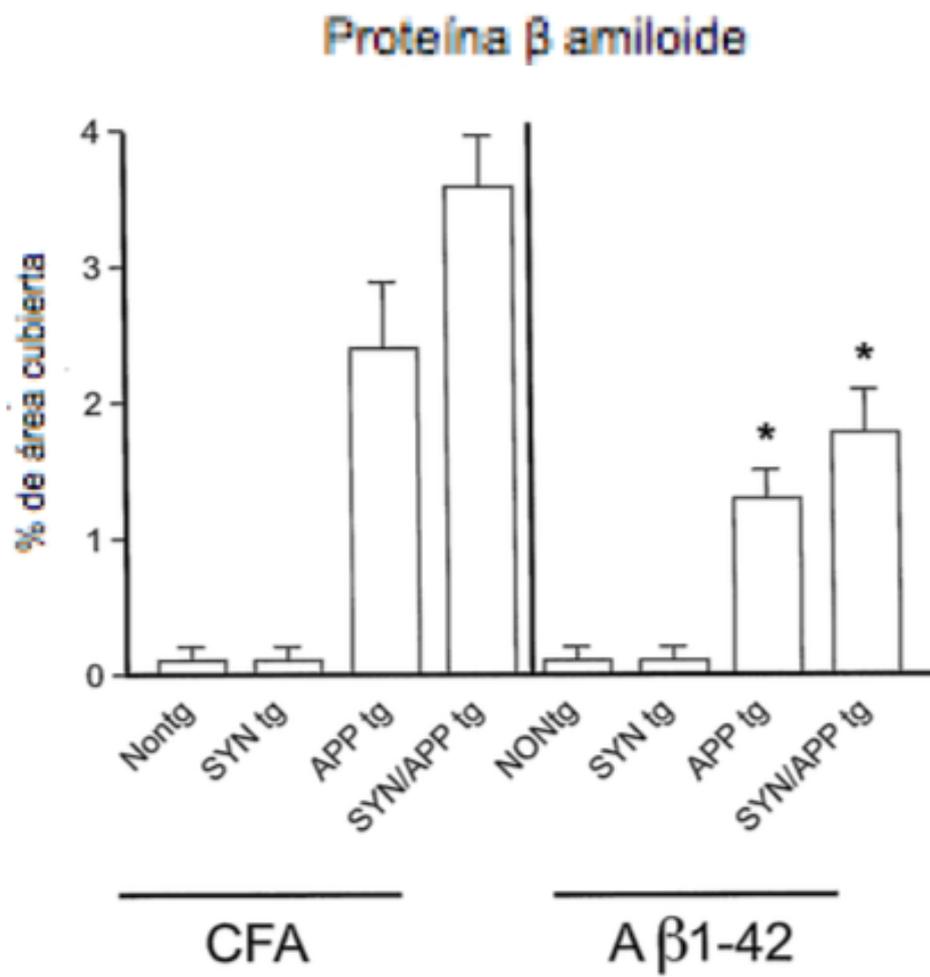


Células de sobreexpresión de GT1-7  $\alpha$ -syn se incubaron con suero  $\alpha$ -syn anti-ratón o suero preimmune (1:50) durante 48 h.

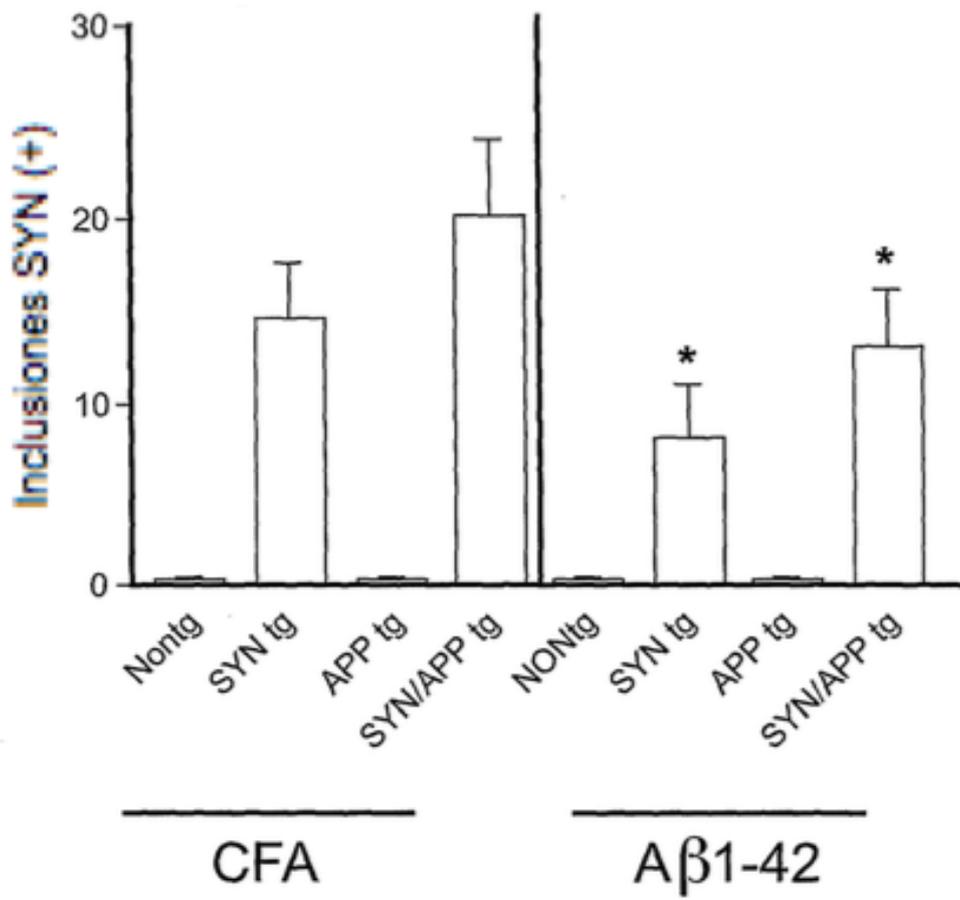
-Resultado-

1. Proliferación celular se suprimió ligeramente en las células tratadas con suero  $\alpha$ -syn anti-ratón (67-10) comparadas a las células tratadas con suero preimmune (no mostradas)
2. En las células tratadas con suero  $\alpha$ -syn anti-ratón, la inmunoreactividad de  $\alpha$ -syn se disminuyó en la fracción particulada.

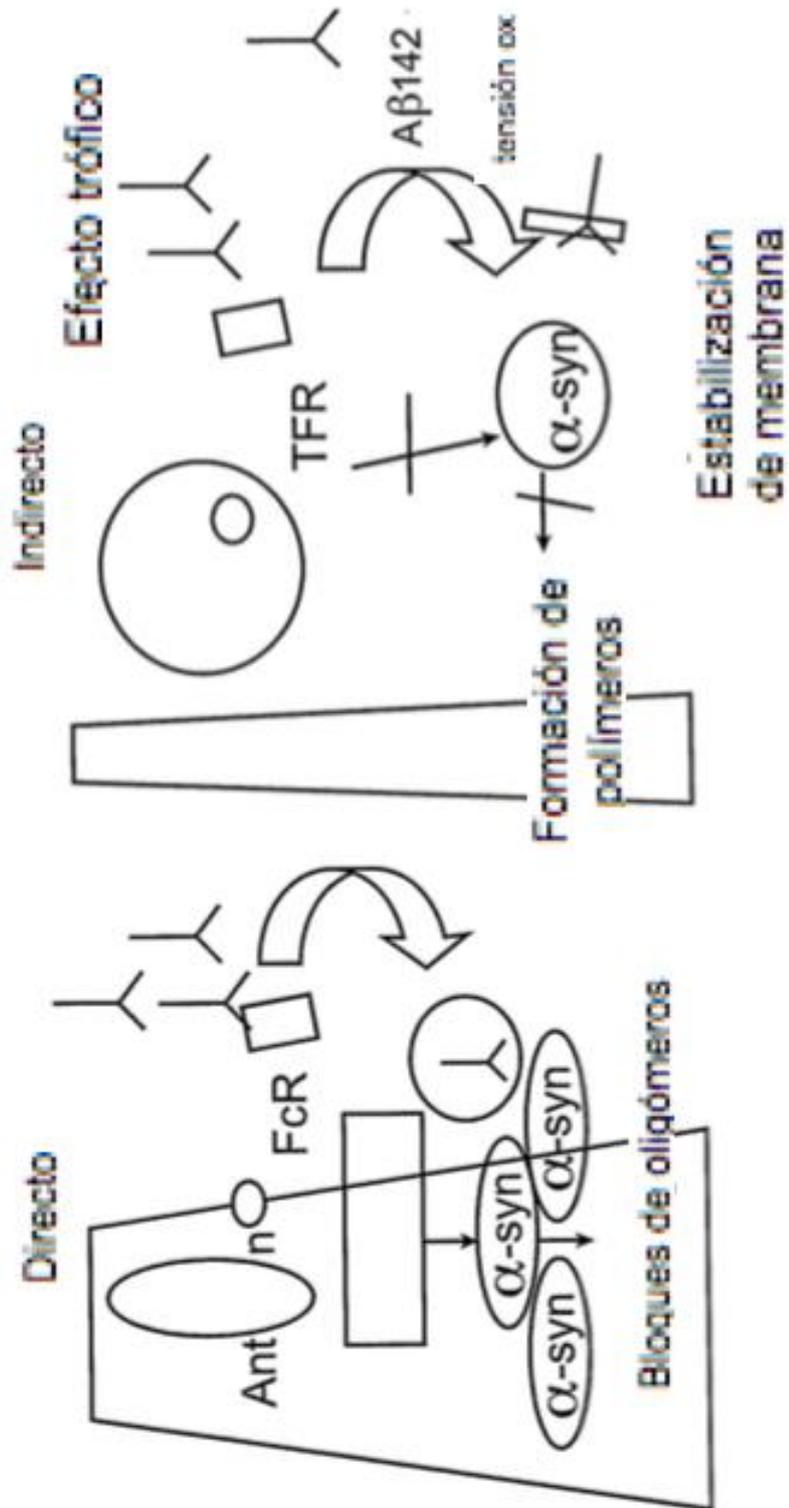
**Fig. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**

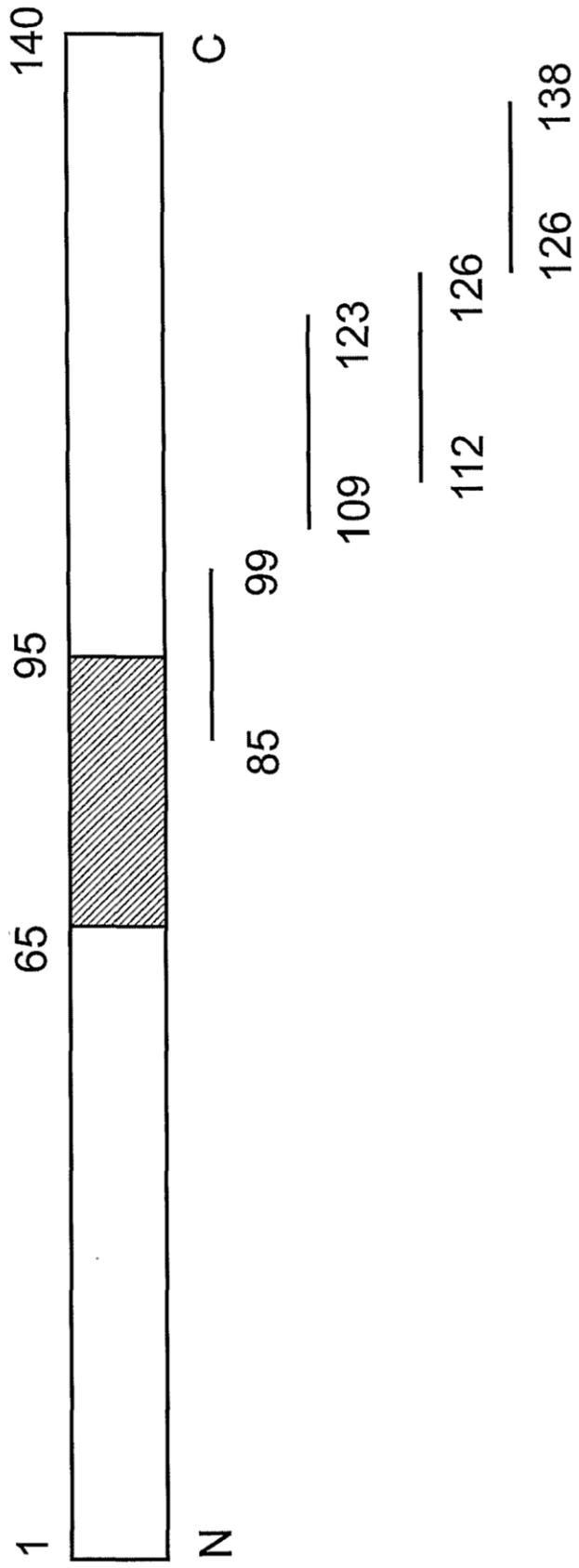


FIG. 8

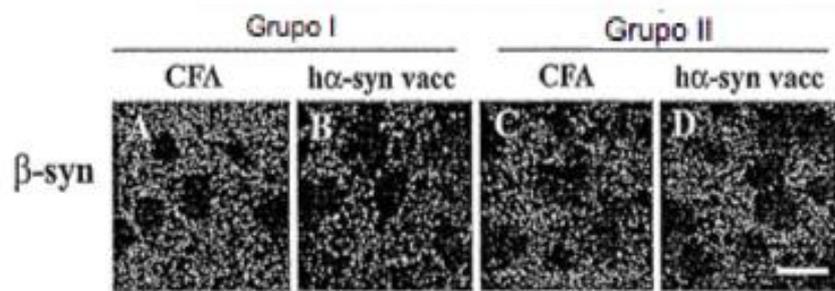


Fig. 9

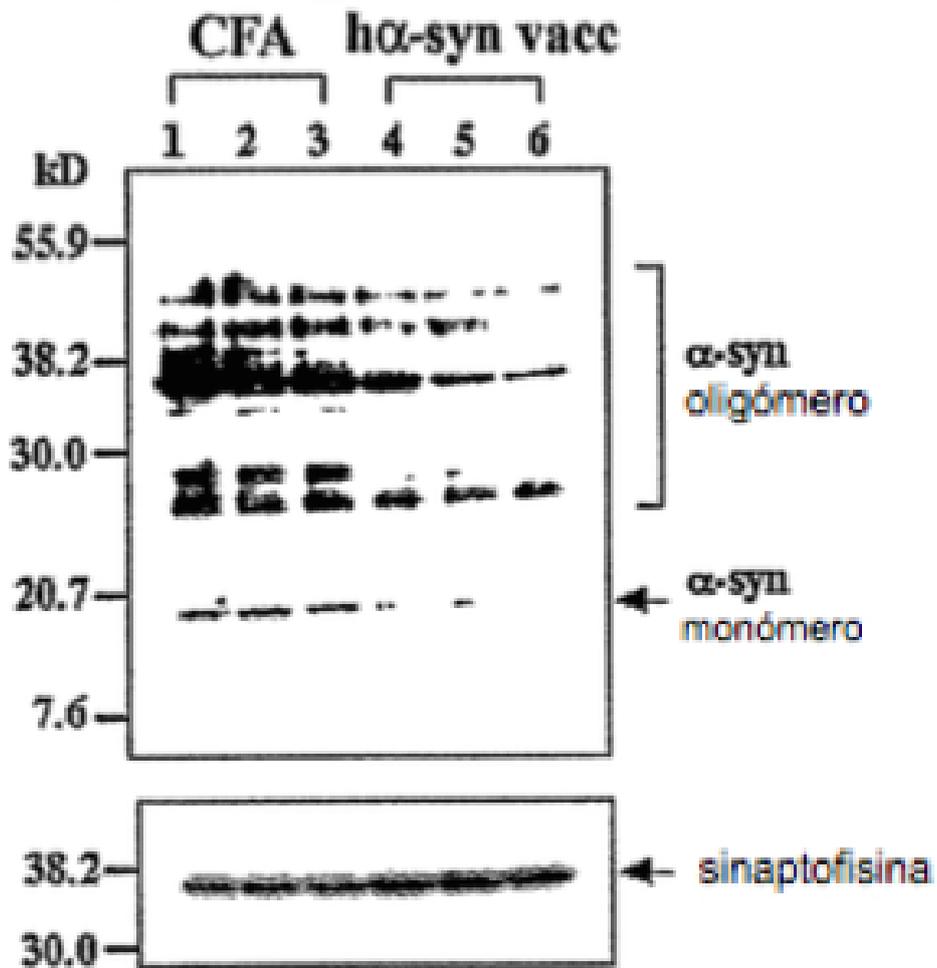


Fig. 10

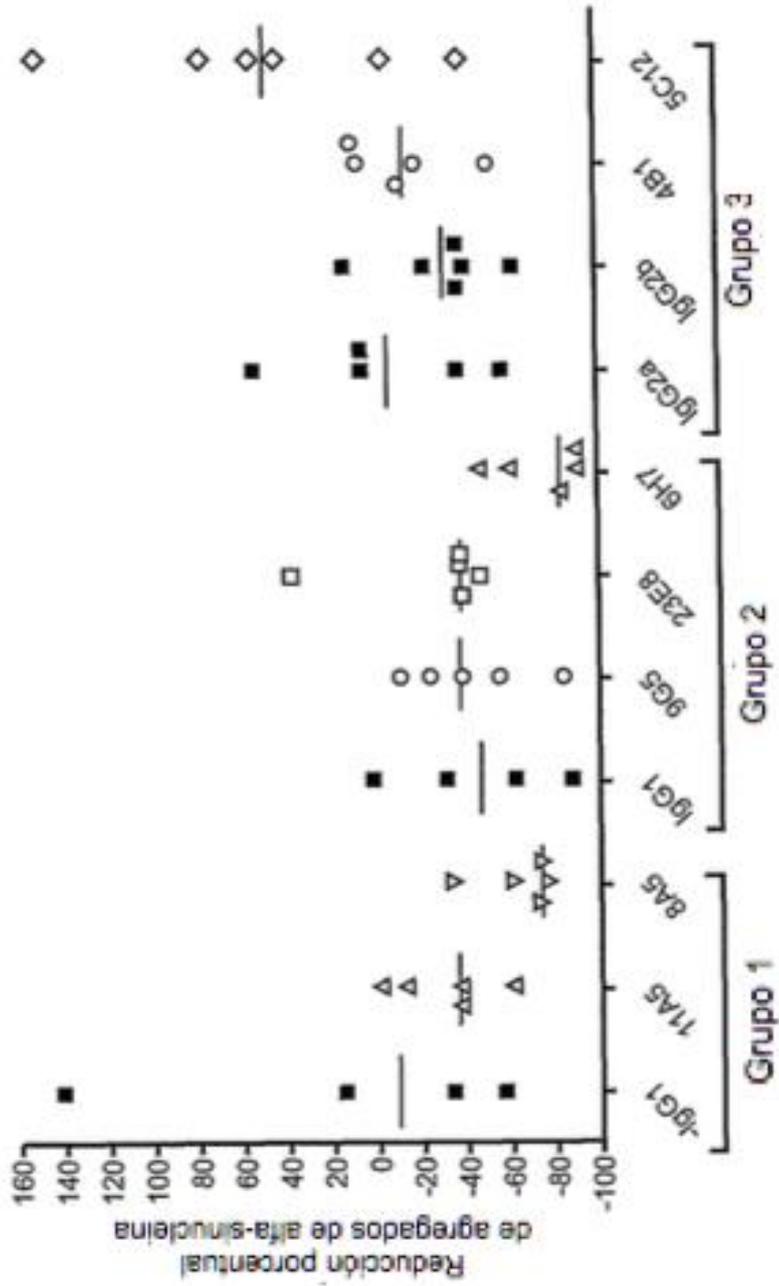


FIG. 11

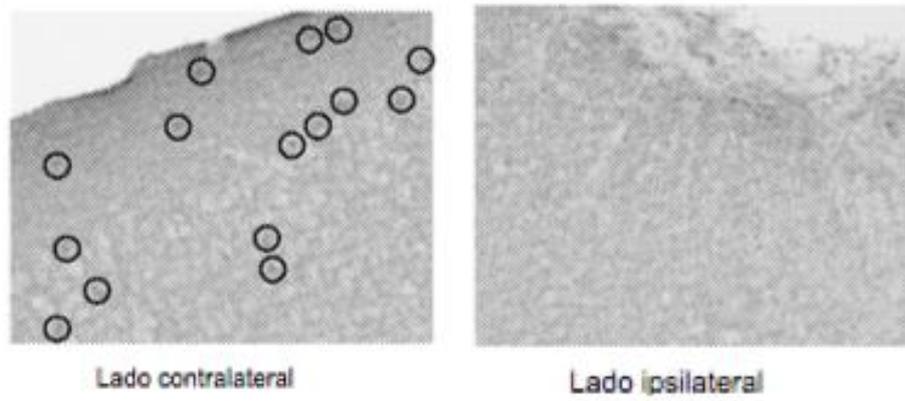


Figura 12