

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 216**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2004** **E 10189868 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017** **EP 2361928**

54 Título: **Fragmentos truncados de la alfa-sinucleína en la enfermedad de cuerpos de Lewy**

30 Prioridad:

19.05.2003 US 471929 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.09.2017

73 Titular/es:

PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (50.0%)
Adelphi Plaza, Upper George's Street, Dun
Laoghaire
Co. Dublin A96 T927, IE y
THE FLINDERS UNIVERSITY OF SOUTH
AUSTRALIA (50.0%)

72 Inventor/es:

CHILCOTE, TAMIE J.;
GOLDSTEIN, JASON;
GAI, WEI PING y
ANDERSON, JOHN P.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 632 216 T3

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

Fragmentos truncados de la alfa-sinucleína en la enfermedad de cuerpos de Lewy**Descripción****FONDO**

[0001] Enfermedades con cuerpos de Lewy (LBD) se caracterizan por la degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deterioro cognitivo, y la 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). Los LBD incluyen la enfermedad de Parkinson, la enfermedad corporal de Lewy difusa (EDCL), la variante del cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV) y la enfermedad de Alzheimer (AD) combinada. Demencia con cuerpos de Lewy (DLB) es un término para conciliar diferencias en la terminología de LBDs. Los trastornos con LBs continúan siendo una causa común de trastornos del movimiento y deterioro cognitivo en la población envejecida (Galasko et al., Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias. Arch. Neurol. (1994) 51:888-95). Aunque su incidencia sigue aumentando la creación de un grave problema de salud pública, estos trastornos siguen careciendo de tratamientos aprobados (Tanner et al., Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes, Curr. Opin. Neurol. (2000) 13:427-30). La causa de LBD es polémica y múltiples factores se han propuesto para desempeñar un papel, incluyendo diversas neurotoxinas y factores de susceptibilidad genética.

[0002] AD, PD, y EDCL son los trastornos neurodegenerativos más comunes en los ancianos. Recientes estudios epidemiológicos han demostrado una estrecha relación clínica entre la EA y la 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 AD son, por tanto, más propensos a desarrollar PD concomitante. Además, los pacientes con DP que se convierten en demenciales generalmente han desarrollado AD clásica. Aunque cada enfermedad neurodegenerativa parece tener una predilección por las regiones específicas del cerebro y las poblaciones celulares, resultando en características patológicas distintas, PD, AD y EDCL también comparten características patológicas comunes. Los pacientes con AD familiar, síndrome de Down, o AD 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 interurales 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. Estudios bioquímicos han confirmado un vínculo entre AD, PD y DLB.

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

[0004] Las placas neuríticas que son el sello patológico clásico de AD consisten esencialmente de péptido de beta amiloide (A β), un producto proteolítico de aminoácidos de la proteína precursora amiloide (APP), y NAC, un fragmento proteolítico de 35 aminoácidos de Alfa-sinucleína. Tanto A β 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. (Iwai A., Biochim Biophys Acta (2000) 1502: 95-109); Masliah et al., AM. J. Pathol (1996) 148: 201-10; Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1993) 90: 11282-6).

[0005] Alfa-sinucleína es parte de una gran familia de proteínas que incluyen beta- y gamma-sinucleína y sinoretina. La alfa-sinucleína se expresa en el estado normal asociado con las sinapsis y se cree que desempeña un papel en la plasticidad neural, el aprendizaje y la memoria. Se han identificado mutaciones en la alfa-sinucleína humana (h) que mejoran la agregación de alfa-sinucleína (Ala30Pro y Ala53Thr) y se asocian con formas raras de formas autosómicas dominantes de la DP. El mecanismo por el cual estas mutaciones aumentan la propensión de la alfa-sinucleína al agregado es desconocido.

RESUMEN DE LA INVENCION REIVINDICADA

[0006] La invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento 1-122 o 1-119 de la alfa-sinucleína, sin unirse específicamente a de longitud completa alfa-sinucleína como se define en SEQ ID nº 1, o un fragmento que induce este anticuerpo en el que el fragmento que induce el anticuerpo tiene menos de 20

aminoácidos de alfa-sinucleína e incluye el extremo C del fragmento 1-122 o 1-119 de alfa-sinucleína.

[0007] La invención también proporciona un fragmento de longitud completa alfa-sinucleína como se define en SEQ ID nº 1, que es alfa sinucleína 1-122 o 1-119. El fragmento de alfa-sinucleína puede tener una mutación asociada con una Enfermedad de Cuerpo de Lewy hereditaria (LBD), opcionalmente una mutación A53T.

[0008] La invención proporciona además métodos *in vitro* de cribado de un agente que tiene una actividad farmacológica útil para tratar una enfermedad del cuerpo de Lewy (LBD), que comprende poner en contacto el agente con un fragmento de alfa-sinucleína 1-122 o 1-119 de la invención; y determinar la velocidad o extensión de agregación del fragmento de alfa-sinucleína, en el que una reducción en la velocidad o extensión de la agregación con relación a un control que carece del agente indica que el agente tiene la actividad farmacológica.

[0009] La invención proporciona además métodos *in vitro* de cribado de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de un LBD (por ejemplo, enfermedad de Parkinson o EDCL), comprende poner en contacto una célula que expresa la alfa-sinucleína y procesamiento de la alfa-sinucleína en una alfa-sinucleína 1-122 o 1-119 de la invención con un agente. A continuación, se determina un nivel del fragmento en la célula con respecto a un nivel basal en el mismo tipo de célula en ausencia del agente, una reducción en el nivel del fragmento con respecto a la línea base indicando que el agente tiene la actividad farmacológica útil en el tratamiento de un LBD. La célula puede ser una célula humana, una célula neuronal o una célula dopaminérgica. Opcionalmente, la célula es una célula PC 12 o Sy5Y.

[0010] La invención proporciona además procedimientos de cribado de un agente que tiene una actividad farmacológica útil para el tratamiento de un LBD (por ejemplo, enfermedad de Parkinson o EDCL), que comprende poner en contacto un animal transgénico no humano que expresa una alfa-sinucleína 1-122 o 1-119 de la invención con el agente; y determinar un nivel de formas agregadas del fragmento en el cerebro del animal transgénico con respecto a un nivel basal de formas agregadas del fragmento en un animal transgénico comparable en ausencia del agente, una reducción en el nivel del fragmento de formas agregadas con respecto a la línea de base indicando que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de un LBD. Opcionalmente, el animal transgénico es un roedor. El animal transgénico también puede ser una *Drosophila*.

[0011] La invención proporciona además procedimientos de cribado de un agente para una actividad farmacológica útil para el tratamiento de un LBD (por ejemplo, enfermedad de Parkinson o EDCL), comprende poner en contacto un animal transgénico no humano que tiene un transgén que expresa alfa-sinucleína y el procesamiento de la alfa-sinucleína en un fragmento alfa-sinucleína 1-122 o 1-119 de la invención con un agente; y la determinación de un nivel del fragmento en una célula neuronal con respecto a un nivel basal en ausencia del agente, una reducción en el nivel de los fragmentos con respecto a la línea base que indica el agente tiene la actividad farmacológica útil para tratar la LBD. Opcionalmente, el animal transgénico es un roedor, ratón o *Drosophila*.

[0012] La invención proporciona además un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén que comprende un promotor unido operativamente a un segmento de ácido nucleico que codifica un fragmento alfa-sinucleína 1-122 o 1-119 de la invención; donde la expresión del fragmento en el animal transgénico dispone al animal para desarrollar al menos una característica de un LBD. Opcionalmente, el promotor es un promotor de PDGF. Opcionalmente, al menos una característica es un deterioro de la función motora. Opcionalmente, al menos una característica del animal transgénico es un deterioro de la función cognitiva. Opcionalmente, el animal transgénico es un roedor, ratón o *Drosophila*.

[0013] La invención proporciona además métodos *in vitro* para detectar la presencia o la susceptibilidad a un LBD en un paciente, que comprende detectar un nivel de fragmento de alfa-sinucleína 1-122 o 1-119 de la invención en una muestra de líquido cefalorraquídeo, un nivel más alto que un nivel basal en individuos no inducidos que indican presencia o susceptibilidad a LBD.

[0014] Como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento de la alfa-sinucleína. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado, quimérico. Opcionalmente, el anticuerpo es monoclonal. Opcionalmente, el anticuerpo tiene isotipo humano IgG1.

[0015] El anticuerpo puede ser para uso en el diagnóstico de la presencia o la susceptibilidad a una LBD, en el que el anticuerpo es para ser administrado a un paciente y el nivel de unión del anticuerpo en los pacientes se va a determinar, en el que un nivel más alto de unión relativo a un nivel de línea de base en individuos no inducidos indica la presencia o susceptibilidad al LBD.

[0016] El fragmento de alfa sinucleína 1-122 o 1-119 de la invención puede ser para uso en un método de efectuar el tratamiento o profilaxis de una LBD, que comprende administrar a un paciente que padece o está en riesgo de un LBD, un régimen eficaz del fragmento de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el método comprende además administrar un adyuvante que aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos para el fragmento. Opcionalmente, el fragmento está unido a un portador que forma una proteína de fusión, en el que el soporte aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos del fragmento.

[0017] El anticuerpo de la invención puede ser para uso en un método de efectuar el tratamiento o profilaxis de una LBD. El método implica la administración a un paciente que sufre o está en riesgo de un LBD de un régimen eficaz del anticuerpo, por lo que el anticuerpo efectúa la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad.

[0018] La invención proporciona además un método de cribado para una proteasa que escinde alfa-sinucleína intacta para formar un fragmento de la alfa-sinucleína 1-122 o 1-119, que comprende la identificación de un inhibidor de la proteasa; poniendo en contacto el inhibidor con un extracto celular o tejido que contiene la proteasa, con lo que la proteasa se une al inhibidor; y liberar la proteasa del inhibidor. Opcionalmente, el inhibidor es un péptido de alfa-sinucleína que comprende un segmento contiguo de al menos 5 residuos de alfa-sinucleína intacta entre las posiciones 115 y 130. Opcionalmente, el péptido comprende un segmento contiguo de al menos 5 residuos entre las posiciones 118 y 122. Opcionalmente, al menos uno de los residuos es un análogo del estado de transición.

[0019] La presente divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 109-120 de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal es quimérico, humanizado o humano.

[0020] La presente divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 115-123 de alfa-sinucleína.

[0021] La presente divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo discontinuo dentro de los residuos 43 - 51 y 58 - 65 de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el anticuerpo es quimérico, humanizado o humano.

[0022] La presente divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal específico de extremo que se une específicamente a alfa-sinucleína de longitud completa aislada que tiene un C-terminal libre sin unirse específicamente a una proteína de fusión que comprende alfa-sinucleína que tiene un extremo C-terminal unido a un segundo polipéptido. Opcionalmente, el anticuerpo es quimérico, humanizado o humano.

[0023] La descripción proporciona además métodos de detección de presencia o la susceptibilidad a una enfermedad de cuerpos de Lewy en un paciente. Los métodos implican la determinación de un nivel de alfa-sinucleína fosforilada o nitrada en la posición 125 de alfa-sinucleína en una muestra de un cerebro del paciente, un nivel elevado relativo al nivel medio en una población de individuos no inducidos indicando que el paciente tiene o es susceptible a una enfermedad del cuerpo de Lewy.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0024]

Figs. 1A y B muestran una transferencia Western de diversos extractos de la corteza y el hipocampo de un ratón transgénico (B) y un control emparejado (A) con un anticuerpo policlonal que se une a un epítipo dentro de SN115-122.

Fig. 2 muestra una transferencia de Western con el mismo anticuerpo que las Figs. 1A y B para comparar el nivel de la forma truncada de alfa-sinucleína en extracciones de Triton-X100 de la corteza y ratones hipocampo de 3 meses y 12 meses de edad.

Figs. 3A y B muestran una transferencia de Western con un anticuerpo diferente denominado 12C1 (una unión monoclonal al epítipo en los aminoácidos 43-51 y 58-65) de un extractos de Triton del cerebro de un ratón transgénico de tres meses de edad (B) en comparación con un (A).

Fig. 4 muestra una transferencia Western adicional usando el mismo anticuerpo que la Fig. 3 sobre un extracto de Triton del cerebro de ratones transgénicos de tres y doce meses de edad.

Figs. 5A, B, C, D, E muestran transferencias de Western con cuatro anticuerpos diferentes (B, C, D, E) y un mapa de epítipos (A) de los sitios de unión de los anticuerpos a diversos extractos de los cerebros de ratones transgénicos.

Figs. 6A, B, C muestran extractos de Tris del cerebro de un paciente con enfermedad corporal de Lewy sondado con tres anticuerpos diferentes (A, B, C), sometidos a electroforesis en gel 2-D y sometido a transferencia Western.

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

Fig. 8 resume los sitios de escisión en relación con los epítipos unidos por los anticuerpos utilizados en transferencia Western.

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

5 Figs. 10A, B, C, D muestran las inmunotransferencias de proteínas procedentes de cuerpos de Lewy reprobados con diversos anticuerpos C-terminales.

Fig. 11 muestra transferencias de Western de diversos extractos de un paciente de Contursi no curado y sondado con un anticuerpo que reconoce alfa sinucleína total o específico para alfa-sinucleína fosfo-129.

10

DEFINICIONES

15 **[0025]** El término "agente" se utiliza para describir un compuesto que tiene o puede tener una actividad farmacológica. Los agentes incluyen compuestos que son fármacos conocidos, compuestos para los que se ha identificado actividad farmacológica pero que están experimentando una evaluación terapéutica adicional, y compuestos que son miembros de colecciones y bibliotecas que han de ser seleccionados para una actividad farmacológica.

20 **[0026]** Una actividad "farmacológica" significa que un agente exhibe una actividad en un sistema de cribado que indica que el agente es o puede ser útil en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad. El sistema de cribado puede ser in vitro, celular, animal o humano. Los agentes se pueden describir por tener actividad farmacológica a pesar de que pueden requerirse pruebas adicionales para establecer la utilidad profiláctica o terapéutica real en el tratamiento de una enfermedad.

25 **[0027]** En el contexto de determinaciones del peso molecular basado en electroforesis en gel, el término "aproximadamente" indica la desviación estándar de peso molecular esperado debido a un error experimental en repeticiones del método en las mismas condiciones. La determinación del peso molecular de 12 kDa para ciertos fragmentos de alfa-sinucleína se aplica a determinaciones que utilizan un tampón de trycine.

30 **[0028]** La frase "se une específicamente" se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en la presencia de una población heterogénea de proteínas y otros biológicos. Así, bajo condiciones designadas, un ligando especificado se une preferentemente a una proteína particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. Una molécula tal como un anticuerpo que se une específicamente a una proteína a menudo tiene una constante de asociación de al menos 10^6 M^{-1} o 10^7 M^{-1} ,
35 preferiblemente 10^8 M^{-1} a 10^9 M^{-1} , y más preferiblemente, aproximadamente 10^{10} M^{-1} a 10^{11} M^{-1} o superior. Puede usarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan 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
40 descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden utilizar para determinar la inmunorreactividad específica.

[0029] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la que las secuencias de prueba se comparan. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las
45 secuencias de prueba y de referencia se introducen en una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros de programa designados.

50 **[0030]** 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), por 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. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444-(1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software Genético de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr, Madison, WI), o mediante inspección visual (véase generalmente Ausubel *et al.*, *supra*).

60 **[0031]** Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de 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 Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación T de umbral de valor positivo T cuando están alineadas con una palabra
65 de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, *Supra.*). Estas palabra iniciales actúan como semillas para comenzar las búsquedas para

encontrar HSPs más largos que las contienen. Los golpes de palabra se extienden entonces en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia, en la medida en que la puntuación de alineación acumulativa puede aumentarse. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes, siempre > 0) y N (puntuación de penalización para los residuos que no coinciden, siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los golpes de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye por la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada va a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuo de puntuación negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Para identificar si un ácido nucleico o polipéptido está dentro del alcance de la invención, los parámetros por defecto de los programas BLAST son adecuados. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62. El programa TBLASTN (utilizando la secuencia de proteínas para la secuencia de nucleótidos) utiliza como defectos una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y una matriz de puntuación BLOSUM 62. (Véase Henikoff y Henikoff, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

[0032] Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, *por ejemplo*, Karlin y Altschul, Proc Nat'l Acad Sci EE.UU. 90: 5.873-5.787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que una coincidencia entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01 y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,001.

[0033] 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 hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de las cadenas): gly, pro; y el Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservadoras implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservadoras constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otro.

[0034] Los agentes terapéuticos de la invención son típicamente sustancialmente puros a partir de contaminante no deseado. Esto significa que un agente tiene típicamente al menos aproximadamente 50% p/p (peso/peso) de pureza, así como está sustancialmente exento de proteínas y contaminantes que interfieren. A veces los agentes son al menos aproximadamente 80% p/p y, más preferiblemente al menos 90 o aproximadamente 95% p/p de pureza. Sin embargo, usando técnicas convencionales de purificación de proteínas, pueden obtenerse péptidos homogéneos de al menos 99% p/p.

[0035] El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se usa para incluir anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que derivan para la unión específica a un fragmento de antígeno que incluye cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras Fab, Fab' F(ab')₂, 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 están químicamente conjugadas o expresadas 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 diferentes de cadena pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una diversidad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la 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).

[0036] 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 inmune mediante varios mecanismos, incluyendo reclutamiento de linfocitos, estimulación de células B y/o T y estimulación de macrófagos.

[0037] El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento ya sea profiláctico o terapéutico.

[0038] 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 la alfa-sinucleína. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de 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)); biotina-avidina directa en fase sólida EIA

(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 de 1-125 (véase Morel et al, Molec Immunol 25 (1): 7-15 (1988)); EIA de biotina - avidina directa en fase sólida (Cheung et al., Virology 176: 546 - 552- (1990)); y RIA marcado directamente (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol., 32: 77 - 82 (1990)). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estas, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie o células sólidas en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Por lo general, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados mediante ensayo de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente proximal al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que se produzca impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 50 ó 75%.

[0039] Coordenadas de epítipo son (\pm 2 aminoácidos) aproximados. No todos los aminoácidos dentro de un epítipo se requieren necesariamente para la unión.

[0040] Las composiciones o métodos "que comprenden" uno o más elementos recitados pueden incluir otros elementos no específicamente indicados. Por ejemplo, una composición que comprende péptido de alfa-sinucleína abarca tanto un péptido de alfa-sinucleína aislado como un péptido de alfa-sinucleína como un componente de una secuencia de polipéptido más grande.

[0041] A menos que de otro modo evidente por el contexto, cada forma de realización, elemento, etapa o característica de la invención se puede utilizar en combinación con cualquier otro.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

I. General

[0042] La invención se basa en parte en la identificación de nuevos fragmentos de alfa-sinucleína en pacientes con Enfermedad de Cuerpos de Lewy (LBD) y modelos de animales transgénicos de la misma. Estas enfermedades se caracterizan por agregaciones de alfa-sinucleína. Los fragmentos tienen un terminal C truncado en relación con la alfa-sinucleína de longitud completa. Algunos fragmentos se caracterizan por un peso molecular de aproximadamente 12 kDa determinado por electroforesis en gel de SDS en tampón de tricina y un truncamiento de al menos diez aminoácidos contiguos a partir del extremo C de la alfa-sinucleína natural. El sitio de escisión se produce preferiblemente después del residuo 117 y antes del residuo 126 de alfa-sinucleína natural. La identificación de estos nuevos fragmentos de alfa-sinucleína tiene una serie de aplicaciones en, por ejemplo, descubrimiento de fármacos, diagnóstico, terapéutica y animales transgénicos.

[0043] La invención proporciona varios métodos para los agentes de detección de la actividad útil en el tratamiento de LBD. Algunos métodos identifican agentes que inhiben la reacción de escisión que genera los nuevos fragmentos de la invención. Otros métodos identifican agentes que inhiben la agregación de los productos de la reacción de escisión. Tales inhibidores son útiles para el tratamiento de LBD. Los inhibidores de la reacción de escisión son también útiles para la purificación por afinidad de la proteasa responsable de la reacción de escisión.

[0044] También descritos aquí son modelos de animales transgénicos y células que expresan fragmentos de alfa-sinucleína como se describe anteriormente. Los modelos y células animales transgénicas están dispuestas para desarrollar características de enfermedad de cuerpos de Lewy, incluyendo cuerpos de Lewy que contienen agregaciones de los fragmentos. Los modelos animales y las células se pueden utilizar en los métodos de cribado descritos anteriormente.

[0045] Se proporcionan además anticuerpos específicos de gama que se unen específicamente a fragmentos de alfa-sinucleína sin unirse específicamente a alfa-sinucleína intacta per se. Estos anticuerpos son útiles para la formación de imágenes in vivo de agregaciones de alfa-sinucleína y también en métodos de tratamiento. Los nuevos fragmentos de alfa-sinucleína también pueden usarse en procedimientos de tratamiento, opcionalmente, en combinación con un adyuvante.

II. Fragmentos de alfa-sinucleína

[0046] Alfa-sinucleína humana es un péptido de 140 aminoácidos que tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH
 5 GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA
 (SEQ ID NO:1)

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

15 **[0047]** Algunos fragmentos novedosos descritos en este documento tienen truncamientos C-terminales de al menos diez aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos 15 aminoácidos contiguos y, opcionalmente, de hasta 20, 22, 23 o 25 aminoácidos. Los fragmentos incluyen todos o sustancialmente todos (es decir, al menos 100 residuos contiguos de alfa-sinucleína distintos de la delección). Algunos fragmentos también tienen truncamientos relativamente cortos en el extremo N de hasta 20 aminoácidos, tales como delecciones de los restos 1-4, 1-6, 1-10 y 1-12. Algunos fragmentos tienen delecciones N-terminales de los restos 1-23, 1-38 o 1-45. Los fragmentos preferidos de la descripción son SN1-118, SN1-119, SN1-120, SN1-121, SN1-122, SN1-123, SN1-124, SN1-125, SN1-126, SN1-127, SN1-128, SN1-129 y SN1-130. Los fragmentos particularmente preferidos de la descripción son SN1-119, SN1-120, SN1-121, SN1-122, SN1-123, SN1-124 y SN1-125. Un fragmento especialmente preferido es SN1-119. La reacción de escisión se produce preferiblemente en un enlace peptídico entre los residuos de aminoácidos 118 y 126, por ejemplo, entre el residuo 119 y 120. Otros fragmentos de la descripción incluyen fragmentos N-terminales de alfa-sinucleína de aproximadamente 6 a 7 kDa (como se determina por SDS Electroforesis) o 50-80 aminoácidos. Otros fragmentos de la descripción incluyen fragmentos N-terminales de alfa-sinucleína que están libres de 1-10 aminoácidos del extremo C de la alfa-sinucleína intacta, es decir, SN1-X, en la que X es 130-139. Algunos fragmentos se caracterizan por la unión específica a anticuerpos ELADW43 (N-terminal libre) y 5C12 (109-120) y la falta de unión específica a 8A5 (C-terminal libre), LB509 (115-123) y ELAD47 (118-123). Algunos fragmentos se caracterizan por la unión específica a ELADW43 (N-terminal libre) y 5C12 (109-120), LB509 (115-123) y ELAD47 (118-123) y falta de unión específica a 8A5 (C-terminal libre). Algunos fragmentos se caracterizan por la unión específica a ELADW43-(N-terminal libre) y 5C12 (109-120), LB509 (115-123) y ELAD47 (118-123) y 8A5 (C-terminal libre) y la falta de unión específica a ELADW43 (N-terminal libre).

40 **[0048]** Algunos fragmentos o alfa-sinucleína de longitud completa son fosforilados o nitrados en la posición ocupante de residuo de tirosina 125 de alfa-sinucleína. Fragmentos de retención de serina de aminoácido 125 o alfa sinucleína de longitud completa también pueden fosforilarse en esta posición. La detección de la fosforilación o nitración mejorada en la posición 125 o fosforilación en la posición 129 en un paciente respecto a la media en una población de individuos no enfermos es una indicación de una enfermedad de cuerpos de Lewy. La detección puede llevarse a cabo utilizando un anticuerpo específico para la alfa-sinucleína fosforilada o nitrada en la posición 125. Un nivel se considera mejorado si es mayor que la media más una desviación estándar en una población de individuos no enfermos.

45 **[0049]** Los fragmentos de la invención son distintos del componente no A de amiloide de la enfermedad de Alzheimer (NAC) objeto de informe anteriormente. Este fragmento consiste en al menos 28 residuos de aminoácidos (residuos 60-87) y opcionalmente 35 residuos de aminoácidos (residuos 61-95). Véase Iwai, et al, BioChemistry, 34: 10139-10145; Jensen et al., Biochem. J. 310 (Pt 1): 91-94-(1995); Número de acceso GenBank S56746.

50 **[0050]** A menos que se indique lo contrario, la referencia a la alfa-sinucleína o sus fragmentos incluye la secuencia natural humana de aminoácidos indicada anteriormente, o fragmentos de los mismos, así como análogos incluyendo alélico, especies y variantes inducidas. A los aminoácidos de los análogos se les asignan los mismos números que los aminoácidos correspondientes en la secuencia humana natural cuando el análogo y la secuencia humana son máximamente alineados. Los análogos típicamente difieren de los péptidos de origen natural en una, dos o unas pocas posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservadoras. Algunas variantes alélicas naturales están asociadas genéticamente con LBD hereditaria. Estas variantes incluyen A30P y A53T. La variación A53T se asocia con mayores niveles de fosforilación en la posición 129 de alfa-sinucleína en un individuo que tiene la mutación con respecto a la norma de la fosforilación en individuos no enfermos que carecen de la mutación. Los análogos exhiben al menos 80 o 90% de identidad de secuencia con los péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de N o C terminal de los ácidos aminados en una, dos o unas pocas posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido glutámico natural puede ser reemplazado con ácido iso-aspartico. Ejemplos de aminoácidos no naturales son aminoácidos D, alfa, alfa-disustituidos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, ácido 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, epsilon-N,N,N-trimetil-lisina, epsilon-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmethionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, omega-N-metilarginina, -alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-amino butírico, homoserina, citrulina, y ácido

isoaspártico. Los análogos típicamente se unen específicamente a una población de anticuerpo policlonal generado contra la alfa-sinucleína humana natural. La invención también proporciona los D-péptidos, en los que D-aminoácidos pueden ser sustituidos por L-aminoácidos naturales de la alfa-sinucleína correspondiente en la mayoría o todas las posiciones.

[0051] Alfa-sinucleína, sus fragmentos, y los análogos pueden ser sintetizados por síntesis de péptidos en fase sólida o expresión recombinante, o pueden obtenerse de fuentes naturales. Sintetizadores de péptidos automáticos están disponibles comercialmente de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede ser en bacterias, tales como *E. coli*, levaduras, células de insecto o células de mamífero. Los procedimientos para la expresión recombinante se describen por Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (CSHP Press, NY 2ª ed., 1989).

III. Enfermedades de Cuerpos de Lewy

[0052] La Enfermedad de Cuerpos de Lewy (LBD) se caracteriza por la degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deterioro cognitivo, y la formación de cuerpos de Lewy (LBS). (McKeith et al, Clinical and pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Inf Report of the CDLB International Workshop, Neurology (1996) 47:1113-24). Cuerpos de Lewy son depósitos de proteínas esféricas se encuentran en las células nerviosas. Su presencia en el cerebro altera el funcionamiento normal del cerebro interrumpiendo la acción de los mensajeros químicos que incluyen la acetilcolina y dopamina. Enfermedades con cuerpos de Lewy incluyen la enfermedad de Parkinson (incluyendo la enfermedad idiopática de Parkinson (PD)), enfermedad difusa de cuerpos de Lewy (EDCL) también conocida como demencia con cuerpos de Lewy (DLB), Alzheimer combinado y enfermedad de Parkinson y la atrofia multisistémica (MSA). EDCL comparte síntomas tanto de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. EDCL se diferencia de la enfermedad de Parkinson principalmente en la localización de cuerpos de Lewy. En los cuerpos de Lewy EDCL, se forman principalmente en la corteza. En la enfermedad de Parkinson, forman principalmente en la sustancia negra. Otras enfermedades con cuerpos de Lewy incluyen insuficiencia pura autonómica, disfagia de cuerpos de Lewy, LBD incidental, LBD heredado (*por ejemplo*, mutaciones del gen de alfa-sinucleína, PARK3 y PARK4) y atrofia de múltiples sistemas (*por ejemplo*, Atrofia Olivopontocerebelosa, Degeneración Nigroestriatal y Síndrome Shy-Drager).

IV. Animales transgénicos y células

[0053] La invención proporciona animales transgénicos no humanos que tienen un genoma que comprende un transgén que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una forma truncada C-terminal de la alfa-sinucleína como se describe anteriormente. El transgén está presente preferiblemente en la totalidad o sustancialmente la totalidad de las células somáticas y la línea germinal del animal transgénico. El segmento de ácido nucleico que codifica la forma truncada C-terminal de la alfa-sinucleína está unido operativamente a uno o más segmentos reguladores que permiten que la forma truncada de la alfa-sinucleína se exprese en las células neuronales del animal. Promotores tales como el promotor de enolasa de neuronas específicas de rata, promotor del gen de beta-actina humana, promotor del gen de cadena de factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas B (PDGF B), rata promotora del gen del canal de sodio, la mielina del ratón promotor del gen de la proteína básica, promotor del gen de dismutasa de superóxido de zinc-cobre humano, y el promotor de gen regulador de mamífero POU-dominio se puede utilizar. El promotor PDGF es particularmente adecuado. Opcionalmente, se utiliza un promotor inducible. El promotor de metalotionina de ratón, que puede ser regulado mediante la adición de metales pesados como el zinc al agua del ratón o de la dieta, es adecuado. Tales animales transgénicos pueden ser producidos por los mismos enfoques generales descritos por (Masliah et al, Am J. Pathol (1996) 148: 201-10 y Feany et al, Nature (2000) 404: 394-8)) para los animales transgénicos con alfa-sinucleína de longitud completa o US 5.811.633 (para animales transgénicos con una forma mutante de APP). Opcionalmente, los animales transgénicos que llevan un transgén que expresa una proteína alfa-sinucleína truncada pueden cruzarse con otros modelos transgénicos de la enfermedad neurogénica, como los modelos de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, los animales transgénicos que llevan un transgén que expresa una proteína alfa-sinucleína truncada pueden cruzarse con los animales transgénicos que llevan un transgén expresado APP con una mutación FAD como se describe, por ejemplo, por Games et al., Nature 373, 523 (1995) McConlogue et al., US 5.612.486, Hsiao et al, Science 274, 99 (1996); Staufenbiel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94, 13287 - 13292 (1997); Sturchler-Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94, 13287 - 13292 (1997); Borchelt et al., Neuron 19, 939-945 (1997)). El procedimiento para realizar una cruz de este tipo se describe, por ejemplo, por Masliah et al, PNAS EE.UU. 98: 12.245-12.250 (2001), que informa de un cruce entre ratones transgénicos que expresan una alfa-sinucleína de longitud completa con los ratones PDAPP como se ha descrito por Games et al. Animales transgénicos de la invención son preferiblemente roedores, tales como ratones o ratas, o los insectos, tales como *Drosophila*.

[0054] La expresión de formas truncadas de alfa-sinucleína en modelos animales da lugar a animales propensos al desarrollo de al menos una característica de una enfermedad de Cuerpos de Lewy. Tales características incluyen los niveles de los depósitos intracelulares de alfa-sinucleína, aumento de la formación de cuerpos de Lewy, y deterioro

de las funciones cognitivas y motoras en relación con los animales no transgénicos normales de la misma especie. Tales animales transgénicos son útiles para los agentes para la actividad farmacológica de cribado en el tratamiento de la enfermedad de Cuerpos de Lewy.

[0055] La divulgación también proporciona células transformadas con alfa sinucleína truncada que forman cuerpos de inclusión que contienen alfa-sinucleína agregada truncada. Las células transformadas son preferiblemente células neuronales, tales como células neuronales GT1-7 (Hsue et al Am J. Pathol 157: 401-410 (2000)), las células de neuroblastoma PC12 o células SY5Y. Células PEAK también se pueden utilizar. Las células son preferiblemente células humanas. Un vector que comprende un segmento que codifica una forma truncada de la alfa-sinucleína unida operativamente a una o más secuencias reguladoras que aseguran que la expresión de la expresión truncada se transfecte en las células. Las células transfectadas se pueden utilizar para cribar agentes para la actividad en la limpieza de inclusiones de alfa-sinucleína.

V. Métodos de detección

[0056] La invención proporciona varios métodos de detección para identificar agentes que tienen una actividad farmacológica útil en el tratamiento de un LBD. Los métodos incluyen exámenes que se pueden realizar in vitro, en células o animales transgénicos, y que ponen a prueba una variedad de parámetros como una indicación de la actividad. Agentes que se determina que tienen una actividad en estas pruebas pueden ser analizados de nuevo en pruebas secundarias de modelos animales de LBD o en ensayos clínicos para determinar la actividad contra los síntomas de comportamiento u otras de estas enfermedades.

1. In vitro

[0057] Los ensayos in vitro se llevan a cabo para poner a prueba la capacidad de un agente para inhibir la agregación de las formas truncadas de alfa sinucleína. El formato de base para el análisis de la agregación in vitro de alfa-sinucleína, aunque en el contexto de alfa sinucleína de longitud completa, se describe por (Wood, J. Biol. Chem. 274, 19509 a 19512 (1999)). En los presentes procedimientos, el ensayo se realiza en presencia de un agente de prueba. La tasa o el grado de agregación de alfa-sinucleína en presencia de un agente se determina y se compara con la tasa o grado de agregación de alfa-sinucleína en un control contemporáneo o histórico en el que se omitió el agente. Una reducción en la tasa o grado de agregación en presencia del agente con respecto al control indica que el agente tiene actividad en la inhibición de la agregación de las formas truncadas de alfa sinucleína. Esta actividad es potencialmente útil en el tratamiento o prevención de enfermedades con cuerpos de Lewy.

2. Ensayos celulares

[0058] Algunos ensayos celulares se realizan en las células transfectadas con ácidos nucleicos que codifican formas truncadas de alfa-sinucleína como se ha descrito anteriormente, opcionalmente con una variación hereditaria, tal como Ala30Pro o Ala53Th. Tales células se ponen en contacto con un agente bajo prueba, y se mide la tasa de extensión de la agregación de alfa-sinucleína truncada. La tasa de extensión de la agregación de alfa-sinucleína se compara entonces con la de células de control transfectadas de manera similar en ausencia del agente. La agregación se puede monitorizar mediante análisis inmunohistoquímica, microscopía de luz o por análisis en gel. Análisis en gel puede detectar la formación de los atenuadores, trímeros u oligómeros superiores, así como la incapacidad de sinucleína para entrar en geles debido a un alto nivel de oligomerización. Una reducción en la tasa o grado de agregación en presencia del agente de ensayo con relación al control indica que el agente tiene una actividad farmacológica en la inhibición de la agregación de las formas truncadas de alfa-sinucleína. Esta actividad es potencialmente útil en el tratamiento o prevención de enfermedades con cuerpos de Lewy.

[0059] Otros ensayos celulares se realizan en las células transfectadas con ácidos nucleicos que codifican alfa-sinucleína de longitud completa, opcionalmente con una variación hereditaria, tal como Ala30Pro o Ala53Thr. Tales células se ponen en contacto con un agente bajo prueba y la tasa o grado de formación de formas truncadas de la alfa-sinucleína y/o formas fosforiladas o nitradas de sinucleína se miden. La presencia de estas formas se puede detectar mediante transferencia de Western usando uno o más anticuerpos a la alfa-sinucleína. Anticuerpos específicos finales (es decir, anticuerpos que se unen a una forma truncada sin unirse a alfa-sinucleína de longitud completa) son particularmente útiles para este análisis. Las colecciones de anticuerpos que tienen diferentes especificidades de epítipo también se pueden utilizar. Por ejemplo, la presencia de formas truncadas de alfa-sinucleína puede demostrarse por la presencia de bandas cuando se realizó la inmunotransferencia con anticuerpos que reconocen un epítipo N-terminal de un segmento de aminoácidos definido aproximadamente por los aminoácidos 118-125 de alfa-sinucleína intacta, y falta de bandas cuando se borró con un anticuerpo que reconoce un epítipo C-terminal de esta región. La tasa o el grado de formación de formas truncadas de alfa-sinucleína y/o formas fosforiladas o nitradas en presencia de agente se compara con la de células de control comparables en ausencia de agente. Una reducción en la tasa o grado de formación de formas truncadas de la alfa-sinucleína en presencia del agente de ensayo con relación al control indica que el agente tiene una actividad farmacológica que inhibe el procesamiento de alfa-sinucleína a sus formas truncadas. Esta actividad es útil para tratar o prevenir LBD.

3. Ensayos en animales transgénicos

[0060] Los animales transgénicos tienen un transgén que expresa una forma truncada de la alfa-sinucleína como se ha descrito anteriormente, opcionalmente con una variación hereditaria, tal como Ala30Pro o Ala53Th. Tal animal se pone en contacto con un agente bajo prueba, y se mide la tasa de extensión de la agregación de la forma truncada de la alfa-sinucleína en comparación con la de un control contemporáneo o histórico. El control es por lo general un animal transgénico similar de la misma especie que no ha sido expuesto al agente. La agregación de alfa-sinucleína en un animal transgénico se puede controlar mediante transferencia de Western o inmunohistoquímica como se describe en los ejemplos. De manera alternativa o adicional, la actividad del agente en tales animales transgénicos se puede determinar a partir de características de comportamiento, tales como características motoras o cognitivas, como se describe en los Ejemplos. En tales ensayos, la actividad farmacológica del agente se muestra mediante la mejora de características motoras o cognitivas (es decir, deterioro disminuido de tales características) respecto a un animal transgénico de control comparable no expuesto al agente.

[0061] Otros ensayos se realizan en animales transgénicos que tienen un transgén que expresa una forma de longitud completa de alfa-sinucleína, opcionalmente con una variación hereditaria, tal como Ala30Pro o Ala53Th. Tales animales se ponen en contacto con un agente bajo prueba, y se detecta la tasa o el grado de aparición de formas truncadas de la alfa-sinucleína, opcionalmente con una variación hereditaria, tal como Ala30Pro o Ala53Th. Tales formas se pueden detectar usando transferencia Western o análisis inmunohistoquímica usando anticuerpos anti-alfa-sinucleína apropiados (como se describe para los ensayos celulares). La tasa de extensión de la aparición de formas truncadas de alfa-sinucleína y/o formas fosforiladas o nitradas se compara con la velocidad y el grado de aparición de tales formas en un control contemporáneo o histórico que constituye un animal transgénico comparable que no ha sido expuesto al agente. Una reducción en la tasa o el grado de aparición de las formas truncadas de la alfa-sinucleína en el animal expuesto al agente de ensayo con relación al control indica que el agente tiene actividad en la inhibición de procesamiento de larga duración de alfa-sinucleína a formas truncadas.

4. Agentes objeto de examen

[0062] Agentes que se proyectarán incluyen anticuerpos a la alfa-sinucleína, péptidos de alfa-sinucleína, fármacos conocidos o sospechosos de tener actividad en el tratamiento de un LBD, productos naturales y bibliotecas combinatorias. Los péptidos preferidos de alfa sinucleína son péptidos relativamente cortos de 30, 25, 20 10 o menos aminoácidos que incluyen los aminoácidos 118-125 de alfa sinucleína. Opcionalmente, un aminoácido inmediatamente en el lado N-terminal del sitio de escisión que genera formas truncadas C-terminal de la alfa-sinucleína se sustituye con un aminoácido análogo de estado de transición que forma un enlace nonhidrolizable entre los dos aminoácidos que flanquean el sitio de escisión, por ejemplo, el aminoácido 119 de alfa-sinucleína. Ejemplos de análogos son análogos del estado de transición son estatina, hidroxieteleno, hidroxietelamina, AHPPA, ACHPA, y derivados de los mismos. Uno o más aminoácidos de una secuencia de alfa-sinucleína natural también pueden estar sustituidos con otros aminoácidos naturales.

[0063] Los productos naturales objeto de examen también pueden obtenerse a partir del Instituto Nacional del Cáncer Repositorio de Productos Naturales, Bethesda, MD. Bibliotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos también pueden ser examinadas para determinar su idoneidad. Las bibliotecas combinatorias se pueden producir para muchos tipos de compuestos que se pueden sintetizar de una manera etapa a etapa. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de giro beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas N-sustituidas oligoméricas y oligocarbamatos. Las grandes bibliotecas combinatorias de los compuestos pueden ser construidos por las bibliotecas codificadas sintéticas (ESL) procedimiento descrito en Affymax, documento WO 95/12608, Affymax, documento WO 93/06121, Universidad de Columbia, documento WO 94/08051, Pharmacopeia, WO 95/35503 y Scripps, documento WO 95/30642. Las bibliotecas de péptidos también pueden generarse mediante métodos de presentación de fagos. Véase, *por ejemplo*, Devlin, documento WO 91/18980. Las bibliotecas combinatorias y otros compuestos inicialmente pueden ser examinados para determinar su idoneidad determinando su capacidad para unirse a la alfa-sinucleína.

VI. Ensayos de toxicidad

[0064] Estrategias análogas a las descritas en los ensayos de selección se pueden utilizar para determinar si los fármacos existentes, alimentos, toxinas ambientales, y otros compuestos ejercen efectos tóxicos a través de la promoción del procesamiento de alfa-sinucleína, la fosforilación o agregación. Dichos ensayos se llevan a cabo en la misma manera que los ensayos de selección. La actividad tóxica se indica por el resultado opuesto a la actividad farmacológica en los ensayos de selección.

VII. Aislamiento de la proteasa

[0065] El procesamiento de longitud completa alfa-sinucleína a las formas truncadas de la invención se efectúa por una proteasa. La proteasa se puede purificar usando un inhibidor identificado por los métodos de detección descritos anteriormente. Un inhibidor preferido es un péptido de alfa-sinucleína incluyendo residuos 117-126 en los que un residuo N-terminal al sitio de escisión se ha sustituido por un análogo de estado de transición. Un inhibidor de este

tipo se utiliza como un reactivo de purificación por afinidad para purificar la proteasa a partir de extractos de células cerebrales. Tales células se pueden obtener del cadáver de un individuo normal o uno que ha sufrido de una enfermedad LBD. Los niveles de proteasa pueden ser elevados en el segundo. La proteasa se puede ensayar mediante la presentación con un sustrato de alfa-sinucleína y el seguimiento de la formación de productos de escisión. El sustrato puede ser, por ejemplo, la forma humana natural de alfa-sinucleína descrita anteriormente, un fragmento de la misma que contiene los residuos que flanquean ambos lados del sitio de escisión, o una forma mutante de la misma en la que la mutación está asociada con una forma hereditaria de LBD. Opcionalmente, el extremo C-terminal del sustrato se puede inmovilizar a la fase sólida, y el N-terminal a una etiqueta. La escisión del sustrato libera la etiqueta a la fase líquida. La fase líquida puede ser fácilmente separada de la fase sólida, y la cantidad de marcador cuantificada como una medida de la actividad proteolítica.

VIII. Anticuerpos específicos finales

[0066] La descripción proporciona anticuerpos específicos de gama. Tales anticuerpos se unen específicamente a una forma truncada de alfa sinucleína (en el extremo C-terminal), preferiblemente una forma seleccionada del grupo que consiste en SN1-118, SN1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124, 1-125 o 1-126 sin unirse específicamente a alfa-sinucleína de longitud completa. Tales anticuerpos son útiles para formación de imágenes in vivo de depósitos de alfa-sinucleína, como agentes terapéuticos (véase más adelante), y para la detección de productos de escisión resultantes de la escisión proteolítica de la alfa-sinucleína en los métodos de selección descritos anteriormente. Anticuerpos específicos finales también se proporcionan a los correspondientes fragmentos C-terminal, por ejemplo, 118-140, 119-140, 120-140, 121-140, 122-140, 123-140, 124-140, 125-140 y 126-140. Los anticuerpos específicos de gama reconocen el N-terminal de estos fragmentos de tal manera que se unen específicamente al fragmento sin unirse específicamente a alfa-sinucleína de longitud completa.

[0067] Dichos anticuerpos se pueden generar mediante la inmunización de un animal de laboratorio con alfa-sinucleína o un fragmento de la misma para inducir anticuerpos, y detección de los anticuerpos resultantes para identificar los que tienen la especificidad de unión deseada. Opcionalmente, la inmunización puede llevarse a cabo con péptidos relativamente cortos de ácidos de menos de 20 aminoácidos que incluyen el extremo C-terminal de los fragmentos truncados descritos en el presente documento (*por ejemplo*, SN 99 a 118, o SN 110-119). Opcionalmente, dichos péptidos cortos están ligados a un portador que ayuda a provocar una respuesta inmunitaria.

[0068] Opcionalmente, la unión específica a un fragmento truncado marcado o inmovilizado se puede realizar en competencia con alfa-sinucleína no marcada de longitud completa. Opcionalmente, grandes bibliotecas de anticuerpos se pueden examinar simultáneamente usando la técnica de presentación en fagos.

[0069] La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, murino, conejillo de indias, primate, conejo o rata, se puede realizar como se describe por Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988). Adyuvante completo de Freund seguido de adyuvante incompleto se prefiere para la inmunización de animales de laboratorio. Conejos o cobayas se utilizan típicamente para preparar anticuerpos policlonales. Los ratones se usan típicamente para preparar anticuerpos monoclonales. La unión puede evaluarse, por ejemplo, mediante transferencia Western o ELISA. El fragmento más pequeño que muestra unión específica al anticuerpo define el epítipo del anticuerpo. Alternativamente, la especificidad de epítipo se puede determinar por un ensayo de competición es que un anticuerpo de ensayo y de referencia compiten para la unión a alfa-sinucleína. Si los anticuerpos de ensayo y de referencia compiten, a continuación, se unen al mismo epítipo o epítopos suficientemente proximales tal que la unión de un anticuerpo interfiere con la unión del otro.

[0070] 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 ligera y pesada 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 humano. Los anticuerpos IgM se pueden usar también en algunos métodos. Un anticuerpo quimérico típico es por lo tanto una proteína híbrida que consiste en el dominio de unión de V o antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio C o efector de un anticuerpo humano.

[0071] 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 presentes, también es sustancial o completamente de 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 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.

[0072] Los anticuerpos humanos contra la alfa-sinucleína 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. Las técnicas para producir anticuerpos humanos incluyen la metodología del trioma de Oestberg et al, Hybridoma 2: 361-367 (1983); Patente Oestberg, US nº 4.634.664; y Engleman et al., Patente de Estados Unidos 4.634.666, el uso de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de inmunoglobulina humana como se describe 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 y métodos 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.

[0073] Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos pueden estar enlazados 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 hacen. La elección de isotipo también puede afectar la etapa 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')₂, y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla en que los dominios variables de cadena pesada y ligera están vinculados a través de un espaciador.

[0074] Los anticuerpos monoclonales se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 109-120, o 115-123, de alfa-sinucleína, o un epítipo discontinuo dentro de los residuos 43-51 y 68-65, o de fin específico para el extremo C-terminal de la alfa sinucleína también se proporcionan, incluyendo formas humanizadas, quiméricas y humanas de los mismos. Un anticuerpo específico de extremo a C-terminal de la alfa-sinucleína puede ser reconocido por la capacidad para unirse específicamente a la alfa-sinucleína como una proteína libre sin unirse específicamente a alfa-sinucleína como un componente de una proteína de fusión cuando el extremo C-terminal de la alfa sinucleína está vinculado a un segundo péptido. Estos anticuerpos pueden ser examinados para la actividad terapéutica, y si se obtienen resultados positivos, se pueden utilizar en métodos terapéuticos. Los anticuerpos también se pueden utilizar en la detección de fragmentos de alfa-sinucleína como se describe anteriormente.

IX. Diagnóstico

[0075] La descripción proporciona métodos de LBs *in vivo* de imagen en un paciente. Tales métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de una enfermedad de Cuerpos de Lewy de la EP o 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 el paciente es probable que sufre de una enfermedad por cuerpos de Lewy. 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 una enfermedad de cuerpos de Lewy.

[0076] El método de trabajo mediante la administración de un anticuerpo específico de extremo como se describió anteriormente que se une a la alfa-sinucleína en el paciente y después detectando el anticuerpo después de que se ha unido. Si se desea, una 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.

[0077] 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 la alfa-sinucleína 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.

[0078] 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 ser determinados 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 de las señales de una respuesta positiva al tratamiento.

[0079] Los anticuerpos específicos finales también son útiles para determinar si las formas truncadas de la alfa-sinucleína están presentes en el líquido cefalorraquídeo o en otros tejidos o fluidos corporales. La presencia de tales formas en niveles significativamente mayores (es decir, mayor que la media más una desviación estándar) en un paciente en relación con el nivel normal en una población de individuos no enfermos es indicativa de la presencia o la susceptibilidad a una LBD.

X. Métodos de tratamiento

[0080] La descripción también proporciona varios métodos para prevenir o tratar la enfermedad de Cuerpos de Lewy en los pacientes que sufren de o están en riesgo de dicha enfermedad. Los agentes terapéuticos incluyen las formas truncadas de la alfa-sinucleína descritos anteriormente, y fragmentos de la misma eficaces para inducir anticuerpos, anticuerpos específicos de gama como se describió anteriormente, e inhibidores de la agregación de fragmentos truncados de la alfa-sinucleína o procesamiento proteolítico de la alfa-sinucleína como se describe anteriormente. Los métodos generales para los agentes de la administración a los pacientes que sufren o están en riesgo de LBD se describen en la solicitud pendiente USSN 60/423.012 presentada el 1 de noviembre de 2002, y US00 PCT/15239 presentada el 1 de junio de 2000, y PCT/US03/34527, presentada el 31 de octubre de 2003.

[0081] Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de la enfermedad de un LBD pero no muestran síntomas, así como pacientes que muestran actualmente síntomas. 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 PD incluyen mutaciones en alfa-sinucleína o genes Parkin, UCHL1, y CYP2D6; particularmente mutaciones en las posiciones 30 y 53 del gen de la alfa-sinucleína. Las personas actualmente padecen la enfermedad de Parkinson se pueden reconocer de sus manifestaciones clínicas, incluyendo temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural.

[0082] En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos o factores de riesgo de cualquier enfermedad amiloidogénica que no sea una caracterizada por cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos 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. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos y factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. 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 enfermedad concurrente de Alzheimer y Parkinson.

[0083] En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (*por ejemplo*, 10, 20, 30). Por lo general, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcanza 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 a un agente terapéutico (*por ejemplo*, una forma truncada de péptido alfa-sinucleína) en el tiempo. Si la respuesta cae, una dosis de refuerzo se indica.

[0084] En las aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible a, o de otra manera en riesgo de un LBD en régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición o el 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 que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones 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. Una cantidad adecuada para conseguir el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente efectiva. Una combinación de cantidad y la frecuencia de dosis adecuada para conseguir el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como un régimen eficaz terapéuticamente o profilácticamente. En ambos regímenes profilácticos y terapéuticos, los agentes normalmente se administran en varias dosificaciones hasta que se ha conseguido una respuesta inmune suficiente. Típicamente, la respuesta inmune se controla y dosis repetidas se dan si la respuesta inmune empieza a disminuir.

[0085] En algunos métodos, la administración de un agente resulta en la reducción de los niveles intracelulares de

alfa-sinucleína agregada. En algunos métodos, la administración del agente da como resultado una reducción en los niveles de las formas truncadas C-terminal de la alfa-sinucleína. En algunos métodos, la administración de un agente resulta en la mejora de un síntoma clínico de un LBD, tales como el motor o la función cognitiva en el caso de la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la reducción en los niveles intracelulares de alfa-sinucleína agregada o mejora en un síntoma clínico de la enfermedad se controla a intervalos después de la administración de un agente.

[0086] 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, 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 mamífero humano pero también pueden ser tratados no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento necesitan titularse para optimizar la seguridad y la eficacia.

[0087] En algunos métodos, el agente es un fragmento truncado de alfa-sinucleína o un fragmento de la misma capaz de inducir anticuerpos a la alfa-sinucleína. La cantidad de un fragmento tal depende de si el adyuvante también se administra, con dosis más altas que se requieren en la ausencia de adyuvante. La cantidad de un fragmento para la administración a veces varía de 1-500 µg por paciente y más habitualmente de 5-500 µg 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 µg se utiliza para cada inyección humana. La masa de fragmento también depende de la relación de masa del epítipo inmunogénico dentro del fragmento a la masa del fragmento como un todo. Típicamente, 10^{-3} a 10^{-5} micro moles de epítipo inmunogénico se utilizan para microgramo de fragmento. 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 µg/paciente y habitualmente mayor que 10 µg/paciente si también se administra adyuvante, y mayor que 10 µg/paciente y habitualmente mayor que 100 µg/paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consta de una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo a intervalos de tiempo, tal 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 durante toda la vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser de forma irregular tal como se indica mediante la monitorización de la respuesta inmune.

[0088] fragmentos truncados de alfa-sinucleína se pueden administrar también en forma de ácidos nucleicos que codifican los fragmentos unidos operativamente a uno o más elementos reguladores para asegurar la expresión del fragmento truncado de alfa sinucleína. Las dosis para ácidos nucleicos que codifican inmunógenos varían de 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 10-100, o más, viriones por dosis.

[0089] Algunos métodos implican la inmunización pasiva con un anticuerpo específico de extremo. En tales métodos, los intervalos de dosificación 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 peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg o, en otras palabras, 70 mg o 700 mg o en el 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 la alfa-sinucleína en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de anticuerpo en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de 25-300 µg/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran una 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 que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, y preferiblemente hasta que el paciente muestre mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de ello, se puede administrar un régimen profiláctico al paciente.

[0090] Los agentes terapéuticos se pueden administrar por vía parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, 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 prefiere para la administración de anticuerpos. 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™. Las moléculas pequeñas que actúan mediante la inhibición de procesamiento de la proteasa de la alfa-sinucleína se pueden administrar por vía intravenosa si las pequeñas moléculas pasan a través de la barrera hematoencefálica suficiente para la eficacia terapéutica o profiláctica o directamente en el cráneo de otra manera.

[0091] Los agentes de la invención opcionalmente pueden administrarse en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de LBD. 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.

[0092] Los agentes inmunogénicos se administran a veces en combinación con un adyuvante. Una variedad de adyuvantes se puede utilizar en combinación con un péptido, tal como alfa-sinucleína, para provocar una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, 3-De-O-acilado monofosforilo lípido A (MPL™) (véase GB 2220211 (Ribi ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un glicósido triterpeno o saponina aislados de la corteza del árbol Quillaja saponaria Molina se encuentra en América del Sur (véase Kensil et al, en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds Powell y Newman, Plenum Press, Nueva York, 1995); la patente estadounidense nº 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tales como monofosforilo lípido A (véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)), polímeros plurónicos, y micobacterias muertas. Otro adyuvante es CpG (documento WO 98/40100). Como alternativa, la alfa-sinucleína puede acoplarse a un adyuvante. Sin embargo, tal acoplamiento no debe cambiar sustancialmente la conformación de alfa-sinucleína de manera que afecte a la naturaleza de la respuesta inmune al mismo. Los adyuvantes pueden administrarse como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse por separado, antes de, simultáneamente con, o después de la administración del agente terapéutico.

[0093] Una clase preferida de adyuvantes es sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de alumbre, fosfato de alumbre, sulfato de alumbre. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, polimérico o aminoácidos monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilisina. Otra clase de adyuvantes es formulaciones de emulsión de aceite-en-agua. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (por ejemplo, N-acetilmuramilo-L-treonilo-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilo-normuramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'-fosforilo-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi) etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramilo-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) theramida™), u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite-en-agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837), que contiene 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero bloqueado con plurónico L121 y thr-MDP, microfluidizado en una emulsión submicrométrica o vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y (c) sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste de monofosforilípido a (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™).

[0094] Otra clase de adyuvantes preferidos es adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (QS-21, Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes) y ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen RC-529, GM-CSF y Adyuvante Completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL13 e IL-15), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y factor de necrosis tumoral (TNF). Otra clase de adyuvantes es análogos de glicolípidos incluyendo N-glicosilamidas, N-glicosilureas y N-glucosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el residuo de azúcar por un aminoácido, como inmunomoduladores o adyuvantes (véase la Patente de EE.UU. Núm. 4.855.283). Proteínas de choque térmico, *por ejemplo*, HSP70 y HSP90, también se pueden usar como adyuvantes.

[0095] Un adyuvante puede administrarse con un fragmento de la alfa-sinucleína como una sola composición, o se puede administrar antes de, simultáneamente con o después de la administración del fragmento de la alfa-sinucleína. El fragmento de la alfa-sinucleína y el adyuvante pueden envasarse y suministrarse en el mismo vial o pueden envasarse en viales separados y mezclarse antes de su uso. El fragmento de alfa-sinucleína y el adyuvante

se envasan típicamente con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica prevista. Si el fragmento de alfa-sinucleína y el adyuvante se envasan por separado, el embalaje incluye típicamente instrucciones para la mezcla antes de su uso. La elección de un adyuvante y/o vehículo depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación, la eficacia del adyuvante para la especie a la que se vacuna, y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que se ha aprobado o puede aprobarse para la administración humana por los organismos reguladores pertinentes. Por ejemplo, adyuvante completo de Freund no es adecuado para la administración humana. Se prefieren Alum, MPL y QS-21. Opcionalmente, dos o más adyuvantes diferentes se pueden utilizar simultáneamente. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21, MPL o RC-529 con GM-CSF, y el alumbre, QS-21 y MPL juntos. Además, el adyuvante incompleto de Freund se puede utilizar (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS-21, y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

[0096] 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 Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, 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.

[0097] 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 sefaroza 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).

[0098] 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 dimetilol. 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, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl. Las composiciones para administración parenteral son típicamente sustancialmente estéril, sustancialmente isotónica y fabricado bajo condiciones GMP de la FDA o cuerpo similar.

[0099] 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 efecto de 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.

[0100] las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen la vía oral, intranasal, y formulaciones pulmonares, supositorios, y aplicaciones transdérmicas 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 sódica, 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%.

[0101] 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. Alternativamente, administración transdérmica se puede lograr mediante una ruta de la piel o usando transferosomas (Paul et al, Eur J. Immunol 25, 3521-24-(1995); Cevc et al, Biochem Biophys Acta 1368, 201-15 (1998)).

Ejemplos

1. La detección de formas truncadas de la alfa-sinucleína en un animal transgénico

[0102] Los ratones transgénicos que tienen un ácido nucleico que codifica alfa-sinucleína intacta unido operativamente a un promotor PDFG se analizaron a las 6 semanas, 3 meses y 12 meses de edad. Los animales fueron sacrificados y la corteza y el hipocampo de tejidos a partir de cuatro ratones (2 machos/2 hembra) se agruparon. El tejido se homogeneizó en TBS (NaCl 250 mM), y se centrifugó a 150,000 xg durante 15 minutos. Después, el sedimento se extrajo con 1% de Triton-X 100 durante 30 min a 4 grados y se centrifugó como antes. Finalmente, el granuloso se extrajo con urea 8 M/1% de SDS. Este procedimiento dio lugar a cuatro extractos a los que se hace referencia como Tris, Triton, SDS, y extractos de urea en la descripción siguiente.

[0103] Figs. 1A y B muestran una transferencia Western de extractos a partir de un ratón transgénico y un control emparejado con el anticuerpo ELADW-47. Este anticuerpo es un anticuerpo policlonal que se une a un epítipo dentro de Sun115-122 (pero no necesariamente requiere de cada aminoácido para que ocurra la unión). El anticuerpo se une preferentemente la forma humana de la alfa-sinucleína pero también se une la forma del ratón en menor medida. Las Figs. 1A y B muestran una banda de alfa-sinucleína en 14 kDa, tanto para el control del ratón como del ratón transgénico. La banda es más fuerte para el ratón transgénico que el control. Para los diferentes extractos, la banda es más intensa en el extracto de Triton. Este extracto solubiliza alfa-sinucleína unida a la membrana y, posiblemente, inclusiones de cuerpo como de Lewy. El Tris y en particular las extracciones Triton del ratón transgénico (pero no el control) muestran una banda a aproximadamente 12 kDa en un tampón de tricina. Esta es una forma truncada de la alfa-sinucleína. El peso molecular de la banda corresponde a una longitud de aproximadamente 115-120 aminoácidos.

[0104] Fig 2 muestra una transferencia de Western con el mismo anticuerpo como Fig. 1 para comparar el nivel de la forma truncada de la alfa-sinucleína en ratones de 3 meses y 12 meses de edad. La figura muestra que la forma truncada aparece más fuertemente en los ratones de 3 meses. Una vez más, la banda truncada no aparece en los ratones de control. Una aparición más intensa de la forma truncada de la alfa-sinucleína temprano en el desarrollo de los ratones transgénicos indica que la forma truncada de la alfa-sinucleína tiene un papel temprano en la patogénesis de la enfermedad de Cuerpos de Lewy.

[0105] Figs. 3A y B muestran una transferencia de Western con un anticuerpo diferente denominado 12C1 (se une epítipo en los aminoácidos 43-51 y 58-65, monoclonales, IgG1 k). Este anticuerpo se une igualmente a formas de ratón y humanas de la alfa-sinucleína en un epítipo que incluye los aminoácidos 43-51 y 58-65. Fig. 3 muestra la banda truncada de 12 kDa en el extracto de Triton de los ratones transgénicos. La misma banda aparece mucho más débilmente en el extracto de Triton de los ratones de control. Por lo tanto, el procesamiento de alfa-sinucleína a una forma truncada se produce tanto en ratones normales y ratones transgénicos, pero más fuertemente en los últimos. La mayor extensión de procesamiento en los ratones transgénicos puede ser debido al procesamiento de la alfa-sinucleína humana directamente, o puede ser debido a la presencia de la alfa-sinucleína humana que conduce alfa sinucleína de ratón por una trayectoria que se utiliza en menor medida en ratones no transgénicos.

[0106] Fig. 4 muestra una transferencia Western adicionalmente usando el mismo anticuerpo como Fig. 3. Este gel muestra dos bandas adicionales de pesos moleculares aproximadamente 6 o 7 kDa. La banda 7 kDa aparece más fuertemente en los ratones transgénicos que los ratones de control. La banda 6 kDa aparece sólo en el ratón transgénico, y entonces solamente en la muestra 3 mo. Las bandas 6 o 7 kDa son indicativas de fragmentos N-terminales más cortos de la alfa-sinucleína de una longitud de aproximadamente 50-80 aminoácidos.

[0107] Figs. 5A, B, C, D, E muestran transferencias de Western con cuatro anticuerpos diferentes y mapas de epítopos de los sitios de unión de los anticuerpos. ELADW-44 es un anticuerpo policlonal que se une sólo a la forma humana de la alfa-sinucleína (es decir, no a la forma de ratón) Se une al epítipo en los aminoácidos 98-019. ELADW-47 es un anticuerpo policlonal que se une preferentemente a la forma humana, pero también se une a la forma del ratón. Se une a un epítipo en los aminoácidos 115-122. ELADW-48 es un anticuerpo policlonal que se une las formas humanas y de ratón por igual. Se une a un epítipo entre los aminoácidos 131 y 140. 8A5 es un anticuerpo monoclonal que se une a las formas humanas y de ratón por igual. Se une a la C-terminal de la alfa-sinucleína. Las Figs. 5A-E muestran que de estos cuatro anticuerpos, solamente ELADW-47 genera una banda de 12 kDa indicativo de una forma truncada de la alfa-sinucleína. El resultado de que ELADW48 no dio lugar a esta banda es útil para la cartografía del sitio de escisión. Debido a que ELADW-47 se unía y ELADW-48 no se unía, el sitio de escisión está bordeado por el extremo N-terminal del epítipo ELADW-47 y el aminoácido C-terminal del epítipo ELADW48. Además, debido a que algunos aminoácidos del epítipo ELADW-47 deben estar presentes para permitir la unión y algunos de los epítopos ELADW-48 deben estar ausentes para evitar la unión, el sitio de escisión se limita

además a una región aproximadamente dentro de los aminoácidos 118-135. Cuando estos datos se consideran con el tamaño del fragmento truncado (aproximadamente 115-120 aminoácidos) entonces el sitio probable de escisión es de alrededor de los aminoácidos 118-121. La ausencia de unión por el anticuerpo C-terminal 8A5 es consistente con este sitio de escisión. La ausencia de unión por el anticuerpo ELADW-44, sin embargo, requiere más comentarios. La falta de escisión puede explicarse si una forma truncada de la alfa-sinucleína humana que resulta de la escisión se adapta a una conformación diferente a alfa-sinucleína intacta, evitando la unión de ELADW-44. Alternativamente, la forma truncada de la alfa-sinucleína presente en ratones transgénicos en un grado mayor que en los ratones normales representa una forma de ratón alfa-sinucleína. En este caso, la mayor cantidad de la forma truncada en el ratón transgénico sería debido a la presencia de la alfa-sinucleína humana que conduce más de la alfa sinucleína de ratón por un camino de procesamiento que lleva a alfa-sinucleína truncada en relación con la situación en un ratón control.

2. Detección de formas truncadas de la alfa-sinucleína en el cerebro de un paciente con EDCL

[0108] Este ejemplo compara las especies de alfa-sinucleína en LBs a las de las restantes fracciones de proteínas solubles y partículas de un cerebro EDCL. LBs y proteína soluble se prepararon a partir de la corteza de un solo paciente EDCL (véase Jensen et al., J. Biol. Chem. 275 21500-21.507 (2000)). El tejido se homogeneizó en Tris/sacarosa (0,32 mM)/EDTA (5 mM) e inhibidores de tampón de proteasa. El homogeneizado se centrifugó a 1000 g. El sobrenadante se sometió a un giro adicional a 150 kg. El sobrenadante de este giro se utilizó para preparar una fracción soluble Tris de las proteínas. El granulado de 1000g se resuspendió y se usó para preparar una fracción de cuerpos de Lewy. Cuerpos de Lewy se purificaron por inmunoprecipitación en perlas magnéticas que llevan anticuerpos anti-sinucleína. El precipitado se extrajo con 7 M Urea 2 M Tiourea/4% CHAPS. La forma unida se extrajo de nuevo con Urea/Tiourea/CHAPS. Los extractos de este etapa y la extracción anterior se reunieron después y se analizaron mediante 2D PAGE e inmunotransferencia. La forma unida estaba sujeto a una extracción adicional con ácido fórmico al 90%. El extracto se almacenó diluido a ácido fórmico al 9%. Después, el extracto se analizó por SDS PAGE y RP-HPLC.

[0109] Especies de sinucleína se resolvieron en geles 2-D y se detectaron en transferencias de Western. Especies de alfa-sinucleína múltiples, incluyendo especies fosforiladas y truncadas, estaban presentes tanto en LBs como en fracción de cerebro soluble. Los truncamientos predominantes eran en la región C-terminal de la alfa-sinucleína en aproximadamente los aminoácidos 120-125. También se observó un fragmento más grande adicional escindido cerca del extremo C-terminal. No se detectó beta o gamma-sinucleína en el SIP a pesar de haberse encontrado en la fracción de proteína soluble. La alfa-sinucleína en la preparación LB difería de la de la fracción soluble en que tenía divisiones adicionales C-terminal, y que, en general las especies de alfa-sinucleína truncadas fueron enriquecidas en el LBS en relación con la fracción de proteína soluble. Además, múltiples especies de alfa-sinucleína de mayor masa molecular, aproximadamente 25-35 kDa, se detectaron sólo en la preparación LB. Los fragmentos C-terminal truncados son del mismo tamaño que los observados en el modelo de ratón transgénico del Ejemplo 1 que indica un papel en la patogénesis de la enfermedad.

[0110] Figs. 6A, B, C muestra extractos Tris sondeadas con diferentes anticuerpos, sujetos a electroforesis en gel 2-D y se sometieron a transferencia de Western. Las manchas oscuras presentes hacia la izquierda de las tablas representan alfa-sinucleína de longitud completa. La característica más notable es de cuatro puntos en el gráfico Syn-1 que están ausentes en el gráfico 8A5. Estos cuatro puntos representan formas truncadas de la alfa-sinucleína que son incapaces de unir el anticuerpo 8A5 debido a la falta de un aminoácido C-terminal. Estos truncamientos corresponden aproximadamente a las formas de SN entre 1-120 y 1-125. Varios puntos adicionales son vistos por debajo y adyacente a los lugares de la alfa-sinucleína de longitud completa. Las manchas debajo de los puntos de longitud completa probablemente representan truncamientos de menor importancia de C-terminal (es decir, sinucleína 1-X, donde X es 130-139). El punto adyacente a los puntos de longitud completa pero a la derecha representan una delección de menor importancia de N-terminal (debido a la falta de este punto en la transferencia con ELADW43).

[0111] Figs. 7A, B, C, D muestran transferencias con anticuerpos adicionales. Los cuatro puntos están presentes con 5C12 (109-120). Dos de los puntos están presentes con ELADW47 (118-123) y los puntos están ausentes con LB509 (115-123). Las manchas pueden diferir entre sí tanto en peso molecular como en la presencia o ausencia de la modificación postraducciona, tal como la nitración o fosforilación. Estos resultados fijan los sitios de escisión dentro de aproximadamente los aminoácidos 120-125 de la alfa-sinucleína. También son notables varios puntos ligeramente por debajo (peso molecular inferior) o a la derecha (pH más alto) que los puntos de sinucleína no modificados. Estos probablemente representan formas de sinucleína que se han sometido a un pequeño grado de truncamiento y/o diferente modificación postraducciona en relación con los puntos principales.

[0112] Fig. 8 resume los sitios de escisión con relación a los epítomos ligados por anticuerpos utilizados en la transferencia de Western.

[0113] Las Figs. 9A, B comparan las proteínas Tris solubles con proteínas extraídas de cuerpos de Lewy por electroforesis 2D y transferencias Western. La mancha de transferencia Tris de la izquierda muestra cuatro puntos en peso molecular más bajo que representan formas truncadas de la alfa-sinucleína (probablemente en el rango de

aminoácidos 1-120 So 1-125). Estos son de intensidad relativamente baja en comparación con los puntos representativos de alfa-sinucleína de longitud completa. La transferencia de proteínas a partir de cuerpos de Lewy muestra más manchas representativas de formas truncadas de alfa-sinucleína en el intervalo de 1-120 a 1-125. Sin embargo, estos son de mayor intensidad en relación con los puntos representativos de alfa-sinucleína de longitud completa. También, son evidentes dos manchas que migran más rápidamente que alfa-sinucleína de longitud completa pero más lentamente que la colección de puntos en la parte inferior de la mancha de transferencia. Estos puntos representan probablemente truncamientos en el rango de 1-X en la que X es 130-139 aminoácidos.

[0114] Figs. 10A, B, C, D muestran las inmunotransferencias de proteínas a partir de cuerpos de Lewy a las que se volvió a sondear con diferentes anticuerpos de C-terminal. Todos los puntos aparecen con Syn-1 (91-96) y 5C12 (109-120). Con ELADW47, el punto funcionando a la velocidad más rápida y la posición más básica de las manchas Syn-1 y 5C12 no se encuentra. En la transferencia LB509, todas las manchas de movimiento más rápido/más básicas en las otras manchas faltan o son débiles. La ausencia o reducción de la intensidad de ciertos puntos en las transferencias ELADW47 y LB509 indica que estos puntos representan formas truncadas de la alfa-sinucleína y son consistentes con la escisión que se produce aproximadamente entre los aminoácidos 120 y 125.

3. Detección de alfa-sinucleína agregada en un animal transgénico

[0115] Los animales transgénicos son sacrificados y los cerebros se retiran para el análisis neuroquímico y neuropatológico. Brevemente, el hemi-cerebro derecho se congela y se homogeneiza para las determinaciones de la inmunoreactividad de la alfa-sinucleína humana agregada y no agregada por transferencia Western (Masliah et al., Science (2000) 287:1265). El hemi-cerebro izquierdo se fija en 4% de paraformaldehído, en serie seccionada en el vibratome para inmunocitoquímica y análisis ultraestructural.

[0116] Las secciones de cerebro se inmunotñeron con un anticuerpo policlonal de conejo contra la alfa-sinucleína 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 Avidina D-peroxidasa de rábano (HRP) complejo (1: 200, ABC Elite, Vector). La reacción se visualizó con 0,1% 3,3 -tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) en 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) con 0,001% de H₂O₂ y secciones se montaron en portaobjetos bajo Entellan. Los niveles de inmunoreactividad se evaluaron semi-cuantitativamente por densitometría óptica usando el Quantimet 570C. Estas secciones también se estudian por análisis de imagen para determinar los números de inclusiones inmunorreactivas de alfa-sinucleína y esta medida fiable de la agregación de alfa-sinucleína actúa como un índice valioso de los efectos de anti-agregación (Masliah et al Science (2000) 287:1265).

[0117] 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 asociadas a microtúbulos de proteína 2 (mAP2) y se visualizaron con LSCM. El análisis adicional de la neurodegeneración se consigue mediante la determinación de la inmunoreactividad de tirosina hidroxilasa (TH) en el caudoputamen y la sustancia negra (SN) como se describe previamente (Masliah, et al. (2000)). Se obtuvieron imágenes de las secciones con el LSCM y cada imagen individual se procesa interactivamente de tal modo que se incluyen los terminales TH-inmunorreactivos que muestran la 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 área de % de la neurófila cubierta por terminales TH-inmunorreactivos. Estas mismas secciones también se utilizan para evaluar el número de neuronas TH en el SN.

4. Análisis de la alfa-sinucleína en pacientes LBD

[0118] Para determinar qué especies de -sinucleína se enriquecen en tejido de la enfermedad o son únicas a él, hemos examinado muestras de cerebro de pacientes con atrofia multisistémica (MSA) y mutación de la enfermedad de Parkinson familiar (A53T; Contursi). Fracciones de partículas de MSA y cerebro de Contursi se prepararon por homogeneización de tejido cerebral en Tris 50 mM, NaCl 140 mM y, o bien 1% de Triton (MSA) o 0,1% de NP40 (Contursi) respectivamente emparejadas por edad, pacientes de control ("normales") se prepararon idénticamente al cerebro con la enfermedad. Las muestras se analizaron en transferencias de Western de geles de 1-D y mediante ELISA tal como se describe a continuación, y también en los geles 2-D. Se analizó la parte de la fracción de partículas. El resto se hizo girar. También se analizó el sobrenadante. El sedimento se extrajo en urea de 7 M. Se analizó el sobrenadante de esta extracción. El granulado se extrajo adicionalmente en urea de 7 M /1% de SDS. Se analizó el sobrenadante. Transferencias de Western utilizando un anticuerpo para detectar alfa-sinucleína total o a específicamente alfa-sinucleína fosforilada en la posición 129 se muestran en la Fig. 11.

[0119] La sinucleína se fraccionó de manera diferente en Contursi frente al cerebro control. La mayor parte de la sinucleína en el cerebro normal era soluble después de la homogeneización en Tris tamponada sacarosa, pero casi toda la sinucleína en el cerebro Contursi requirió urea plus SDS para la solubilización sugiriendo una enorme cantidad de cuerpos de Lewy en este paciente. La sinucleína en el paciente Contursi era notablemente diferente de la del paciente de control en la cantidad de la fosforilación Ser 129. Sólo una pequeña cantidad de -sinucleína fosforilada se detectó en el paciente de control, mientras que el paciente Contursi tenía una cantidad

extremadamente grande de fosfo-sinucleína por comparación en las transferencias Western. Por lo tanto, la insolubilidad de sinucleína en el cerebro Contursi se asoció con un gran aumento en la fosforilación de sinucleína en ser 129. La -sinucleína en el paciente Contursi también difirió de la del cerebro normal en la distribución de los truncamientos de C-terminal. -Sinucleína truncada por C-terminal se observó tanto en fracción de control como partículas de cerebro Contursi. Sin embargo, todos los truncamientos detectables eran muy insolubles (urea/extracto de SDS) en el paciente Contursi, mientras que en el cerebro de control eran solubles (extracto de sucrosa tamponado tris). El enriquecimiento de la sinucleína truncada por C-terminal en una fracción enriquecida por LB de un paciente Contursi está de acuerdo con nuestro descubrimiento de enriquecimiento de sinucleína truncada por C-terminal en EDCL LBs. El cerebro MSA también se enriqueció en fosfo (ser 129)- sinucleína reveló truncamiento C-terminal y una abundancia de fosforilación y otras modificaciones ácidas también observadas en LBs. Los altos niveles de fosfo (ser 129) también se observaron en el cerebro de un paciente con relación EDCL a un control sin enfermedad. En un experimento separado, mayores niveles de fosfo (ser 129) (aproximadamente 30% mayor) también se observaron en células PEAK transfectadas con alfa-sinucleína que lleva una mutación A53T relativa con las células PEAK transfectadas con alfa-sinucleína humana de tipo salvaje.

5. Análisis de comportamiento en un animal transgénico

[0120] Para la actividad locomotora, los ratones se analizan durante 2 días en el rotarod (San Diego) Instruments, 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. El período de tiempo que los ratones permanecen en la varilla (Latencia de caída) se registra y se utiliza como una medida de la función motora.

[0121] Los ratones se ensayaron para la capacidad cognitiva en el laberinto de agua de Morris (Morris, Learn Motivat 12; 239-260 (1981)). En este procedimiento, el animal se coloca en una piscina circular llena de agua, con una plataforma de escape sumergida justo debajo de la superficie del agua. Un marcador visible se coloca en la plataforma para que el animal pueda encontrarlo navegando hacia una señal visual proximal. Como alternativa, se dará una forma más compleja de la prueba en la que no hay señales formales para marcar la ubicación de la plataforma para los animales. De esta forma, el animal debe aprender la ubicación de la plataforma con respecto a las señales visuales distales. La longitud de tiempo que el animal permanece en el agua está inversamente relacionado con su capacidad cognitiva.

6. Análisis de los agregados de fragmentos de alfa-sinucleína en una línea celular

[0122] Células neuronales GT1-7 (Hsue et al Am. J. Pathol. 157: 401-410 (2000)) se transfectan con un vector de expresión pCR3.1-T (Invitrogen, Carlsbad, CA) que expresa un fragmento truncado de alfa-sinucleína como se describió anteriormente murino alfa-sinucleína y en comparación con las células transfectadas con el vector de expresión solo. Células transfectadas con el vector solo tienen una apariencia fibroblástica mientras que las células transfectadas con alfa-sinucleína se redondean, con cuerpos de inclusión en la superficie celular visible a través tanto de microscopía de barrido confocal como de la luz. Células GT1-7 transfectadas se pueden utilizar para agentes de barrido para la actividad en la limpieza de inclusiones de sinucleína.

[0123] Los ejemplos anteriores son sólo ilustrativos y no definen la invención; otras variantes serán fácilmente evidentes para personas de experiencia ordinaria en la técnica. El alcance de la invención está abarcado por las reivindicaciones de cualquier patente que emane de este documento.

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo que se une específicamente a un fragmento 1-122 o 1-119 de la alfa-sinucleína, sin unirse específicamente a alfa-sinucleína de longitud completa como se define en SEQ ID nº 1, o un fragmento que induce este anticuerpo en el que el fragmento que induce el anticuerpo tiene menos de 20 aminoácidos de la alfa-sinucleína e incluye el C-terminal del fragmento 1-122 o 1-119 de la alfa-sinucleína.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es un anticuerpo humano o humanizado, preferiblemente de isotipo IgG1 humano.
- 15 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o el fragmento que induce el anticuerpo de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad de cuerpos de Lewy.
- 20 4. El anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en el diagnóstico de la presencia o la susceptibilidad a una LBD en el que el anticuerpo es para ser administrado a un paciente y el nivel de unión del anticuerpo en el paciente se va a determinar, en el que un mayor nivel de unión relativa a un nivel de línea de base en los individuos no enfermos indica la presencia o la susceptibilidad a la LBD.
- 25 5. Un fragmento de longitud completa alfa-sinucleína como se define en SEQ ID nº 1, que es la alfa-sinucleína 1-122 o 1-119.
- 30 6. El fragmento de la reivindicación 5, en donde el fragmento de alfa-sinucleína lleva una mutación asociada con una enfermedad hereditaria de Cuerpos de Lewy (LBD), opcionalmente una mutación A53T.
- 35 7. Un fragmento de la alfa-sinucleína tal como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6 ya sea en combinación con un adyuvante que aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos al fragmento, o unido a un portador que forma una proteína de fusión, donde el vehículo aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos al fragmento.
- 40 8. Un método de detección *in vitro* para un agente que tiene una actividad farmacológica útil para tratar una LBD que comprende:
 - la puesta en contacto del agente con un fragmento de la alfa-sinucleína como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6; y
 - 45 la determinación de la tasa o extensión de la agregación del fragmento de la alfa-sinucleína, en el que una reducción en la tasa o grado de agregación respecto a un control que carece del agente indica que el agente tiene la actividad farmacológica.
- 50 9. Un método *in vitro* de detección de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de un LBD, que comprende:
 - la puesta en contacto de una célula que expresa la alfa-sinucleína y el procesamiento de la alfa-sinucleína en un fragmento tal como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6 con dicho agente; y
 - 45 determinar un nivel del fragmento en la célula con relación a un nivel de línea de base en el mismo tipo de célula en ausencia del agente,
 - una reducción en el nivel del fragmento en relación con la línea de base que indica que el agente tiene la actividad farmacológica útil en el tratamiento de un LBD;
 - donde la célula es preferiblemente una célula humana, más preferiblemente una célula neuronal o una célula dopaminérgica.
- 55 10. Un método de detección de un agente que tiene una actividad farmacológica útil para el tratamiento de un LBD, que comprende la puesta en contacto de un animal transgénico no humano que expresa un fragmento de la alfa-sinucleína como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6 con el agente; y
 - determinar un nivel de formas agregadas del fragmento en el cerebro del animal transgénico en relación con un nivel
 - 60 de línea de base de formas agregadas del fragmento en un animal transgénico comparable en ausencia del agente,
 - una reducción en el nivel del fragmento de formas agregadas relativo a la línea de base que indica que el agente tiene una actividad farmacológica útil en el tratamiento de un LBD,
 - en el que el animal transgénico es preferiblemente un ratón o un *Drosophila*.
- 65 11. Un procedimiento de detección de un agente para una actividad farmacológica útil para el tratamiento de un LBD, que comprende
 - la puesta en contacto de un animal transgénico no humano que tiene un transgén que expresa alfa-sinucleína y el procesamiento de la alfa-sinucleína en un fragmento tal como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6 con el agente; y
 - determinar un nivel del fragmento en una célula neuronal con relación a un nivel de línea de base en ausencia del agente,

una reducción en el nivel de los fragmentos con respecto a la línea de base que indica que el agente tiene la actividad farmacológica útil para tratar el LBD.

12. Un animal transgénico no humano, preferiblemente un ratón o *Drosophila*, que tiene un genoma que comprende un transgén que comprende:
un promotor unido operativamente a un segmento de ácido nucleico que codifica un fragmento de la alfa-sinucleína como se define en una cualquiera de la reivindicación 5 o la reivindicación 6,
en donde la expresión del fragmento en el animal transgénico dispone el animal para desarrollar al menos una característica de un LBD,
en el que el promotor es preferiblemente un promotor PDGF, o
en el que al menos una característica es preferiblemente un deterioro de la función motora o un deterioro de la función cognitiva.

13. Un método *in vitro* de detección de presencia o la susceptibilidad a un LBD en un paciente, que comprende:

la detección de un nivel de un fragmento de la alfa-sinucleína como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6 en una muestra de líquido cefalorraquídeo,
un nivel mayor que un nivel de línea de base en los individuos no enfermos que indican la presencia o la susceptibilidad a LBD.

14. Un método de detección para una proteasa que escinde alfa-sinucleína intacta para formar un fragmento como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6 que comprende:

la identificación de un inhibidor de la proteasa;
la puesta en contacto del inhibidor con un extracto celular o tejido que contiene la proteasa, en el que la proteasa se une al inhibidor; y
la liberación de la proteasa del inhibidor,

opcionalmente en el que el inhibidor es un péptido de alfa-sinucleína que comprende un segmento contiguo de al menos 5 residuos de alfa-sinucleína intacta entre las posiciones 115 y 130, preferiblemente en el que el péptido comprende un segmento contiguo de al menos 5 residuos entre las posiciones 118 y 122, más preferiblemente en donde al menos uno de los residuos es un análogo de estado de transición.

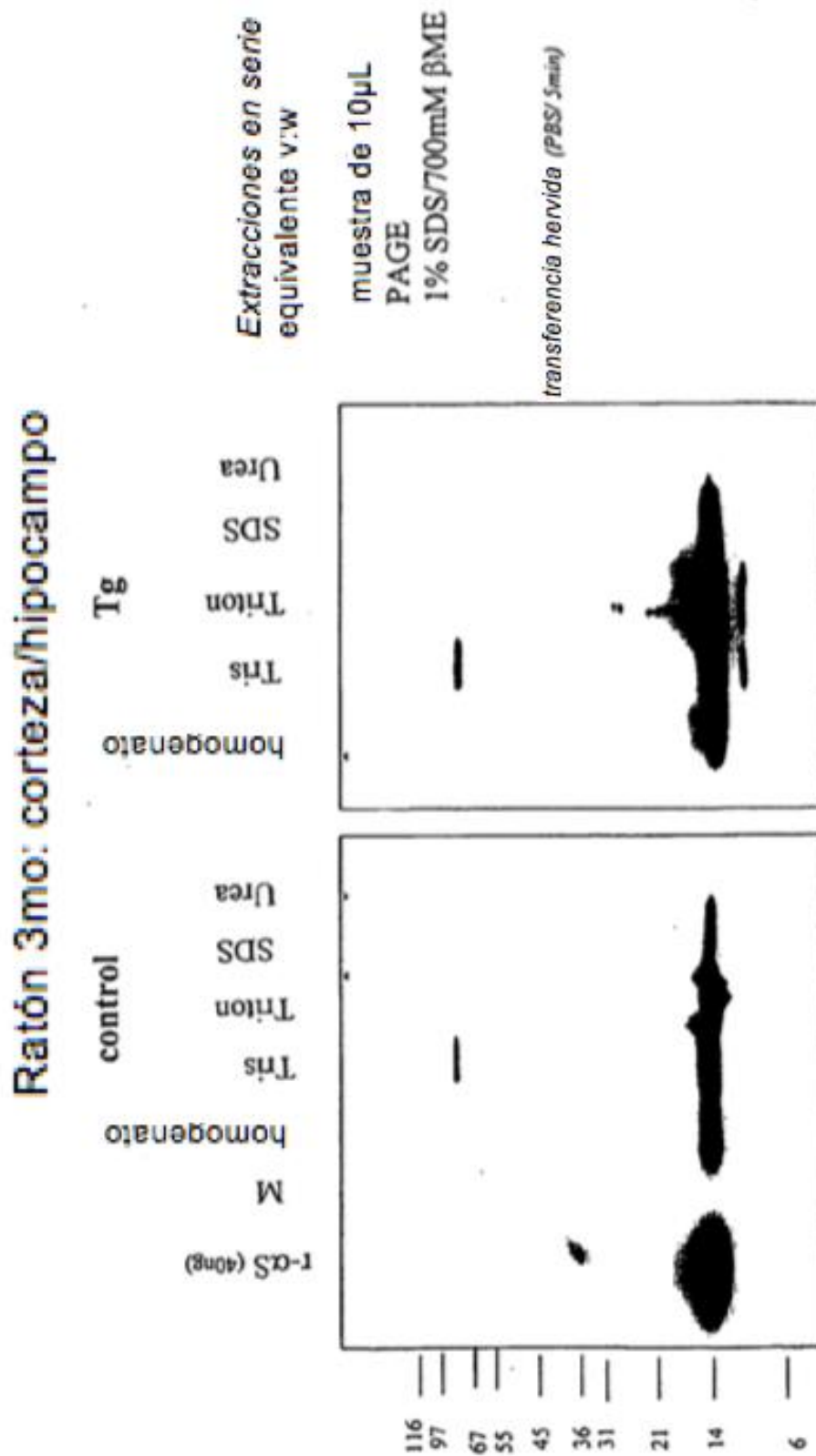
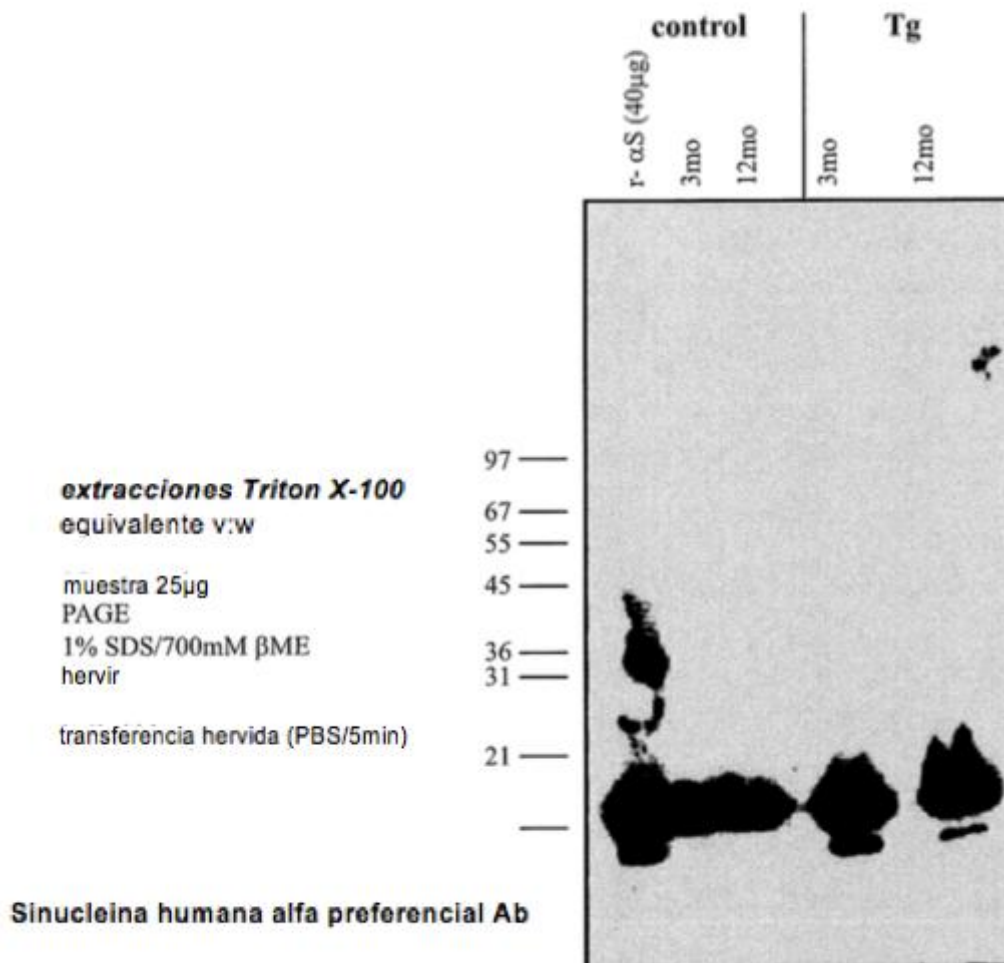


Fig. 1A Sinucleína humana alfa preferencial Ab

Fig. 2
ratón sinucleína: corteza y hipocampo
 ELADW-47 (aa 115 - 122) 1:300



Ratón 3mo: corteza y hipocampo

12C1 (aa 58-65) 1:300

control

Tg

r- α S (40 μ g)
M
homogenato
Tris
Triton
SDS
Urea

extracciones en serie
equivalente v:w

muestra 10 μ L
PAGE
1% SDS/700mM β ME
transferencia hervida (PBS/5min)

200 —
116 —
97 —
67 —
55 —
45 —
36 —
31 —
21 —
14 —
6 —

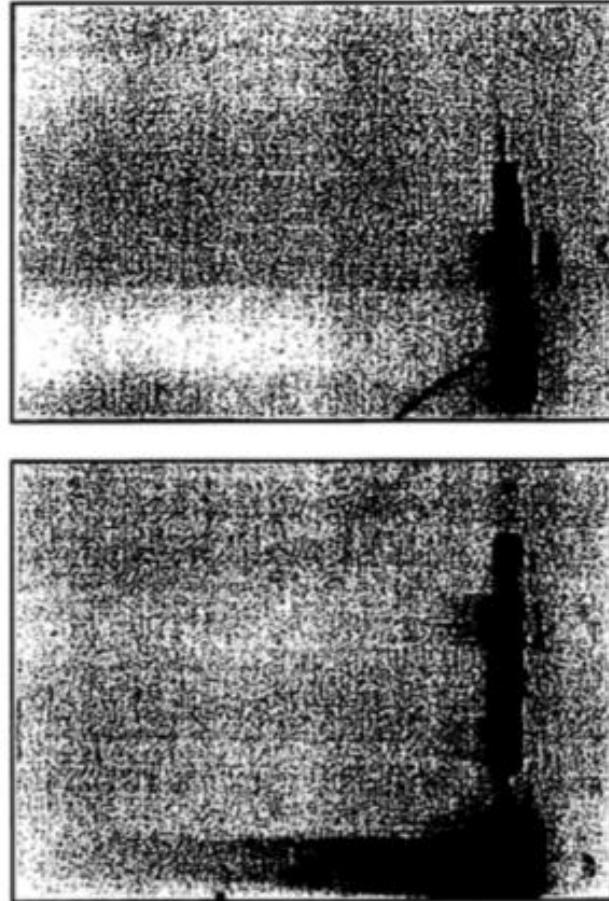


Fig. 3A

sinucleína alfa no específica Ab

Fig. 3B

Fig. 4
ratón sinucleína: corteza y hipocampo
 12C1 (aa 43-51; 58-65) 1:300

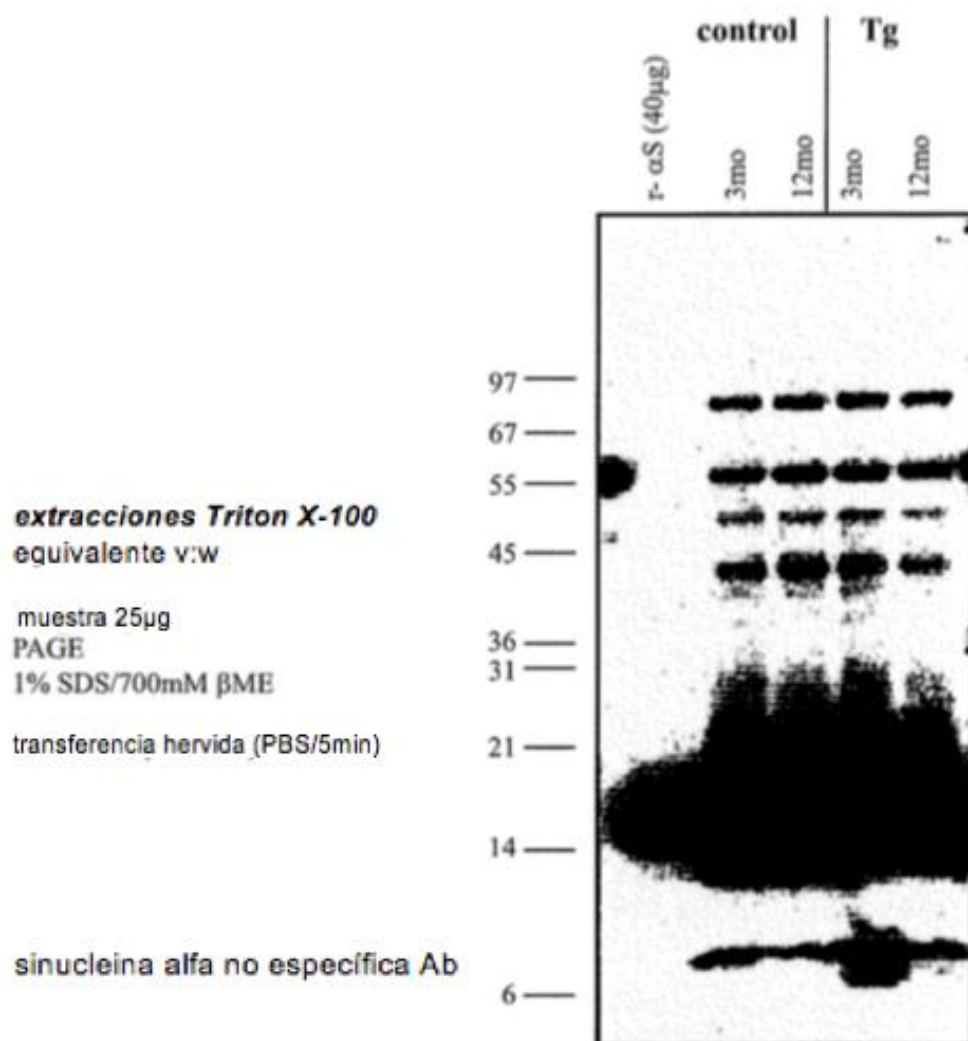
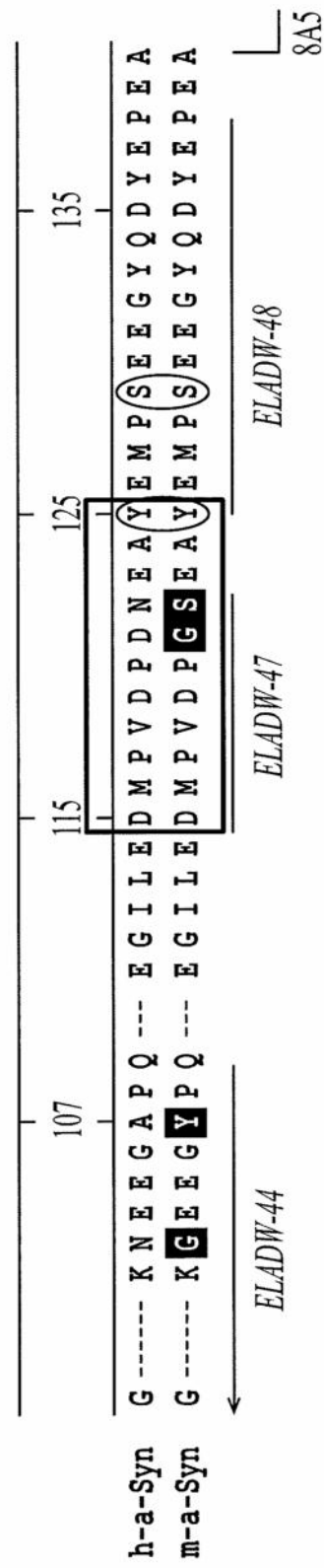


Fig. 5A



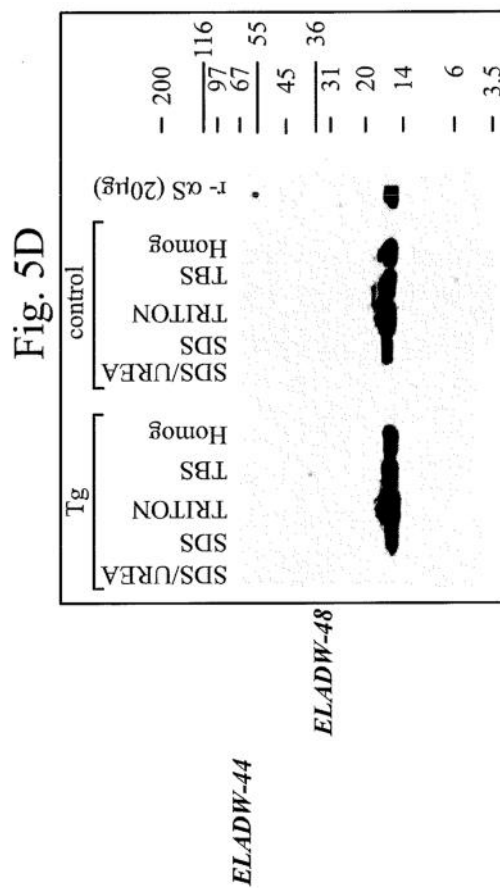


Fig. 5D

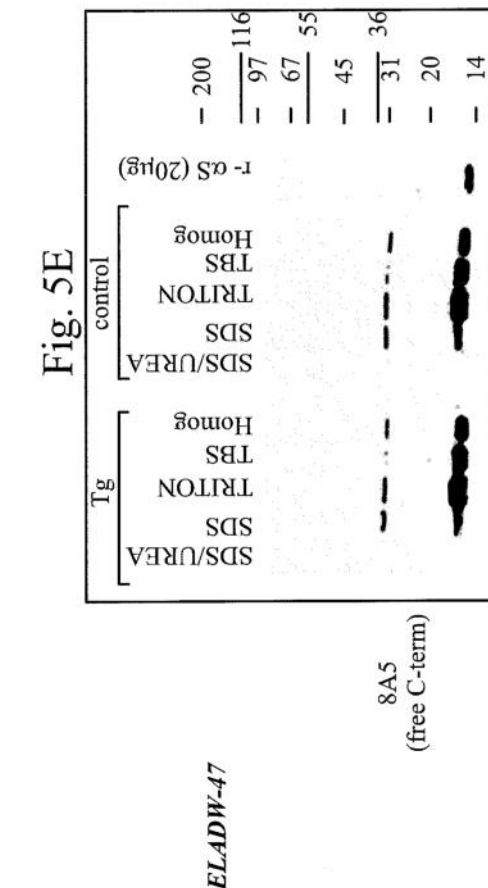
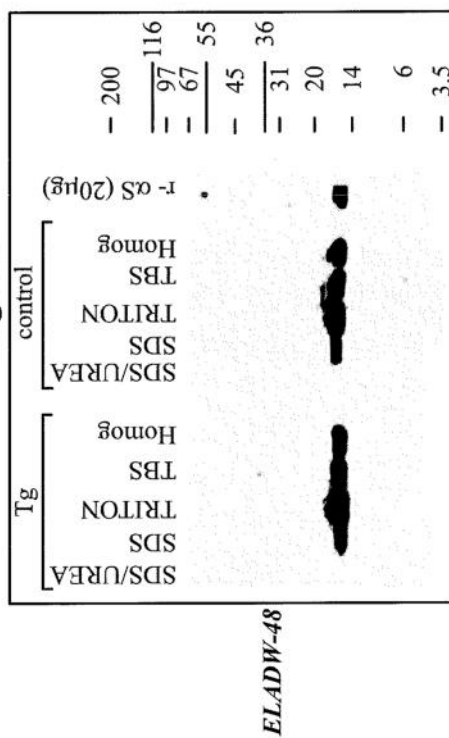
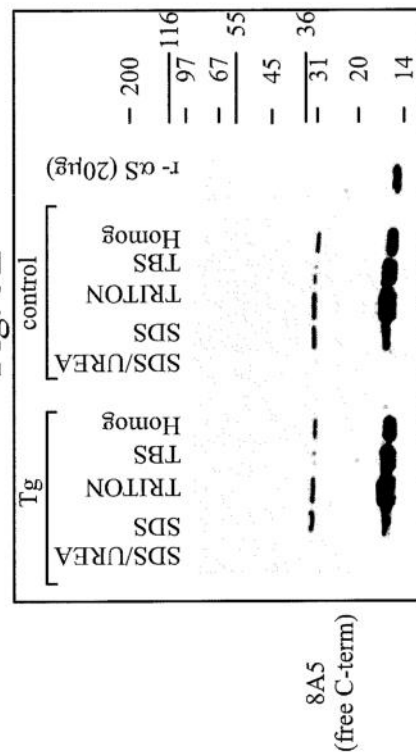


Fig. 5E



ELADW43 (aa 1 término de amino libre) 8A5 (aa 140 término de carboxi libre)



Fig. 6A

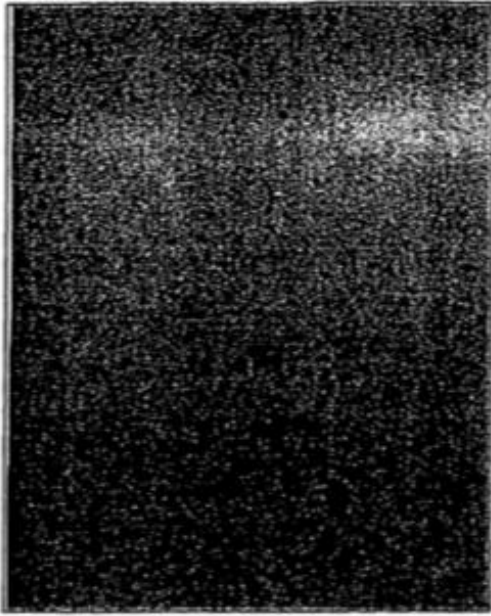


Fig. 6B



Syn-1 (aa 91-96) Fig. 6C

Resonda de inmunotransferencias de proteínas solubles Tris c/ anticuerpos C-término



Fig. 7A

Syn-1 (aa 91-96)



Fig. 7C

5C12 (aa 109-120)

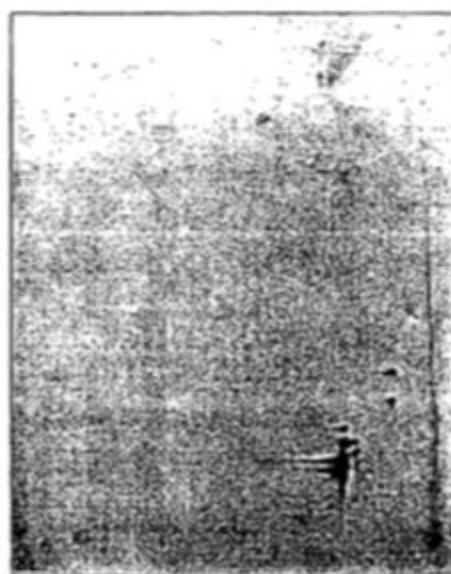


Fig. 7B

ELADW47 (aa 118-123)



Fig. 7D

LB509 (aa 115-123)

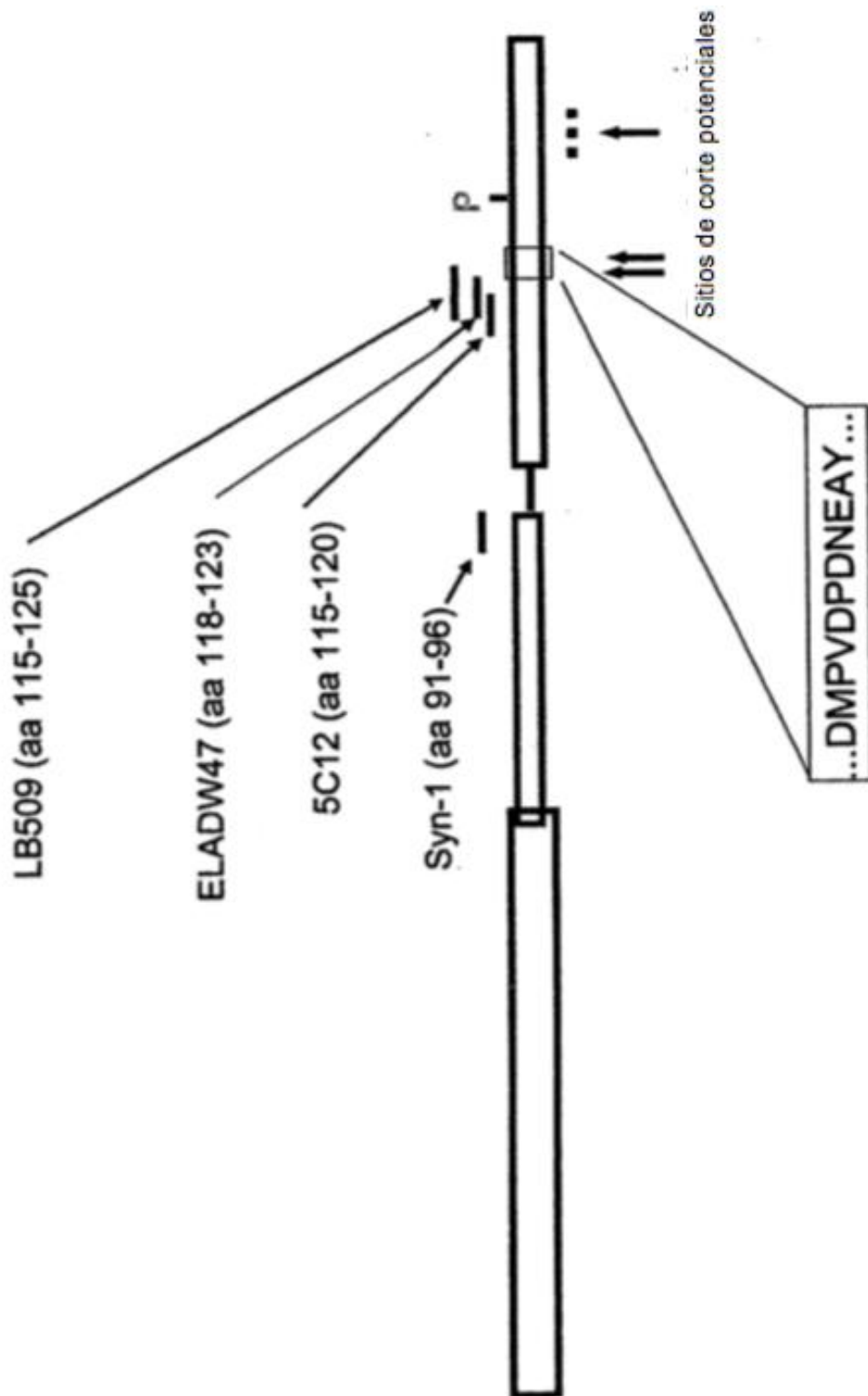


Fig. 8

Nuestros primeras transferencias de cuerpo Lewy

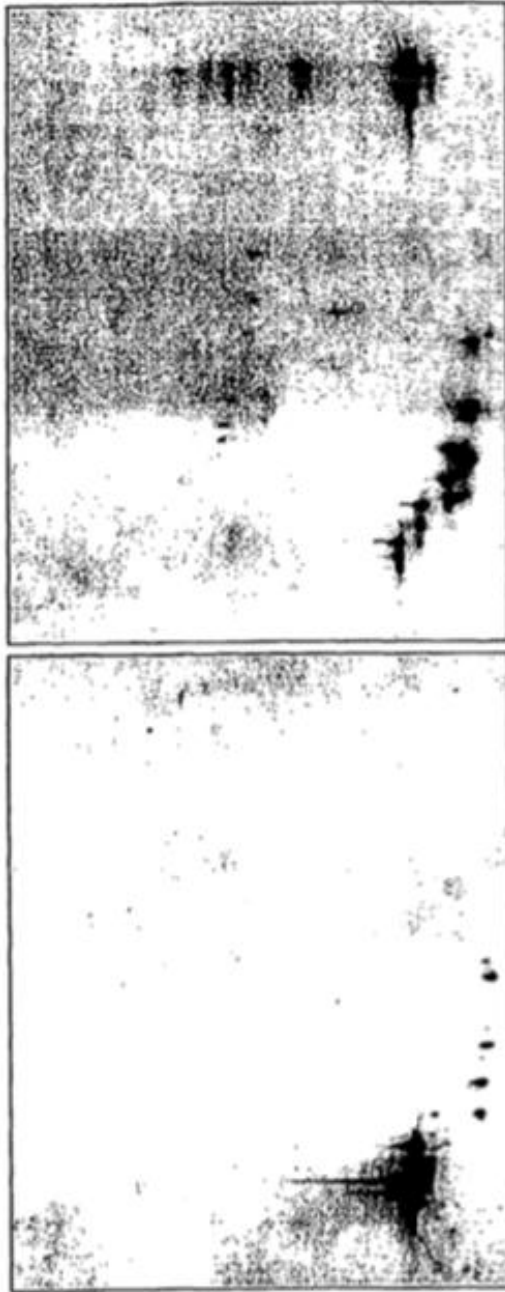


Fig. 9B

Fig. 9A

élan

Resonda de inmunotransferencias de extractos UTC de cuerpo de Lewy c/ anticuerpos C-término



Fig. 10A

Syn-1 (aa 91-96)



Fig. 10C

5C12 (aa 115-120)

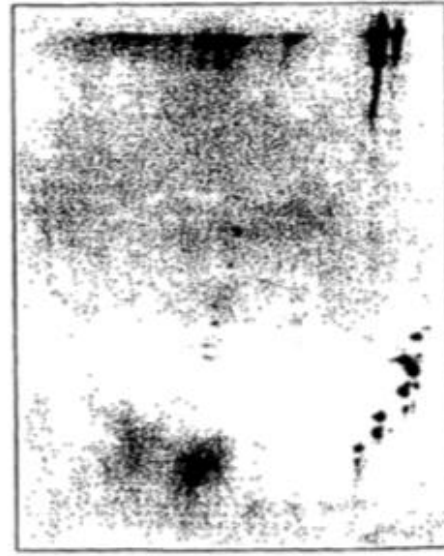


Fig. 10B

ELADW47 (aa 118-123)



Fig. 10D

LB509 (aa 115-125)

