

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 669**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00	(2006.01)
A01N 43/04	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)
C07K 1/00	(2006.01)
C07K 17/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
G01N 33/00	(2006.01)
A01K 67/00	(2006.01)
A01K 67/033	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2004 PCT/US2004/015836**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2005 WO05013889**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2004 E 04776059 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 1633189**

54 Título: **Fragmentos truncados de alfa-sinucleína en enfermedad con 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:
03.11.2017

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;
ANDERSON, JOHN, P. y
GAI, WEI PING**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 640 669 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fragmentos truncados de alfa-sinucleína en enfermedad con cuerpos de lewy**Antecedentes**

5 Las enfermedades con cuerpos de Lewy (EsCL) se caracterizan por la degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, discapacidad cognitiva y formación de cuerpos de Lewy (CL). (McKeith et al., Diagnóstico clínico y patológico de demencia con cuerpos de Lewy (DCL): Informe del Taller Internacional DCL, Neurología (1996) 47:1113-24). Las DsCL incluyen enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad difusa de cuerpos de Lewy (EDCL), variante de cuerpos de Lewy (VCL) de enfermedad de Alzheimer y EF combinada y enfermedad de Alzheimer (EA). La demencia con cuerpos de Lewy (DCL) es un término acuñado para reconciliar diferencias en la terminología de EsCL. Los trastornos con CL continúan siendo una causa común para trastornos motores y deterioro cognitivo en la población envejecida (Galasko et al., Correlaciones clínicas-neuropatológicas en enfermedad de Alzheimer y demencias relacionadas. Arch. Neurol. (1994) 51-888-95). Aunque su incidencia continúa creciendo creando un serio problema en la salud pública, hasta la fecha estos trastornos carecen de tratamientos aprobados (Tanner et al., Epidemiología de enfermedad de Parkinson y síndromes acinéticos, Curr. Opin. Neurol. (2000) 13:427-30). La causa de ECL es controvertido y se ha propuesto que múltiples factores juegan un papel, incluyendo varias neurotoxinas y factores de susceptibilidad genética.

20 EA, EP y DCL son los trastornos neurodegenerativos más comúnmente encontrados en las personas mayores. Los estudios epidemiológicos recientes han demostrado una relación clínica cercana entre EA y EP, ya que aproximadamente el 30% de pacientes de Alzheimer también tienen EP. En comparación con el resto de población envejecida, los pacientes con EA tienen más posibilidades de desarrollar EP simultánea. Además, los pacientes con EP que se han convertido en dementes normalmente han desarrollado EA clásica. Aunque cada enfermedad neurodegenerativa parece tener una predilección por regiones específicas del cerebro y poblaciones celulares, dando como resultado características patológicas distintas, EP, EA y DCL también comparten marcas distintivas patológicas comunes. Los pacientes con EA, síndrome de Down o EA esporádica desarrollan C_sL en la amígdala, que son las marcas distintivas neuropatológicas clásicas de EP. Además, cada enfermedad está asociadas con la degeneración de neuronas, conexiones sinápticas interneuronales y finalmente muerte celular, la disminución de neurotransmisores y acumulación anormal de proteínas mal plegadas, cuyos precursores participan en la función normal del sistema nervioso central. Los estudios bioquímicos han confirmado un enlace entre EA, EP y DCL.

35 En años recientes ha aparecido una nueva esperanza para entender la patogénesis de ECL. Específicamente, varios estudios han demostrado que la proteína sináptica alfa-sinucleína juega un papel principal en la patogénesis de EP ya que: (1) esta proteína se acumula en los CL (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) mutaciones en el gen alfa-sinucleína se segregan con formas familiares raras de parkinsonismo (Kruger et al., Nature Gen. (1998) 18:106-5; Polymeropoulos, et al., Science (1997) 276:2045-7) y (3) su sobreexpresión en ratones transgénicos (Masliah et al., Science (2000) 287:1265-9) y Drosophila (Feany et al., Nature (2000) 404-394-8) imita varios aspectos patológicos de EP. Así, el hecho de que la acumulación de alfa-sinucleína en el cerebro se asocia con alteraciones morfológicas y neurológicas similares en especies tan diversas como humanos y moscas sugiere que esta molécula contribuye al desarrollo de EP.

45 Las placas neuríticas que son el rasgo patológico clásico de EA consisten esencialmente en péptido amiloide beta (A β), un producto proteolítico aminoácido de la proteína precursora amiloidide (APP), y NAC, un fragmento proteolítico de aminoácido 35 de alfa-sinucleína. Tanto A β como NAC se identificaron primero en placas amiloides como fragmentos proteolíticos de sus respectivas proteínas de longitud completa, para las cuales se identificaron y clonaron los cADNs de longitud completa (Iwai A., Biochim. Biophys. Acta (2000) 1502:95-109; Masliah et al., AM. J. Pathol (1996) 148:201; Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:11282-6).

50 Alfa-sinucleína es parte de una familia amplia de proteínas que incluyen beta y gama sinucleína y sinoretina. Alfa-sinucleína se expresa en el estado normal asociado con sinapsis y se cree que juega un papel en plasticidad neurológica, aprendizaje y memoria. La mutaciones en alfa-sinucleína humana (h) que aumentan la agregación de alfa-sinucleína se han identificado (Ala3Pro y Ala53Thr) y se asocian con formas raras de formas autosómicas dominantes de EP. Se desconoce el mecanismo por el cual estas mutaciones aumentan la propensión de alfa-sinucleína para que se agreguen.

Resumen de la invención reivindicada

60 La invención proporciona métodos in vitro, como se define en la reivindicación 1, de investigación de un agente que tiene actividad farmacológica útil en el tratamiento de enfermedad de cuerpos de Lewy (ECL). El método incluye contactar el agente con un fragmento de alfa-sinucleína, donde el fragmento está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta; y determinar la velocidad o extensión de agregación del fragmento de alfa-sinucleína, donde una reducción en la

velocidad o extensión de agregación en relación con un control carente de agente indica que el agente tiene actividad farmacológica.

Opcionalmente, el fragmento tiene una terminal C en un residuo entre 118 y 125 de alfa-sinucleína intacta. Los fragmentos preferentes incluyen alfa-sinucleína 1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124 y 1-125 de alfa sinucleína. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína es 1-X donde X es 130-139. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína tiene una mutación asociada con un ECL hereditaria, como una mutación de A53T. Los métodos aquí desvelados pueden incluir un paso adicional de realización de un ensayo en un humano que tenga una ECL o un modelo animal de ECL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la ECL.

La invención además proporciona métodos, como se define en la reivindicación 2, de investigación de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de ECL (por ejemplo, enfermedad de Parkinson o DCL). Estos métodos comprenden contactar una célula que expresa alfa-sinucleína y procesar la alfa-sinucleína en un fragmento con un agente. El fragmento está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta. Entonces se determina un nivel del fragmento en la célula en relación con un nivel estándar en el mismo tipo de célula en ausencia del agente, una reducción en el nivel del fragmento en relación con el nivel estándar lo que indica que el agente tiene la actividad farmacológica útil en el tratamiento de una ECL. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína tiene una terminal C en un residuo entre 118 y 125 de alfa-sinucleína intacta. Los fragmentos preferentes son 1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124 y 1-125 de alfa sinucleína. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína es 1-X donde X es 130-139. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína tiene una mutación asociada con un ECL hereditaria, como una mutación de A53T. La célula puede ser una célula humana, una célula neuronal o una célula dopaminérgica. Opcionalmente, la célula es una célula PC12 o Sy5Y.

La invención proporciona además métodos, como se define en la reivindicación 3, para investigar un agente que tiene actividad farmacológica útil en el tratamiento de enfermedad de una ECL (por ejemplo, enfermedad de Parkinson o DCL). El método incluye contactar un animal transgénico no humano que expresa un fragmento de alfa-sinucleína con el agente, donde el agente está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta; y determinar el nivel de formas agregadas del fragmento en el cerebro del animal transgénico en relación con un nivel estándar de formas agregadas del fragmento en un animal transgénico comparable en ausencia del agente, una reducción en el nivel del fragmento de formas agregadas en relación con el nivel estándar lo que indica que el agente tiene la actividad farmacológica útil en el tratamiento de una ECL. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína tiene una terminal C en un residuo entre 118 y 125 de alfa-sinucleína intacta. Los fragmentos preferentes son 1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124 y 1-125 de alfa sinucleína. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína es 1-X donde X es 130-139. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína tiene una mutación asociada con un ECL hereditaria, como una mutación de A53T. Opcionalmente, el animal transgénico es un roedor. El animal transgénico puede también ser una Drosophila. Los métodos aquí desvelados pueden incluir la realización de un ensayo en un humano que tiene una ECL o un modelo animal de ECL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la ECL.

La invención proporciona además métodos, como se define en la reivindicación 4, para investigar un agente que tiene actividad farmacológica útil en el tratamiento de enfermedad de una ECL (por ejemplo, enfermedad de Parkinson o DCL). El método incluye contactar un animal transgénico no humano que tiene un transgén que expresa alfa-sinucleína y procesar la alfa-sinucleína en un fragmento con el agente, donde el agente está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta; y determinar un nivel del fragmento en una célula neuronal en relación con un nivel estándar en ausencia del agente, una reducción en el nivel de los fragmentos en relación con el nivel estándar lo que indica que el agente tiene la actividad farmacológica útil en el tratamiento de una ECL. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína tiene una terminal C en un residuo entre 118 y 125 de alfa-sinucleína intacta. Los fragmentos preferentes son 1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124 y 1-125 de alfa sinucleína. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína es 1-X donde X es 130-139. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína tiene una mutación asociada con un ECL hereditaria, como una mutación de A53T. Opcionalmente, el animal transgénico es un roedor, ratón o Drosophila. Los métodos aquí desvelados pueden incluir la realización de un ensayo en un humano que tiene una ECL o un modelo animal de ECL para determinar si el agente trata o inhibe un síntoma de la ECL.

La invención proporciona además un animal transgénico no humano, como se define en la reivindicación 5, que tiene un genoma que comprende un transgén que comprende un promotor unido operativamente con un segmento de ácido nucleico que codifica un fragmento de alfa-sinucleína donde el fragmento está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta; donde la expresión del fragmento en el animal transgénico predispone al animal a desarrollar al menos una característica de ECL. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína se selecciona del grupo consistente en 1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124 y 1-125. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína es

1-X donde X es 130-139. Opcionalmente, el promotor es un promotor PDGF. Opcionalmente, al menos una característica es una deficiencia de la función motora. Opcionalmente, al menos una característica del animal transgénico es una deficiencia en la función cognitiva. Opcionalmente, el animal transgénico es un roedor, ratón o *Drosophila*.

5 La invención proporciona además métodos in vitro, como se define en la reivindicación 6, para detectar la presencia o susceptibilidad a una ECL en un paciente. Los métodos incluyen detectar un nivel de un fragmento de alfa-sinucleína en una muestra de fluido cerebroespinal, donde el fragmento está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta. Un nivel mayor que el nivel estándar en individuos sanos indica la presencia o susceptibilidad a ECL.

15 La invención proporciona además un anticuerpo, como se define en la reivindicación 7, que se enlaza específicamente a un fragmento de alfa-sinucleína sin enlazarse específicamente con alfa sinucleína de longitud completa como se define en la SEQ ID NO. 1, donde el fragmento está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta. Los fragmentos preferentes incluyen 1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124 y 1-125 de alfa sinucleína. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína es 1-X donde X es 130-139. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. Opcionalmente, el anticuerpo es monoclonal. Opcionalmente, el anticuerpo tiene isotipo IgG1 humano.

25 La divulgación proporciona además métodos para diagnosticar la presencia o susceptibilidad a una ECL. Los métodos incluyen la administración a un paciente de un anticuerpo que se enlaza específicamente con un fragmento de alfa-sinucleína que tiene un terminal C libre en los residuos 119-125 sin enlazarse específicamente con sinucleína de longitud completa; y determinar un nivel de enlace del anticuerpo en los pacientes, donde un nivel más alta de enlace en relación con un nivel estándar en individuos sanos indica presencia o susceptibilidad a ECL.

30 La invención proporciona además un fragmento de alfa-sinucleína, como se define en la reivindicación 10, que está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta, para su uso en métodos para efectuar tratamientos o profilaxis de una ECL, cuyos métodos pueden comprender administrar a un paciente que sufre de o tiene riesgo de una ECL, un régimen efectivo del fragmento de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína es 1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124 y 1-125 de alfa sinucleína. Opcionalmente, el fragmento de alfa-sinucleína es 1-X donde X es 130-139. Opcionalmente, el método comprende además administrar un adyuvante que aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos al fragmento. Opcionalmente, el fragmento se une a un transportador que forma una proteína de fusión, donde el transportador aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos al fragmento.

40 El anticuerpo de la invención puede ser para uso en un método para efectuar un tratamiento o profilaxis de una ECL. El método puede incluir la administración a un paciente que está sufriendo de o en riesgo de una ECL un régimen efectivo de un anticuerpo que se enlaza con un fragmento de alfa-sinucleína, donde el fragmento se selecciona del grupo consistente en 1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124 y 1-125 y 1X, donde X es 130-139, sin enlazarse con alfa-sinucleína intacta, por lo que el anticuerpo efectúa profilaxis o tratamiento de la enfermedad.

45 La invención proporciona además un método, como se define en la reivindicación 12, de investigación de una proteasa que se adhiere a alfa-sinucleína intacta para formar un fragmento, donde el fragmento está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta. El método incluye identificar un inhibidor de la proteasa; contactar el inhibidor con un extracto celular o de tejido que contiene la proteasa, por lo que la proteasa se enlaza con el inhibidor; y liberar la proteasa del inhibidor. Opcionalmente, el inhibidor es un péptido de alfa-sinucleína que comprende un segmento continuo 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 en estado de transición.

50 La divulgación comprende además un anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente con un epítipo en los residuos 109-120 de alfa sinucleína. Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal es quimérico, humanizado o humano.

60 La divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente con un epítipo en los residuos 115-123 de alfa sinucleína.

65 La divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente con un epítipo discontinuo en los residuos 43-51 y 58-65 de alfa sinucleína. Opcionalmente, el anticuerpo es quimérico, humanizado o humano.

La divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente con alfa-sinucleína aislada de longitud completa que tiene una terminal C libre sin enlazarse específicamente con una proteína de fusión que comprende alfa sinucleína que tiene una terminal C unida a un segundo polipéptido. Opcionalmente, el anticuerpo es quimérico, humanizado o humano.

La divulgación proporciona además métodos para detectar la presencia o susceptibilidad a una enfermedad con cuerpos de Lewy en un paciente. Los métodos incluyen la determinación de un nivel de alfa-sinucleína fosforilada o nitrada en una posición 125 de alfa-sinucleína en una muestra de un cerebro de un paciente, un nivel elevado en relación con el nivel medio en una población de individuos sanos, lo que indica que el paciente tiene o es susceptible a una enfermedad con cuerpos de Lewy.

Breve descripción de las figuras

Las Figs. 1A y B muestran un ensayo de transferencia Western de varios extractos de la corteza e hipocampo de un ratón transgénico (B) y un control emparejado (A) con un anticuerpo policlonal que se enlaza con un epítipo en SN115-122.

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

Las Figs. 3A y B muestra un ensayo de transferencia Western con un anticuerpo diferente denominado 12C1 (un enlace monoclonal con epítipo en aminoácidos 43-51 y 58-65) de extractos de un Tritón del cerebro de un ratón transgénico de tres meses de edad (B) en comparación con un control de la misma edad (A):

La Fig. 4 muestra un ensayo de transferencia Western adicional con el mismo anticuerpo que en la Fig. 3 en un extracto de Tritón del cerebro de ratones transgénicos de tres y doce meses de edad.

Las Figs. 5A, B, C, D, E muestran ensayos de transferencia Western con cuatro anticuerpos diferentes (B, C, D, E) y un mapa de epítipos (A) de los sitios de enlace de los anticuerpos con varios extractos de los cerebros de ratones transgénicos.

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

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

La Fig. 8 resume los sitios de división en relación con los epítipos unidos por anticuerpos usados en el ensayo de transferencia Western.

Las Figs. 9A, B compara las proteínas solubles de Tris (A) con proteínas extraídas de cuerpos de Lewy (B) por electroforesis de gel y ensayo de transferencia Western.

Las Figs. 10^a, B, C, D muestran las inmunotransferencias de proteínas de cuerpos de Lewy que se han vuelto a sondar con varios anticuerpos de terminal C.

La Fig. 11 muestra ensayos de transferencia Western de varios extractos de un paciente sano y de Contursi sondado con un anticuerpo que reconoce alfa sinucleína total o específica para alfa sinucleína fosfo-129.

Definiciones

El término “agente” se usa 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 siendo sometidos a más evaluaciones terapéuticas, y compuestos que son miembros de colecciones y librerías que se van a investigar para una actividad farmacológica.

Una actividad “farmacológica” significa que un agente muestra una actividad en un sistema de investigación que indica que el agente es o puede ser útil en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad. El sistema de investigación puede ser in vitro, celular, animal o humano. Los agentes pueden describirse por tener actividad farmacológica a pesar de que se requieran más pruebas para establecer una utilidad profiláctica o terapéutica real en el tratamiento de una enfermedad.

En el contexto de determinaciones de peso molecular en base a electroforesis de gel, el término “aproximadamente” indica la desviación estándar de peso molecular esperada debido al error experimental en repeticiones del método bajo las mismas condiciones. La determinación de peso molecular de 12 kDa para ciertos fragmentos de alfa-sinucleína se aplica para la determinación usando un tampón de tricina.

La expresión “se enlaza específicamente” se refiere a una reacción de enlace que es determinante de la presencia de la proteína en presencia de una población heteróloga de proteínas y otras sustancias biológicas. Así, bajo condiciones designadas, un ligando especificado se enlaza preferentemente con una proteína particular y no se enlaza en una cantidad significativa con otras proteínas presentes en la muestra. Una molécula tal como un anticuerpo que se enlaza específicamente con una proteína tiene a menudo una constante de asociación de al menos 10^6 M^{-1} o 10^7 M^{-1} , preferentemente 10^8 M^{-1} a 10^9 M^{-1} , y más preferentemente aproximadamente 10^{10} M^{-1} a 10^{11} M^{-1} o mayor. Puede usarse una variedad de formatos de inmunoensayos 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) *Anticuerpos, Un Manual de Laboratorio*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos de inmunoensayos y condiciones que pueden usarse para determinar inmunoreactividad específica.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de sub-secuencias, si es necesario, y se designan los parámetros de programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula después la identidad secuencial porcentual para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros de programa designados.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante algoritmo de alineamiento por homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda para método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase generalmente Ausubel et al., supra).

Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar la identidad secuencial porcentual y similitud secuencial es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al. *J. Mo. Biol.* 215:403-410 (1990). Software para realizar análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional para Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo incluye primer identificar pares de secuencias de alta puntuación (PAP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coincide o satisface algún resultado de umbral con valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de resultado de palabra vecina (Altschul et al., supra). Estas correspondencias de palabra vecina inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar PAPs más largas que las contengan. Las correspondencias de palabra se extienden luego en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en tanto que el resultado de alineamiento acumulativo pueda aumentar. Los resultados acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleóticos, los parámetros M (resultado de recompensa para un par de residuos que coinciden; siempre > 0) y N (resultado de penalización para residuos que no coinciden; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos una matriz de puntuación se usa para calcular el resultado acumulativo. La extensión de las correspondencias de palabra en cada dirección se detienen cuando: el resultado de alineamiento acumulativo cae por la cantidad X desde su máximo valor conseguido; el resultado acumulativo llega a cero o por debajo de cero, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de clasificación negativa; o se alcance el final de cada secuencia. Para identificar si un ácido nucleico o polipéptido está dentro del alcance de la invención, los parámetros estándares de los programas BLAST son adecuados. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como estándares una longitud de palabra (W) de 11, una previsión (E) de 10, $M=5$, $N=4$, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de ácido nucleico, el programa BLASTP usa como estándares una longitud de palabra (W) de 3, una previsión (E) de 10, y la matriz de clasificación BLOSUM62. El programa TBLASTN (que usa una secuencia de proteína para secuencia de nucleótido) usa como estándares una longitud de palabra (W) de 3, una previsión (E) de 10, y una matriz de clasificación BLOSUM 62. (Véase Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

Además de calcular la identidad secuencial porcentual, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de probabilidad por la cual una pareja entre dos secuencias de nucleótido o aminoácido ocurriría 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 inferior a aproximadamente 0,1, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01, y más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

Con el fin de clasificar sustituciones de aminoácidos como conservadores o no conservadores, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): 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 la orientación de cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservadoras implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservadoras constituyen el intercambio de un miembro de una de las tres clases por un miembro de otra.

Los agentes terapéuticos de la invención son sustancialmente puro de contaminantes no deseados. Esto significa que un agente tiene típicamente al menos aproximadamente 50% p/p (peso/peso) de pureza, así como sustancialmente libre de proteínas y contaminantes interferentes. A veces, los agentes tienen al menos aproximadamente 80% p/p, más preferentemente 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.

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se usa para incluir anticuerpos intactos y fragmentos de enlace de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que se derivan para enlace específico con un fragmento de antígeno que incluye cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras Fab, Fab' F(ab')₂, Fabc y Fv. Los fragmentos se producen mediante técnicas recombinantes de ADN, o mediante separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. 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 diferentes de enlace. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivili & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:3125-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992):

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra junto con un antígeno aumenta la respuesta inmune del 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.

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

La competición entre anticuerpos se determina mediante un ensayo donde la inmunoglobulina bajo examen inhibe el enlace específico de un anticuerpo de referencia con un antígeno común, como alfa-sinucleína. Se conocen numerosos tipos de ensayo de enlace competitivo, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIE), radioinmunoensayo de enzima directo o indirecto en fase sólida (IEE), ensayo de competición sándwich (véase Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242-253 (1983); IEE biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614-3619 (1986)); ensayo etiquetado directo en fase sólida, ensayo sándwich etiquetado directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988); RIE etiquetado directo en fase sólida usando etiqueta I-125 (véase Morel et al., Molec. Immunol. 25(1):7-15 (1988)); IEE biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung et al., Virology 176:546-552 (1990)); y RIE etiquetado directo (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77-82 (1990)): Típicamente, tal ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que tienen algunos de estos, una inmunoglobulina de prueba no etiquetada y una inmunoglobulina de referencia etiquetada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de etiqueta unida a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Normalmente la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por ensayo de competición (anticuerpos competentes) incluyen anticuerpos que se enlazan al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se enlazan a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que ocurra un impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo competente está presente en exceso, inhibirá el enlace específico de un anticuerpo de referencia con un antígeno común en al menos 50 o 75%.

Las coordenadas de epítipo son aproximadas (± 2 aminoácidos). No todos los aminoácidos en un epítipo son necesariamente requeridos para enlace.

Las composiciones o métodos "que comprenden" uno o más elementos mencionados pueden incluir otros elementos no específicamente mencionados. Por ejemplo, una composición que comprende péptido de alfa-sinucleína abarca péptido asialdo de alfa-sinucleína y péptido de alfa-sinucleína como un componente de una mayor secuencia de polipéptido.

A menos que sea de otra manera aparente a partir del contexto, cada realización, elemento, etapa o característica de la invención puede usarse en combinación con otra.

Descripción detallada de la invención

I. General

5 La invención está basada en parte en la identificación de fragmentos nuevos de alfa-sinucleína en paciente con enfermedad con cuerpos de Lewy (ECL) y modelos de animal transgénico de los mismos. Estas enfermedades se caracterizan por la agregación de alfa-sinucleína. Los fragmentos tienen una terminal C truncada en relación con alfa-sinucleína de longitud completa. Algunos fragmentos se caracterizan por un peso molecular de aproximadamente 12 kDa como lo determina la electroforesis de gel SDS en tampón de tricina y un truncamiento de al menos diez aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína natural. El sitio de división preferentemente ocurre después del residuo 117 y antes del residuo 126 de alfa-sinucleína natural. La identificación de estos fragmentos nuevos de alfa-sinucleína tiene un número de aplicaciones en, por ejemplo, descubrimiento de fármacos, diagnósticos, terapias y animales transgénicos.

15 La invención proporciona varios métodos para investigar agentes para su actividad útiles en el tratamiento de EsCL. Algunos métodos identifican agentes que inhiben la reacción de división que genera los fragmentos nuevos de los aquí descritos. Otros métodos identifican agentes que inhiben la agregación de los productos de la reacción de división. Tales inhibidores son útiles en el tratamiento de EsCL. Los inhibidores de la reacción de división también son útiles para purificación por afinidad de la proteasa responsable de la reacción de división.

20 Aquí también se describen modelos de animales transgénicos y células que expresan fragmentos de alfa-sinucleína como se ha descrito anteriormente. Los modelos de animales transgénicos y células se disponen para desarrollar características de la enfermedad con cuerpos de Lewy, incluyendo cuerpos de Lewy que contienen agregación de los fragmentos. Los modelos animales pueden usarse en los métodos de investigación descritos anteriormente.

25 La invención proporciona además anticuerpos específicos de fines que se enlazan específicamente con fragmentos de alfa-sinucleína sin enlazarse específicamente con alfa-sinucleína intacta per se. Estos anticuerpos son útiles para representación de imágenes in vivo de agregaciones de alfa-sinucleína y también en métodos de tratamiento. Los fragmentos nuevos de alfa-sinucleína también pueden usarse en métodos de tratamiento, opcionalmente, en combinación con un adyuvante.

II. Fragmentos de alfa-sinucleína

35 Alfa-sinucleína human es un péptido de 140 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia de aminoácido:

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH
 GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDKQL
 40 GKNEEGAPQE GILEMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA
 (SEQ ID NO:1)

45 (Ueda et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:11282-6): Número de acceso a GenBank: P37840). La proteína tiene tres dominios reconocidos, un dominio de repetición KTKE que cubre aminoácidos 1-61, un dominio NAN (componente no amiloide) que recorre desde aproximadamente desde aminoácidos 60-95, y un dominio ácido de terminal C que recorre desde aproximadamente 98 a 140.

50 Algunos fragmentos nuevos aquí descritos tienen truncamientos en terminal C de al menos diez aminoácidos contiguos, preferentemente al menos 15 aminoácidos contiguos, y opcionalmente hasta 20, 22, 23 o 25 aminoácidos. Los fragmentos incluyen todos o sustancialmente todos (esto es, al menos 100 residuos contiguos de alfa-sinucleína diferente a la de la eliminación). Algunos fragmentos también tienen truncamientos relativamente cortos en la terminal N de hasta 20 aminoácidos, como eliminaciones de residuos 1-4, 1-6, 1-10 y 1-12. Algunos fragmentos tienen eliminaciones de terminal N de residuos 1-23, 1-38 o 1-45. Los fragmentos preferentes 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 preferentes son SN1-119, SN1-120, SN1-121, SN1-122, SN1-123, SN1-124 y SN1-125. Un fragmento especialmente preferente es SN1-119. La reacción de división ocurre preferentemente en un péptido unido entre los residuos de aminoácido 118 y 126, por ejemplo, entre el residuo 119 y 120. Otros fragmentos incluyen fragmentos de terminal N de alfa-sinucleína de aproximadamente 6 a 7 kDa (como lo determina electroforesis SDS) o 50-80 aminoácidos. Otros fragmentos incluyen fragmentos de terminal N o alfa-sinucleína que está libre de 1-10 aminoácidos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta, esto es, SN 1-X, donde X es 130-139. Algunos fragmentos se caracterizan por enlace específico con anticuerpos ELADW43 (terminal N libre) y 5C12 (109-120) y carecen de enlace específico con 8A5 (terminal C libre), LB509 (115-123) y ELAD47 (118-123). Algunos fragmentos se caracterizan por enlace específico con ELADW43 (terminal N libre) y 5C12 (109-120), LB509 (115-123) y ELAD47 (118-123) y carecen de enlace específico con 8A5 (terminal C libre). Algunos fragmentos se

caracterizan por enlace específico con ELADW43 (terminal N libre) y 5C12 (109-120), LB509 (115-123) y ELAD47 (118-123) y 8A5 (terminal C libre) y carecen de enlace con ELADW43 (terminal N libre).

5 Algunos fragmentos de alfa-sinucleína de longitud completa están fosforilados o nitrados en el residuo de tirosina que ocupa la posición 125 de alfa sinucleína. Los fragmentos que retienen el aminoácido serina 125 o alfa sinucleína de longitud completa también pueden fosforilarse en esta posición. La detección de una mayor fosforilación o nitración en la posición 125 o fosforilación en la posición 129 en un paciente en relación con la media en una población de individuos sanos es una indicación de una enfermedad con cuerpos de Lewy. La detección puede realizarse usando un anticuerpo específico para alfa-sinucleína fosforilada o nitrada en la posición 125. Se considera que un nivel es mayor si es superior a la media más una desviación estándar en una población de individuos sanos.

15 Los fragmentos aquí descritos son distintos del componente no-A β de amiloide de enfermedad de Alzheimer (NAC) previamente presentada. Este fragmento que consiste en al menos 28 residuos de aminoácido (residuos 60-87) y opcionalmente 35 residuos de aminoácido (residuos 61-95). Véase Iwai, et al., *Biochemistry*, 34:10145; Jensen et al., *Biochem. J.* 310 (Pt 1): 91-94 (1995); número de acceso GenBank S56746.

20 A menos que se indique lo contrario, la referencia a alfa-sinucleína o sus fragmentos incluyen la secuencia de aminoácido humano natural indicado anteriormente, o fragmentos de la misma, así como análogos que incluyen alélicos, especies y variantes inducidas. Los aminoácidos de análogos se asignan a los mismos números que los aminoácidos correspondientes en la secuencia humana natural cuando la secuencia análoga y humana se alinean al máximo. Los análogos típicamente difieren de péptidos que ocurren de manera natural en uno, dos o unas pocas posiciones, a menudo por virtud de sustituciones conservadoras. Algunas variantes alélicas naturales se asocian genéticamente con ECL hereditaria. Estas variantes incluyen A30P y A53T. La variación A53T se asocia con niveles mayores de fosforilación en la posición 129 de alfa sinucleína en un individuo que tiene la mutación en relación con la norma de fosforilación en individuos sanos que carecen de mutación. Los análogos muestran al menos 80 o 90% de identidad secuencial con péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos de terminal N o C en una, dos o unas pocas posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido glutámico natural puede sustituirse por ácido iso-aspartico. Ejemplos de aminoácidos no naturales son aminoácidos D, alfa, alfa-disustituídos, aminoácidos N-alquilo, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, gama-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetilisina, épsilon-N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, omega-N-metilarginina, β -alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido butírico gama-amino, homoserina, citrulina y ácido isoaspartico. Los análogos típicamente se enlazan específicamente con una población de anticuerpos policlonales generados contra alfa-sinucleína humana natural. La invención también proporciona D-péptidos, donde los D-aminoácidos pueden sustituirse por L-aminoácidos naturales de alfa-sinucleína en la mayoría o en todas las posiciones.

40 Alfa-sinucleína, sus fragmentos y análogos pueden sintetizarse mediante síntesis de péptido en fase sólida o expresión recombinantes, o pueden obtenerse de fuentes naturales. Los sintetizadores automáticos de péptido están disponibles en el mercado en numerosos proveedores, como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinantes puede ser en bacterias, como *E. coli*, levadura, células de insectos o células de mamíferos. Los procedimientos para expresión recombinante se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C. S. H. P. Press, NY 2ª Ed. 1989).

45 III. Enfermedades con cuerpos de Lewy

50 La enfermedad con cuerpos de Lewy (ECL) se caracteriza por la degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, discapacidad cognitiva y formación de cuerpos de Lewy (CL). (McKeith et al., *Diagnóstico clínico y patológico de demencia con cuerpos de Lewy (DCL): Informe del Taller Internacional DCL, Neurología* (1996) 47:1113-24). Los cuerpos de Lewy son depósitos esféricos de proteína encontrados en las células nerviosas. Su presencia en el cerebro afecta a la función normal del cerebro interrumpiendo la acción de mensajeros químicos incluyendo acetilcolina y dopamina. Las enfermedades con cuerpos de Lewy incluyen enfermedad de Parkinson (incluyendo enfermedad de Parkinson idiopática (EP)), enfermedad difusa de cuerpos de Lewy (EDCL) también conocida como demencia con cuerpos de Lewy (DCL), enfermedad combinada de Alzheimer y Parkinson y atrofia multisistémica (AMS). EDCL comparte síntomas con enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. EDCL difiere de la enfermedad de Parkinson principalmente en la localización de los cuerpos de Lewy. En EDCL los cuerpos de Lewy se forman principalmente en la corteza. En la enfermedad de Parkinson se forman principalmente en la sustancia negra. Otras enfermedades con cuerpos de Lewy incluyen fallo autonómico puro, disfagia por cuerpo de Lewy, ECL incidental, ECL hereditaria (por ejemplo, mutaciones del gen alfa-sinucleína, PARK3 y PARK4), y atrofia multisistémica (por ejemplo, atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome Shy-Drager).

60 IV. Animales transgénicos y células

65 La invención proporciona animales transgénicos no humanos que tienen un genoma que comprende un trasgén que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una forma truncada de terminal C de alfa-sinucleína como se ha descrito anteriormente. El trasgén está preferentemente presente en todas o

sustancialmente todas las células somáticas o de línea germinal del animal transgénico. El segmento de ácido nucleico que codifica la forma truncada de terminal C de alfa-sinucleína está operativamente unida a uno o más segmentos reguladores que permiten que la forma truncada de alfa-sinucleína se exprese en células neuronales del animal. Pueden usarse promotores como el promotor de enolasa específico de neurona de rata, promotor de gen beta-actina humano, promotor de gen de cadena de factor de crecimiento derivado de plaqueta humana B (PDGF-B), promotor de gen de canal de sodio de rata, promotor de gen de proteína básica de mielina de ratón, promotor de gen de dismutasa humana de cobre-superóxido de cinc, y promotor de gen regulador de dominio POU de mamífero. El promotor PDGF es particularmente adecuado. Opcionalmente, se usa un promotor inducible. El promotor de metalotionina de ratón, que puede regularse mediante la adición de metales pesados como cinc al agua o dieta del ratón, es adecuado. Tales animales transgénicos pueden producirse mediante las mismas técnicas generales descritas por (Masliah et al., *Am. J. Pathol.* (1996) 148:201-10 y Feany et al., *Nature* (2000) 404:394-8) para 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 tienen un transgén que expresa una proteína de alfa-sinucleína truncada pueden cruzarse con otros modelos de animales transgénicos de enfermedad neurogénica, como modelos de enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, los animales transgénicos que tienen un transgén que expresa una proteína de alfa-sinucleína truncada pueden cruzarse con animales transgénicos que tienen un transgén APP expresado con una mutación FAD como se describe, por ejemplo, en 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. Usa* 94, 13287-13292 (1997); Sturchlet-Pierrat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Borchelt et al. *Neuron* 19, 939-945 (1997)). El procedimiento para realizar tal cruce lo describe, por ejemplo, Masliah et al., *PNAS USA* 98:12245-12250 (2001), que presenta un cruce entre ratones transgénicos que expresan un alfa-sinucleína de longitud completa con ratones PDAPP como lo describe Games et al. Los animales transgénicos de la invención son preferentemente roedores, como ratones o ratas, o insectos, como *Drosophila*.

La expresión de formas truncadas de alfa-sinucleína en modelos animales da lugar a animales dispuestos para desarrollar al menos una característica de enfermedades con cuerpos de Lewy. Tales características incluyen mayores niveles de depósitos intracelulares de alfa-sinucleína, mayor formación de cuerpos de Lewy, y funciones cognitivas y motoras deficientes en relación con animales no transgénicos normales de la misma especie. Tales animales transgénicos son útiles para investigar agentes para actividad farmacológica en el tratamiento de enfermedad con cuerpos de Lewy.

La divulgación también proporciona células transformadas con alfa-sinucleína truncada que forman cuerpos de inclusión que contienen alfa-sinucleína truncada agregada. Las células transformadas son preferentemente células neuronales, como células neuronales GT1-7 (Hsue et al., *Am. J. Pathol.* 157:401-410 (2000)), células PC12 o células de neuroblastoma S5Y5. También pueden usarse células PEAK. Las células son preferentemente células humanas. Un vector que comprende un segmento que codifica una forma truncada de alfa-sinucleína unido a una o más secuencias reguladoras que aseguran la expresión de la expresión truncada se transfecta a las células. Las células transfectadas pueden usarse para investigar agentes para actividad en el despeje de inclusiones de alfa-sinucleína.

V. Métodos de investigación

La invención proporciona varios métodos de investigación para identificar agentes que tienen una actividad farmacológica útil en el tratamiento de ECL. Los métodos incluyen exploraciones que pueden hacerse in vitro, en células o animales transgénicos, y que prueban una variedad de parámetros como una indicación de actividad. Los agentes que se determinan que tienen una actividad en estas exploraciones vuelven a probarse en exploraciones secundarias de modelos animales de ECL o en ensayos clínicos para determinar su actividad contra síntomas conductuales o de otro tipo de estas enfermedades.

1. In vitro

Los ensayos in vitro se realizan para probar la capacidad de un agente para inhibir la agregación de formas truncadas de alfa-sinucleína. El formato básico para analizar la agregación in vitro de alfa-sinucleína, aunque en el contexto de alfa-sinucleína de longitud completa, lo describe (Wood, *J. Biol. Chem.* 274, 19509-19512 (1999)). En los métodos presentes, el ensayo se realiza en presencia de una gente que se está probando. La velocidad o extensión de agregación de alfa-sinucleína en presencia de un agente se determina y compara con la velocidad o extensión de agregación de alfa-sinucleína en un control contemporáneo o histórico donde el agente se omitió. Una reducción en la velocidad o extensión de agregación en presencia del agente en relación con el control indica que el agente tiene actividad en la inhibición de agregación de formas truncadas de alfa-sinucleína. Esta actividad es potencialmente útil en el tratamiento o prevención de enfermedades con cuerpos de Lewy.

2. Ensayos celulares

Algunos ensayos celulares se realizan en células transfectadas con ácidos nucleicos que codifican formas truncadas de alfa-sinucleína como se ha descrito anteriormente, opcionalmente con una variante hereditaria, como Ala30Pro o Ala53Th. Tales células contactan con un agente bajo prueba, y se mide la velocidad y extensión de

agregación de la alfa-sinucleína truncada. La velocidad o extensión de agregación de alfa-sinucleína se comparan después con las de las células de control similarmente transfectadas en ausencia del agente. La agregación puede controlarse mediante análisis inmunohistoquímico, microscopia con luz o análisis con gel. El análisis con gel puede detectar formación de dímeros, trímeros u oligómeros mayores así como inhabilidad de sinucleína para entrar en los geles debido al alto nivel de oligomerización. Una reducción en la velocidad o extensión de agregación en presencia del agente de prueba en relación con el control indica que el agente tiene una actividad farmacológica en la inhibición de agregación de formas truncadas de alfa-sinucleína. Esta actividad es potencialmente útil en el tratamiento o prevención de enfermedades con cuerpos de Lewy.

Otros ensayos celulares se realizan en células transfectadas con ácidos nucleicos que codifican alfa-sinucleína de longitud completa, opcionalmente con una variante hereditaria, como Ala30Pro o Ala53Thr. Tales células contactan con un agente bajo prueba, y se miden la velocidad o extensión de formación de formas truncadas de alfa-sinucleína y/o formas fosforiladas o nitradas de sinucleína. La presencia de estas formas puede detectarse mediante ensayo de transferencia Western usando uno o más anticuerpos para alfa-sinucleína. Los anticuerpos con fines específicos (esto es, anticuerpos que se enlazan con una forma truncada sin enlazarse a alfa-sinucleína de longitud completa) son particularmente útiles para esta análisis. Las colecciones de anticuerpos que tienen diferentes especificidades de epítipo pueden también usarse. Por ejemplo, la presencia de formas truncadas de alfa-sinucleína puede mostrarse por la presencia de bandas cuando se manchan con anticuerpos que reconocen un epítipo terminal N de un segmento de aminoácido definido aproximadamente por aminoácidos 118-125 de alfa-sinucleína intacta, y, carecen de bandas cuando se manchan con un anticuerpo que reconoce un epítipo terminal C de esta región. La velocidad o extensión de formación de formas truncadas de alfa-sinucleína y/o formas fosforiladas o nitradas en presencia de agente se compara con las de las células control comparables en presencia de agente. Una reducción en la velocidad o extensión de formación de formas truncadas de alfa-sinucleína en presencia del agente de prueba en relación con el control indica que el agente tiene una actividad farmacológica que inhibe el proceso de alfa-sinucleína a sus formas truncadas. Esta actividad es útil para el tratamiento o prevención de ECL.

3. Ensayos con animales transgénicos

Los animales transgénicos tienen un transgén que expresa una forma truncada de alfa-sinucleína como se ha descrito anteriormente, opcionalmente con una variación hereditaria, como Ala30Pro o Ala53Th. Tal animal contacta con un agente bajo prueba, y la velocidad y extensión de agregación de la forma truncada de alfa-sinucleína se mide en comparación con la de un control contemporáneo o histórico. El control es normalmente un animal transgénico similar o de la misma especie que no se ha expuesto al agente. La agregación de alfa-sinucleína en un animal transgénico puede controlarse mediante ensayo de transferencia Western o inmunohistoquímica como se ha descrito en los ejemplos. Alternativamente o adicionalmente, la actividad del agente en tales animales transgénicos puede determinarse a partir de características conductuales como características motoras o cognitivas, como se describe en los ejemplos. En tales ensayos, la actividad farmacológica del agente se muestra por las características motoras y cognitivas mejoradas (esto es, disminución de la deficiencia de tales características) en relación con un animal transgénico control no expuesto al agente.

Se realizan otros ensayos en animales transgénicos que tienen un transgén que expresa una forma de alfa-sinucleína de longitud completa, opcionalmente con una variación hereditaria, como Ala30Pro o Ala53Th. Tales animales contactan con un agente bajo prueba, y se detectan la velocidad y extensión de aparición de formas truncadas de alfa-sinucleína, opcionalmente con una variación hereditaria, como Ala30Pro o Ala53Th. Tales formas se detectan usando ensayo de transferencia Western o análisis de inmunohistoquímica usando anticuerpos apropiados anti-alfa-sinucleína (como se ha descrito para ensayos celulares). La velocidad y extensión de aparición de formas truncadas de alfa-sinucleína y/o formas fosforiladas o nitradas se compara con la velocidad o extensión de aparición de tales formas en un control contemporáneo o histórico que constituye un animal transgénico comparable que no haya sido expuesto al agente. Una reducción en la velocidad o extensión de aparición de formas truncadas de alfa-sinucleína en el animal expuesto al agente de prueba en relación con el control indica que el agente tiene actividad en la inhibición del proceso de alfa-sinucleína de longitud completa a formas truncadas.

4. Agentes que se investigarán

Los agentes que se investigarán incluyen anticuerpos para alfa-sinucleína, péptido de alfa-sinucleína, fármacos de los que se conozca o sospeche que tienen actividad en el tratamiento de ECL, productos naturales y bibliotecas combinatorias. Los péptidos preferentes de alfa-sinucleína son péptido relativamente cortos de 30, 25, 20, 10 o menos aminoácidos que incluyen aminoácidos 118-125 de alfa-sinucleína. Opcionalmente, un aminoácido inmediatamente en el lado de terminal N del sitio de división que general formas truncadas de terminal C de alfa-sinucleína se sustituye por un aminoácido análogo en estado de transición que forma un enlace no hidrolizable entre los aminoácidos que flanquean el sitio de división, por ejemplo, aminoácido 119 de alfa sinucleína. Ejemplos de análogos son análogos en estado de transición como estatina, hidroxieteleno, hidroxietelamina, AHPPA, ACHPA y derivados de los mismos. Uno o más aminoácidos de secuencia natural de alfa-sinucleína pueden también sustituirse por otros aminoácidos naturales.

Los productos naturales que se investigarán también pueden obtenerse del Depósito de Productos Naturales del Instituto Nacional de Cáncer, Bethesda, MD. Las bibliotecas arbitrarias de péptidos u otros compuestos también pueden investigarse para su idoneidad. Las librerías combinatorias pueden producirse para muchos tipos de compuestos que pueden sintetizarse de una manera por etapas. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de giro beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas oligoméricas sustituidas por N y oligocarbamatos. Las librerías combinatorias grandes de los compuestos pueden construirse mediante el método de librerías sintéticas codificadas (LSC) descrito en Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93/06121, Columbia University, WO 98/08051, Pharmacopeia, WO 95/35503 y Scripps, WO 95/30642. Las bibliotecas de péptidos también pueden generarse mediante métodos de exposición de fagos. Véase, por ejemplo, Devlin, WO 91/18980. Las bibliotecas combinatorias y otros compuestos pueden investigarse inicialmente para idoneidad determinando su capacidad para enlazarse con alfa-sinucleína.

VI. Ensayos de toxicidad

Pueden usarse estrategias análogas a las descritas en los ensayos de investigación para determinar si fármacos, alimentos, toxinas ambientales y otros compuestos existentes ejercen efectos tóxicos por medio de la promoción de procesamiento de alfa-sinucleína, fosforilación y agregación. Tales ensayos se realizan de la misma manera que los ensayos de investigación. La actividad tóxica se indica por el resultado opuesto a la actividad farmacológica en los ensayos de investigación.

VII. Aislamiento de proteasa

El procesamiento de alfa-sinucleína de longitud completa a las formas truncadas aquí descritas se efectúa mediante proteasa. La proteasa puede purificarse usando un inhibidor identificado por los métodos de investigación analizados anteriormente. Un inhibidor preferente es un péptido de alfa-sinucleína que incluye residuos 117-126 donde una terminal N de residuo en el sitio de división se ha sustituido por un análogo en estado de transición. Tal inhibidor se usa como un reactivo de purificación por afinidad para purificar la proteasa de extractos de células del cerebro. Tales células pueden obtenerse del cadáver de un individuo normal o uno que haya sufrido una enfermedad con cuerpos de Lewy. Los niveles de proteasa pueden estar elevados en éste último. La proteasa puede someterse a ensayo presentándola con un sustrato de alfa-sinucleína y controlando la formación de productos de división. El sustrato puede ser, por ejemplo, la forma humana natural de alfa-sinucleína descrita anteriormente, un fragmento del mismo que contenga residuos que flanquean ambos lados del sitio de división o una forma mutante del mismo donde la mutación se asocia con una forma hereditaria de ECL. Opcionalmente, la terminal C del sustrato puede inmovilizarse a la fase sólida, y la terminal N a una etiqueta. La división del sustrato libera la etiqueta a la fase líquida. La fase líquida puede separarse fácilmente de la fase sólida, y la cantidad de etiqueta cuantificada como una medida de actividad proteolítica.

VIII. Anticuerpos con fin específico

La invención proporciona anticuerpos con fin específico. Tales anticuerpos se enlazan específicamente con una forma truncada de alfa-sinucleína (en la terminal C), preferentemente una forma seleccionada del grupo consistente en SN1-118, SN1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124, 1-125 o 1-126, sin enlazarse específicamente con alfa-sinucleína de longitud completa. Tales anticuerpos son útiles para representación de imágenes in vivo de depósitos de alfa-sinucleína, como agentes terapéuticos (véase más abajo), y para detectar productos de división que resultan de división proteolítica de alfa-sinucleína en los métodos de investigación descritos anteriormente. Los anticuerpos con fines específicos también se proporcionan a los fragmentos correspondientes de terminal C, por ejemplo, 118-140, 119-140, 120-140, 121-140, 122-140, 123-140, 124-140, 125-140 y 126-140. Los anticuerpos con fin específico reconocen la terminal N de estos fragmentos de tal manera que se enlazan específicamente con los fragmentos sin enlazarse específicamente con alfa-sinucleína de longitud completa.

Tales anticuerpos pueden generarse inmunizando un animal de laboratorio con alfa-sinucleína o un fragmento de la misma para inducir anticuerpos, e investigando los anticuerpos resultantes para identificar aquellos que tengan la especificidad de enlace deseada. Opcionalmente, la inmunización puede realizarse con péptidos relativamente cortos de menos de 20 aminoácidos que incluyen la terminal C de los fragmentos truncados de los aquí descritos (por ejemplo, SN 99-118 o SN 110-119). Opcionalmente, tales péptidos cortos se unen a un transportador que ayuda a obtener una respuesta inmune.

Opcionalmente, el enlace específico con un fragmento truncado etiquetado o inmovilizado puede realizarse en competición con alfa-sinucleína de longitud completa. Opcionalmente, las bibliotecas grandes de anticuerpos pueden investigarse simultáneamente usando la técnica de exposición de fago.

La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, de ratón, cerdo de guinea, primate, conejo o rata, puede realizarse como se ha descrito en Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988). El adyuvante completo de Freud seguido de adyuvante incompleto es preferente para inmunización de animales de laboratorio. Los conejos y cerdos de guinea se usan típicamente para hacer anticuerpos monoclonales.

Los ratones se usan típicamente para hacer anticuerpos monoclonales. El enlace puede evaluarse, por ejemplo, mediante ensayo de transferencia Western o ELISA. El fragmento más pequeño para mostrar enlace específico con el anticuerpo define el epítipo del anticuerpo. Alternativamente, la especificidad del epítipo puede determinarse mediante un ensayo de competición donde un anticuerpo de prueba y uno de referencia compiten para enlazarse con alfa-sinucleína. Si los anticuerpos de prueba y referencia compiten, entonces se enlazan con el mismo epítipo o epítopos lo suficientemente próximos de tal manera que el enlace de un anticuerpo interfiera con el enlace del otro.

Los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen la misma especificidad y afinidad de enlace o similar a la de un ratón u otro anticuerpo no humano que proporcione el material de inicio para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera o pesada se han construido típicamente mediante ingeniería genética a partir de segmentos de gen de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) e los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos (C), como IgG1 e IgG4. IgG1 de isotipo humano es preferente. En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humano. Los anticuerpos IgM también pueden usarse en algunos métodos. Un anticuerpo quimérico típico es por lo tanto una proteína híbrida consistente en el dominio de enlace de antígeno o V de un anticuerpo de ratón y el dominio efector o C de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos humanizados tienen residuos de estructura en región variable sustancialmente de un anticuerpo humano (denominado un anticuerpo receptor) y regiones que determinan complementariedad sustancialmente de un anticuerpo de ratón (referido como inmunoglobulina de donante). Véase, Queen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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. Estas regiones constantes, si están presentes, son sustancialmente o completamente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos se eligen normalmente de anticuerpos humanos cuyas secuencias de estructura muestran un alto grado de identidad secuencial con los dominios de región variable de ratón de los que se derivan CDRs. Los residuos de estructura de región variable de cadena pesada y ligera pueden derivarse de las mismas o diferentes secuencias de anticuerpo humano. Las secuencias de anticuerpo humano pueden ser las secuencias de anticuerpos que ocurren de manera natural o pueden ser secuencias por consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Carter et al., WO 92/22653. Ciertos aminoácidos de residuos de estructura de región variable humana se seleccionan para sustitución en base a su posible influencia en formación de CDR y/o enlace con antígeno. La investigación de tales posibles influencias es por modelaje, examinación de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, observación empírica de los efectos de sustitución y mutagénesis de aminoácidos particulares.

Los anticuerpos humanos contra alfa-sinucleína se proporcionan mediante una variedad de técnicas descritas más abajo. Algunos anticuerpos humanos se seleccionan mediante experimentos de enlace competitivo, o de otra manera, para que tengan la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular. Las técnicas para producir anticuerpos humanos incluyen la metodología trioma de Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, Patente de Estados Unidos N° 4.634.664; y Engelman et al., Patente de Estados Unidos N° 4.634.666, uso de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del lugar de inmunoglobulina humana como lo describe 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 exposición 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.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos pueden unirse al menos a una parte de la región constante humana. La elección de región constante depende, en parte, de si se desea toxicidad mediada por complemento dependiente de anticuerpo y/o celular. Por ejemplo, los isótopos IgG1 e IgG3 tienen actividad complementaria e isotipos IgG2 e IgG4 no tienen. La elección de isotipo también puede afectar al paso del anticuerpo al cerebro. El isotipo humano IgG1 es preferente. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden expresarse en tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla donde los dominios variables de cadena pesada y ligera se unen a través de un separador.

También se proporcionan anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente a un epítipo en los residuos 109-120 o 115-124 o alfa sinucleína, o un epítipo discontinuo en los residuos 43-51 y 68-65, o con fin específico en la terminal C de alfa-sinucleína, incluyendo formas humanizadas, quimérica y humanas de los mismos. Un anticuerpo con fin específico para la terminal C de alfa-sinucleína puede reconocerse por la capacidad para enlazarse específicamente con alfa-sinucleína como una proteína libre sin enlazarse específicamente con alfa sinucleína como un componente de una proteína de fusión cuando la terminal C de alfa-sinucleína se une a un segundo péptido. Estos anticuerpos pueden investigarse para actividad terapéutica, y si se obtienen resultados positivos, pueden usarse en métodos terapéuticos. Los anticuerpos también pueden usarse en la detección de fragmentos de alfa-sinucleína como se ha descrito anteriormente.

IX. Diagnóstico

La divulgación proporciona métodos de representación de imágenes de CsL in vivo en un paciente. Tales métodos son útiles en el diagnóstico o confirmación de diagnóstico de una enfermedad con cuerpos de Lewy de EP o susceptibilidad de la misma. Por ejemplo, los métodos pueden usarse en un paciente que presente síntomas de demencia. Si el paciente tiene CsL, entonces el paciente tiene probabilidad de sufrir una enfermedad con cuerpos de Lewy. Los métodos también pueden usarse en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos anormales de amiloide indica susceptibilidad a futura enfermedad sintomática. Los métodos también son útiles para controlar la progresión de la enfermedad y/o respuesta al tratamiento en pacientes a los que se les ha diagnosticados previamente enfermedad con cuerpos de Lewy.

Los métodos funcionan administrando un anticuerpo con fin específico como se ha descrito anteriormente que se enlaza con alfa-sinucleína en el paciente y después detectando el anticuerpo al que se ha unido. Si se desea, puede evitarse una respuesta de despeje usando fragmentos de anticuerpo que carezcan de una región constante de longitud completa, como Fabs. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir como reactivo de tratamiento y de diagnóstico.

Los reactivos de diagnóstico pueden administrarse mediante inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro mediante inyección intracraneal o taladrando un agujero a través del cráneo. La dosis de reactivo debería estar dentro de los mismos rangos que para métodos de tratamiento. Típicamente, el reactivo se etiqueta, aunque en algunos métodos el reactivo primario con afinidad para alfa-sinucleína no tiene etiqueta y se usa un agente de etiquetado secundario para enlazarse con el reactivo primario. La elección de la etiquetad depende de los medios de detección. Por ejemplo, una etiqueta fluorescente es adecuada para detección óptica. El uso de etiquetas paramagnéticas es adecuado para detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Las etiquetas radioactivas también pueden detectarse usando PEC o SPECT.

El diagnóstico se realiza comparando el número, tamaño y/o intensidad de lugares etiquetados con valores correspondientes de la línea base. Los valores de la línea base pueden representar los valores medios en una población de individuos sanos. Los valores de la línea base también representan niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de la línea base pueden determinarse en un paciente antes de comenzar el tratamiento, y los valores medidos después compararse con los valores de la línea base. Una disminución en los valores en relación con la línea base señala una respuesta positiva al tratamiento.

Los anticuerpos con fin específico también son útiles para determinar si las formas truncadas de alfa-sinucleína están presentes en fluido cerebroespinal u otros tejidos o fluidos. La presencia de tales formas en niveles significativamente más altos (esto es, mayores que la media más una desviación estándar) en un paciente en relación con el nivel normal en una población de individuos sanos es indicativo de presencia o susceptibilidad a una ECL.

X. Métodos de tratamiento

La divulgación proporciona varios métodos para prevenir o tratar enfermedad con cuerpos de Lewy en pacientes que sufren o tienen riesgo de tal enfermedad. Los agentes terapéuticos incluyen las formas truncadas de alfa-sinucleína descritas anteriormente, y fragmentos de la misma efectivas para inducir anticuerpos, anticuerpos con fin específico o procesamiento proteolítico de alfa-sinucleína como se ha descrito anteriormente. Las técnicas generales para administrar agentes a pacientes que sufren o están en riesgo de ECL se describen en las solicitudes co-pendientes USSN 60/423.012 presentada el 1 de noviembre, 2002, y PCT US00/15239 presentada el 1 de junio, 2000 y PCT/US03/34527, presentada el 31 de octubre, 2003.

Los pacientes dispuestos a tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad de una ECL pero que no muestren síntomas, así como pacientes que muestran síntomas. Por lo tanto, los métodos presentes pueden administrarse profilácticamente a individuos que tengan un riesgo genético a una ECL. Tales individuos incluyen aquellos que tengan familiares que hayan experimentado esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo esté determinado por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia EP incluyen mutaciones en alfa-sinucleína o Parkin, UCHL1 y genes CYPD6; particularmente mutaciones en las posiciones 30 y 53 del gen de alfa-sinucleína. Los individuos que en el presente sufren enfermedad de Parkinson pueden reconocerse a partir de sus manifestaciones clínicas que incluyen temblor mientras duermen, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural.

En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos o factores de riesgo de cualquier enfermedad amiloidogénica diferente a la 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 de amiloide extracelular. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos o factores de riesgo de enfermedad de Alzheimer. En algunos métodos, el paciente tiene enfermedad de Alzheimer simultánea y una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el paciente tiene simultáneamente enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Normalmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcanza los 40, 50, 60 o 70 años de edad. El tratamiento típicamente conlleva múltiples dosis durante un periodo de tiempo. El tratamiento pueden controlarse sometiendo a ensayo un anticuerpo, o respuestas activadas por célula T o célula B a un agente terapéutico (por ejemplo, una forma truncada de péptido de alfa-sinucleína) durante un tiempo. Si la respuesta cae, se indica una dosis adicional.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible de, o de otra manera en riesgo de una ECL en un régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición o medicamento suficiente para eliminar o reducir el riesgo, reducir la severidad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo los 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 o medicamentos se administran a un paciente sospechoso de, o que ya sufre tal enfermedad en un régimen que comprende una frecuencia de administración de la composición suficiente para curar, o al menos parcialmente detener 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 realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente efectiva. Una combinación de cantidad y frecuencia de dosis adecuada para realizar el tratamiento terapéutico y profiláctico se define como un régimen terapéuticamente o profilácticamente efectivo. Tanto en regímenes profilácticos como terapéuticos, los agentes se administran normalmente en varias dosis hasta que se haya conseguido una respuesta inmune suficiente. Típicamente, la respuesta inmune se controla y se dan repetidas dosis hasta que la respuesta inmune comienza a disminuir.

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

Las dosis efectivas de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las condiciones anteriormente descritas, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un humano pero también pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento necesitan titularse para optimizar la seguridad y eficacia.

En algunos métodos, el agente es un fragmento truncado de alfa-sinucleína o un fragmento del mismo capaz de inducir anticuerpos a alfa-sinucleína. La cantidad de tal fragmento depende de que también se administra adyuvante, siendo requeridas dosis más altas en ausencia de adyuvante. La cantidad de un fragmento para administración a veces varía de 1-500 μg por paciente y más generalmente 5-500 μg por inyección para administración humana. Ocasionalmente, se usa una dosis más alta de 1-2 mg por inyección. Típicamente, se usan 10, 20, 50 o 100 μg para cada inyección humana. La masa de fragmento también depende de la proporción de masa de epítipo inmunogénico dentro del fragmento con la masa del fragmento como un todo. Típicamente, se usan de 10^{-3} a 10^{-5} micromoles de epítipo inmunogénico para un microgramo de fragmento. La elección del momento de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, una vez al año o una vez cada década. Un día dado en el que se da la dosis de inmunogen, la dosis es mayor que 1 μg /paciente y normalmente mayor que 10 μg /paciente si también se administra adyuvante, y mayor que 10 μg /paciente y normalmente mayor que 100 μg /paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguido de inyecciones de recuerdo en intervalos de tiempo. Otro régimen consiste en una inmunización seguido de inyecciones de recuerdo 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen implica una inyección cada dos meses durante toda la vida. Alternativamente, las inyecciones de recuerdo pueden tener una base irregular como lo indica un control de la respuesta inmune.

Los fragmentos truncados de alfa-sinucleína también pueden administrarse 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 inmunogenes oscilan entre 10 ng y 1 g, 100 ng y 100 mg, 1 μg y 10 mg o 30-300 μg ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían entre 10-100 o más viriones por dosis.

Algunos métodos implican una inmunización pasiva con un anticuerpo con fin específico. En tales métodos, los rangos de dosis oscilan entre aproximadamente 0,001 y 100 mg/kg, más normalmente entre 0,01 y 5 mg/kg de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser 1mg/kg peso corporal o 10 mg/kg o en el rango de 1-10 mg/kg o, en otras palabras, 70 mg o 700 mg o en el rango 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 métodos, dos o más anticuerpos monoclonales se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado corresponde a los rangos indicados. El anticuerpo se administra normalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser cada semana, cada mes o cada año. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles de sangre de anticuerpo con alfa-sinucleína en un paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de 1-100 µg/ml y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse en una formulación con liberación prolongada, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja en intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo largo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se necesita una dosis relativamente alta en intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Los agentes terapéuticos pueden administrarse mediante medios parentales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intratecales, interperitoneales, intranasales o intramusculares. La ruta más típica de administración de un agente inmunogénico es subcutánea aunque otras rutas pueden ser igualmente efectivas. La siguiente ruta más común es inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza típicamente en los músculos del brazo o pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. La inyección intramuscular o infusión intravenosa son preferentes para la administración del anticuerpo. En algunos métodos, los anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos se administran como una composición o dispositivo de liberación prolongada, como el dispositivo Medipad™. Las moléculas pequeñas que actúan inhibiendo el procesamiento de proteasa de alfa-sinucleína pueden administrarse intravenosamente si las moléculas pequeñas pasan a través de la barrera hematoencefálica lo suficiente para eficacia terapéutica o profiláctica o directamente al cráneo de otra manera.

Los agentes de la invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente efectivos en el tratamiento de ECL. Los agentes de la invención también pueden administrarse junto con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera hematoencefálica.

Los agentes inmunogénicos se administran algunas veces junto con un adyuvante. Pueden usarse una variedad de adyuvantes en combinación con un péptido, como alfa-sinucleína, para obtener una respuesta inmune. Los adyuvantes preferentes aumentan la respuesta intrínseca a un inmunogen sin causar cambios conformacionales en el inmunogen que afectan a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferentes incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, lípido monofosforil 3 De-O-acilado A (MPL™) (véase GG 2220211 (RIBI ImmujoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un glicósido triterpeno o saponina aislada de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina encontrado en Sudamérica (véase Kensil et al., en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente de Estados Unidos N° 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes como lípido monofosforil A (véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997), polímeros plurónicos y micobacterias eliminadas. Otro adyuvante es CpG (WO 98/40100). Alternativamente, alfa-sinucleína puede acoplarse a un adyuvante. Sin embargo, tal acople no debería cambiar sustancialmente la conformación de alfa-sinucleína como para afectar a la naturaleza de la respuesta inmune de la misma. Los adyuvantes pueden administrarse como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse por separado, antes, simultáneamente con o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferente de adyuvantes es las sales de aluminio (alum), como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin agentes específicos inmunoestimulantes como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos como ácido poliglútamico o polilisina. Otra clase de adyuvantes son las formulaciones con emulsiones de aceite-en-agua. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin agentes específicos inmunoestimulantes como péptidos de muramil (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP),), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) theramida™), u otros componentes de pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite-en-agua incluyen (a) MF59 (WO 90/14837), que contiene 5% Escualeno, 0.5% Tween 80, y 0.5% Span 85 (que opcionalmente contiene varias cantidades de MTPPE) formulado en partículas sub-micrón usando un microfluidizador como el microfluidizador Modelo 110 (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene 10% Escualeno, 0.4% Tween 80, 5% polímero de bloque plurónico L121, y thr-MDP, bien microfluidizado en una emulsión sub-micrón o en un vórtice para generar una emulsión con un tamaño mayor

de partícula, y (c) sistema de adyuvante RibitTM (RAS), (Ribit ImmunoChem, Hamilton, MT) que contiene 2% escualeno, 0.2% Tween 80, y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo consistente en lípido monofosforil (LMF), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (EPC), preferentemente LMF + EPC (DetoxTM).

Otra clase de adyuvante preferente es los adyuvantes de saponina, como StimulonTM (QS-21, Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas a partir de los mismos como ISCOMs (complejos inmunestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen RC-529, GMCSF y Adyuvante de Freund Completo (AFC) y Adyuvante de Freund Incompleto (AFI). Otros adyuvantes incluyen citoquinas, como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13 e IL-15), factor estimulador de colonia de macrófagos (M-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y factor de necrosis tumoral (TNF). Otra clase de adyuvante es los análogos de glicolípido que incluyen N-glicosilados, N-glicosiureas y N-glicosilcarbamatos, cada uno de los cuales sustituido en el residuo del azúcar por un aminoácido, como inmuno-moduladores o adyuvantes (véase patente de Estados Unidos N° 4.885.283). Las proteínas de choque térmico, por ejemplo HSP70 y HSP90, también pueden usarse como adyuvantes.

Un adyuvante puede administrarse con un fragmento de alfa-sinucleína como una única composición, o puede administrarse antes, simultáneamente o después de la administración de alfa-sinucleína. El fragmento de alfa-sinucleína y el adyuvante pueden empaquetarse y suministrarse en el mismo vial o pueden empaquetarse en viales separados y mezclarse antes de su uso. El fragmento de alfa-sinucleína y adyuvante se empaquetan típicamente por separado con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica pretendida. Si el fragmento de alfa-sinucleína y el adyuvante se empaquetan por separado, el empaquetado típicamente incluye instrucciones para mezclarlos antes de su uso. La elección del adyuvante y/o transportador depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la ruta de administración, el programa de dosis, la eficacia del adyuvante para la especie que se está vacunando y, en humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es el que se ha aprobado o es aprobable para administración humana por parte de los cuerpos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante de Freund completo no es adecuado para administración humana. Alum, MPL y QS-21 son preferentes. Opcionalmente, dos o más adyuvantes diferentes pueden usarse simultáneamente. Las combinaciones preferentes incluyen alum con MPL, alum con QS-21, MPL con QS-21, MPL o RC-529 con GM-CSF, y alum, QS-21 y MPL juntos. También puede usarse adyuvante de Freund incompleto (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alum, QS-21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

Los agentes de la invención a menudo se administran como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, esto es, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1980). La forma preferente depende del modo pretendido de administración y la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, transportadores o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona para que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, tampón fosfato salino fisiológico, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros transportadores, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos o no inmunogénicos y similares.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes de lenta metabolización como proteínas, polisacáridos como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (como SepharoseTM de látex funcionalizado, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido y agregados lípidos (como gotitas de aceite o liposomas). Además, estos transportadores pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (esto es, adyuvantes).

Para administración parenteral, los agentes de la invención pueden administrarse como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente farmacéuticamente aceptable con un transportador farmacéutico que pueda ser un líquido estéril como aceites en agua, salina, glicerol o etanol. Además, sustancias auxiliares, como agentes humectantes o emulsionantes, surfactantes, sustancias de amortiguación de pH y similares pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de composiciones farmacéuticas son aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles como glicol de propileno y glicol de polietileno son transportadores líquidos preferentes, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos pueden administrarse en forma de una inyección con depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación prolongada del ingrediente activo. Una composición ejemplar comprende anticuerpo monoclonal en 5 mg/mL, formulado en tampón acuoso que consiste en 50 mM L-histidina, 150 mM NaCl, ajustada a pH 6.0 con HCl. Las composiciones para administración parenteral son sustancialmente estériles, sustancialmente isotónicas y se fabrican bajo condiciones GMP de FDA o cuerpo similar.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas como poliláctido, poliglicólico o copolímero para un mayor efecto adyuvante, como se ha señalado anteriormente (véase Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997). Los agentes de la invención pueden administrarse en forma de una inyección con depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación prolongada o pulsátil del ingrediente activo.

Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. Para supositorios, los aglutinantes y transportadores incluyen, por ejemplo, glicoles de polialquileno o triglicéridos; tales supositorios pueden estar formados a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de 0,5% a 10%, preferentemente 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones o polvos de liberación prolongada y contienen 10%-95% de ingrediente activo, preferentemente 25%-70%.

Las aplicaciones tópicas pueden dar como resultado entrega transdérmica e intradérmica. La administración tópica puede facilitarse mediante la co-administración del agente con toxina de cólera o derivados desintoxicados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (Véase Glenn et al., *Nature* 391, 851 (1998)). La co-administración puede conseguirse usando los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas por enlace cruzado químico o expresión como una proteína de fusión. Alternativamente, la entrega transdérmica puede conseguirse usando un parche para la piel o usando transferosomas (Pau et al., *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998)).

Ejemplos

1. Detectar formas truncadas de alfa-sinucleína en un animal transgénico

Se analizaron ratones transgénicos que tenían un ácido nucleico que codificaba alfa-sinucleína intacta operativamente unida a un promotor PDGF de 6 semanas, 3 meses y 12 meses de edad. Los animales fueron sometidos a eutanasia y se juntaron el tejido de la corteza y del hipocampo de cuatro ratones (2 machos/2 hembras). El tejido se homogenizó en TBS (250 mM NaCl), y se giró a 150.000 x g durante 15 minutos. Después se extrajo la bolita con 1% Triton-X 100 durante 30 minutos a 4 grados y se giró como antes. Finalmente, la bolita se extrajo con 8 M Urea/ 1% SDS. Este procedimiento dio como resultado cuatro extractos que serán referidos como extractos Tris, Triton, SDS y Urea en la descripción a continuación.

Las Figs. 1A y B muestran un ensayo de transferencia Western de un animal transgénico y un control correspondiente con anticuerpo ELADW-47. Este anticuerpo es un policlonal que se enlaza con un epítipo en SN115-122 (pero no necesariamente requiere cada aminoácido para que ocurra algún enlace). El anticuerpo se enlaza preferentemente con la forma humana de alfa-sinucleína pero también se enlaza con la forma de ratón en menos medida. Las Figs. 1A y B muestran una tira de alfa-sinucleína en 14 kDa tanto para el ratón control como para el ratón transgénico. La tira es más fuerte para el ratón transgénico que para el control. Para los diferentes extractos, la tira es más intensa en el extracto Triton. Este extracto solubiliza la alfa-sinucleína unida a la membrana y posiblemente las inclusiones del tipo de cuerpos de Lewy. Las extracciones Tris y particularmente Triton del ratón transgénico (pero no el control) muestran una tira de aproximadamente 12 kDa en un tampón de tricina. Esta es una forma truncada de alfa-sinucleína. El peso molecular de la tira corresponde a una longitud de aproximadamente 115-120 aminoácidos.

La Fig. 2 muestra un ensayo de transferencia Western con el mismo anticuerpo que en la Fig. 1 para comparar el nivel de la forma truncada de alfa-sinucleína en ratones de 3 meses y 12 meses de edad. La Figura muestra que la forma truncada aparece más fuerte en los ratones de 3 meses de edad. De nuevo, la tira truncada no aparece en los ratones de control. La apariencia más intensa de la forma truncada de alfa-sinucleína en el desarrollo temprano de ratones transgénicos indica que la forma truncada de alfa-sinucleína tiene un papel temprano en la patogénesis de enfermedad con cuerpos de Lewy.

Las Figs. 3A y B muestran un ensayo de transferencia Western con un anticuerpo diferente denominado 12C1 (se enlace con el epítipo en los aminoácidos 43-51 y 58-65, monoclonal, IgG1 k). Este anticuerpo se enlaza igualmente a formas de ratón y de humano de alfa-sinucleína en un epítipo que incluye aminoácidos 43-51 y 58-65. La Fig. 3 muestra la tira truncada de 12 kDa en el extracto Triton de los ratones transgénicos. La misma tira aparece mucho más débilmente en el extracto Triton de los ratones de control. Así, el procesamiento de alfa-sinucleína a una forma truncada ocurre tanto en ratones normales como en ratones transgénicos, pero de manera más fuerte 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 alfa-sinucleína humana que lleva a la alfa-sinucleína de ratón a una trayectoria que se usa en menor grado en ratones transgénicos.

La Fig. 4 muestra un ensayo más de transferencia Western que usa el mismo anticuerpo que en la Fig. 3. Est gel muestra dos tiras adicionales de pesos moleculares de aproximadamente 6 o 7 kDa. La tira de 7 kDa aparece más fuerte en los ratones transgénicos que en los ratones control. La tira de 6 kDa aparece solamente en los ratones transgénicos, y después solamente en la muestra de 3 meses. Las tiras de 6 kDa y 7 kDa son indicativas de fragmentos más cortos de terminal N de alfa-sinucleína de longitud de aproximadamente 50-80 aminoácidos.

Las Figs. 5A, B, C, D, E muestran ensayos de transferencia Western con cuatro anticuerpos diferentes y mapas de epítomos. ELADW-44 es un policlonal que se enlaza solamente con la forma humana de alfa-sinucleína (esto es, no la forma del ratón). Se enlaza con un epítomo en los aminoácidos 98-019. ELADW-47 es un policlonal que se enlaza preferentemente con la forma humana pero también se enlaza con la forma del ratón. Se enlaza con un epítomo en los aminoácidos 115-122. ELADW-48 es un policlonal que se enlaza igualmente con las formas humanas y de ratón. Se enlaza con un epítomo entre los aminoácidos 131 y 140. 8A5 es un monoclonal que se enlaza igualmente con las formas humanas y de ratón. Se enlaza en la terminal C de alfa-sinucleína. Las Figs. 5A-E muestran que de estos cuatro anticuerpos, solamente ELADW-47 generó una tira de 12 kDa indicativa de una forma truncada de alfa-sinucleína. El resultado de que ELADW48 no diera lugar a esta tira es de ayuda en el mapeo de sitio de división. Debido a que ELAD-47 se enlazó y ELAD-48 no lo hizo el sitio de división está bordeado por el extremo de terminal N del epítomo ELADW-47 y el aminoácido de terminal C del epítomo ELADW48. Además, debido a que algunos aminoácidos del epítomo ELADW-47 deben estar presentes para permitir el enlace y algunos del epítomo ELADW-48 deben estar ausentes para prevenir el enlace, el sitio de división está además confinado a una región dentro de aproximadamente los aminoácidos 118-135. Cuando se consideran estos datos con el tamaño del fragmento truncado (aproximadamente 115-120 aminoácidos) entonces el sitio probable de división es alrededor de los aminoácidos 118-121. La falta de enlace por el anticuerpo 8^o5 de terminal C es consistente con este sitio de división. La falta de enlace por el anticuerpo ELADW-44, sin embargo, requiere más comentarios. La falta de división puede explicarse si una forma truncada de alfa-sinucleína humana resultante de la división adapta a una conformación diferente para la alfa-sinucleína intacta previniendo el enlace de ELADW-44. Alternativamente, la forma truncada de alfa-sinucleína presente en ratones transgénicos en una mayor medida que en ratones normales representa una forma de alfa-sinucleína de ratones. En este caso, la mayor cantidad de la forma truncada en el ratón transgénico sería debido a la presencia de alfa-sinucleína humana que lleva más de la alfa-sinucleína de ratón a procesarse a una trayectoria que lleva a la alfa-sinucleína truncada en relación con la situación en un ratón de control.

2. Detectar formas truncadas de alfa-sinucleína en el cerebro de un paciente con DCL

Este ejemplo compara especies de alfa-sinucleína en CsL con aquellas en el resto de fracciones de proteínas solubles y particuladas de un cerebro con DCL. Los CsL y las proteínas solubles se prepararon a partir de la corteza de un único paciente con DCL (véase Jensen et al., J. Biol. Chem. 275 21500-21507 (2000)). El tejido se homogenizó en Tris/sacarosa (0,32 mM)/EDTA (5mM) y tampón con inhibidores de proteasa. El homogenizado se giró a 1000g. El sobrenadante se sometió a un giro adicional a 150 kg. El sobrenadante de este giro se usó para preparar soluble de Tris de proteínas. La bolita de los 1000g se volvió a suspender y se usó para preparar una fracción de cuerpo de Lewy. Los cuerpos de Lewy se purificaron mediante inmunoprecipitación en gotitas magnéticas con anticuerpos anti-sinucleína. El precipitado después se extrajo con 7 M Urea 2 M Tiourea/4% CHAPS. La forma unida se volvió a extraer con Urea/Tiourea/CHPAS. Los extractos de esta etapa y la extracción previa se volvieron a unir y analizaron mediante 2D PAGE e inmunoensayo de transferencia. La forma unida se sometió a una extracción adicional con 90% ácido fórmico. El extracto se almacenó diluido para 9% ácido fórmico. El extracto después se analizó mediante SDS PAGE y RP-HPLC.

Las especies de sinucleína se resolvieron en geles 2-D y se detectaron en ensayos de transferencia Western. Múltiples especies de alfa-sinucleína, incluyendo especies fosforiladas y truncadas, estaban presentes en CsL y en la fracción soluble del cerebro. Los truncamientos predominantes estaban en la región de terminal C de alfa-sinucleína aproximadamente en los aminoácidos 120-125. También se observó un fragmento mayor adicional dividido cerca de la terminal C. No se detectó gamma-sinucleína ni beta-sinucleína en los CsL a pesar de encontrarse en la fracción de proteína soluble. La alfa-sinucleína en la preparación de CL difirió de la de la fracción soluble en que tuvo divisiones adicionales en terminal C y que en general las especies truncadas de alfa-sinucleína se enriquecieron en los CsL en relación con la fracción de proteína soluble. Además, se detectaron múltiples especies de alfa-sinucleína de mayor masa molecular, aproximadamente 25-35 kDa, solamente en la preparación de CL. Los fragmentos truncados de terminal C son del mismo tamaño que aquellos observados en el modelo de ratón transgénico del Ejemplo 1 lo que indica un papel en la patogénesis de enfermedad.

Las Figs. 6A, B, C muestran extractos de Tris sondado con diferentes anticuerpos, sometidos a electroforesis de gel 2D y a ensayo de inmunotransferencia Western. Las manchas oscuras presentes hacia la izquierda de las gráficas representan alfa-sinucleína de longitud completa. La característica más notable es las cuatro machas en la gráfica Syn-1 que están ausentes en la gráfica 8A5. Estas cuatro manchas representan formas truncadas de alfa-sinucleína que son incapaces de enlazarse con el anticuerpo 8A5 debido a la falta de un aminoácido de terminal C. Estos truncamientos corresponden aproximadamente a formas de SN entre 1-120 y 1-125. Se ven varias manchas adicionales debajo y adyacentes a las manchas de alfa-sinucleína de longitud completa. Las manchas debajo de las manchas de longitud completa representan probablemente truncamientos menores de la

terminal C (esto es, sinucleína 1-X, donde X es 130-139). La mancha adyacente a la manchas de longitud completa pero a la derecha representan un eliminación menor de la terminal N (debido a la falta de esta mancha en el borrón con ELADW43).

5 Las Fig. 7A, B, C, D muestran borrones con anticuerpos adicionales. Las cuatro manchas están presentes con 5C12 (109-120). Dos de las manchas están presentes con ELADW47 (118-123) y las manchas están ausentes con LB509 (115-123). Las manchas pueden diferir entre sí en peso molecular y en presencia o ausencia de modificación post-transicional, como nitración o fosforilación. Estos resultados fijan los sitios de división aproximadamente en los aminoácidos 120-125 de alfa-sinucleína. También son notables varias manchas que aparecen ligeramente debajo (menor peso molecular) o a la derecha (mayor pH) que la manchas de sinucleína no modificadas. Éstas probablemente pueden representar formas de sinucleína que han sufrido una pequeña extensión de truncamiento y/o diferente modificación post-transaccional en relación con las manchas principales.

10 La Fig. 8 resume los sitios de división en relación con los epítomos unidos por anticuerpos usados en el ensayo de transferencia Western.

15 Las Figs. 9A, B comparan las proteínas solubles Tris con proteínas extraídas de cuerpos de Lewy por electroforesis 2D y ensayo de transferencia Western. El borrón Tris a la izquierda muestra cuatro manchas en menor peso molecular lo que representa formas truncadas de alfa-sinucleína (probablemente en el rango de aminoácidos 1-120 o 1-125). Éstas son de intensidad relativamente baja en comparación con las manchas representativas de alfa-sinucleína de longitud completa. El borrón de proteínas de cuerpos de Lewy muestra más manchas representativas de formas truncadas de alfa-sinucleína en el rango de 1-120 a 1-125. Sin embargo, éstas son de mayor intensidad en relación con las manchas representativas de alfa-sinucleína de longitud completa. También son aparentes dos manchas que migran más rápido que alfa-sinucleína de longitud completa pero más lentas que la colección de manchas en la parte inferior del borrón. Esas manchas probablemente representan truncamientos en el rango 1-X donde X es 130-139 aminoácidos.

20 Las Figs. 10A, B, C, D muestran los inmunoensayos de proteínas de cuerpos de Lewy que se han vuelto a sondar con varios anticuerpos de terminal C. Todas las manchas aparecen con Syn-1 (91-96) y 5C12 (109-120). Con ELADW47, la mancha que recorre a una velocidad más rápida y la posición más básica en los borrones Syn-1 y 5C12 falta. En el borrón LB509, todas las manchas que mueven más rápido/más básicas en los otros borrones faltan o son apenas visibles. La ausencia o intensidad reducida de ciertas manchas en los borrones ELADW47 y LB509 indica que estos borrones representan formas de alfa-sinucleína y son consistente con la división que ocurre aproximadamente entre los aminoácidos 120 y 125.

35 3. Detectar alfa-sinucleína agregada en un animal transgénico

Los animales transgénicos se sometieron a eutanasia y se les extrajeron los cerebros para análisis neuroquímico y neuropatológico. En resumen, el hemisferio derecho del cerebro se congela y homogeniza para determinación de inmunorreactividad de alfa-sinucleína humana agregada y no agregada mediante ensayo de transferencia Western (Masliah et al., Science (2000) 287:1265). El hemisferio izquierdo del cerebro se fija en 4% formaldehído, se secciona en serie en el vibratomo para inmunocitoquímica y para análisis ultraestructural.

40 La secciones del cerebro se inmunotiñen con un anticuerpo policlonal de conejo contra alfa-sinucleína humana (1:500). Después de incubación durante la noche a 4°C, las secciones se incuban con anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado seguido de complejo de peroxidasa de rábano Avidina H (HRP) (1:200, ABC Elite, Vector). La reacción se visualiza con 0,1%, 3,3-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) en 50mM Tris-HCl (pH 7.4) con 0,001% H₂O₂ y las secciones se montan después en portaobjetos bajo Entellan. Los niveles de inmunorreactividad son evalúan semi-cuantitativamente mediante densitometría óptica usando Quantimet 570C. Estas secciones también se estudian mediante análisis con imagen para determinar los números de inclusiones inmunorreactivas de alfa-sinucleína y esta medida fiable de agregación de alfa-sinucleína actúa como un índice valioso de los efectos anti-agregación (Masliah et al., Science (2000) 287:1265).

45 El análisis de patrones de neurodegeneración se consigue analizando densidades sinápticas y dendríticas en el hipocampo, corteza frontal, corteza temporal y ganglios basales utilizando secciones de vibratomo con doble inmunoetiqueta para sinaptosfina y proteína 2 asociada con microtúbulo (MAP2) y se visualiza con LSCM. El análisis adicional de neurodegeneración se consigue determinando inmunorreactividad con tirosina hidrolasa (TH) en el caudoputamen y sustancia negra (SN) como se ha descrito previamente (Masliah, et al., (2000)). Las secciones se representarán en imágenes con LSCM y cada imagen individual sirve de umbral interactivo de tal manera que se incluyan terminales inmunorreactivos a TH que muestran intensidad de pixeles en un rango lineal. Se fija una escala para determinar la proporción de pixel con μm . Después, esta información se usa para calcular el % de área de neuropil cubierta por las terminales inmunorreactivas de TH. Estas mismas secciones también se utilizan para evaluar los números de neuronas TH en el SN.

60 4. Análisis de alfa-sinucleína en pacientes con ECL

65

Para determinar qué especie de α -sinucleína está enriquecida en o es única al tejido de la enfermedad, hemos examinado muestras de cerebros de pacientes con atrofia multisistémica (AMS) y una mutación de la enfermedad de Parkinson familiar (A53T; Contursi kindred). Las fracciones particuladas de AMS y cerebro Contursi se prepararon homogenizando tejido de cerebro en 50 mM Tris, 140 mM NaCl y 1% Triton (AMS) o 0,1% NP40 (Contursi) respectivamente. Se prepararon pacientes de control que coincidían en edad ("normales") de manera idéntica al cerebro de la enfermedad. Las muestras se analizaron en ensayos de transferencia Western de geles 1-D y mediante ELISA como se describe más abajo, y también en geles 2-S. Se analizó parte de la fracción particulada. El resto se giró. El sobrenadante también se analizó. La bolita se extrajo en 7 M urea. El sobrenadante de seta extracción se analizó. La bolita se volvió a extraer en 7 M urea/1% SDS. El sobrenadante se analizó. Los ensayos de inmunotransferencia que usan un anticuerpo para detectar el total de alfa-sinucleína o específicamente la alfa-sinucleína fosforilada en la posición 129 se muestran en la Fig. 11.

La sinucleína se fraccionó de manera diferente en Contursi frente al cerebro de control. La mayor parte de la sinucleína en el cerebro normal fue soluble después de la homogenización en sacarosa amortiguada con tris pero la mayor parte de la sinucleína en el cerebro Contursi requirió urea más SDS para solubilización lo que sugiere una cantidad masiva de cuerpos de Lewy en el paciente. La sinucleína en el paciente de Contursi era sorprendentemente diferente de la del paciente control en la cantidad de ser 129 fosforilación. Solamente una pequeña cantidad de α -sinucleína fosforilada se detectó en el paciente control, mientras que el paciente de Contursi tuvo una cantidad extremadamente grande de fosfo-sinucleína por comparación en ensayos de transferencia Western. Así, la insolubilidad de sinucleína en el cerebro de Contursi se asoció con un gran aumento en fosforilación de sinucleína en ser 129. La α -sinucleína en el paciente de Contursi también difirió de la del paciente normal en la distribución de truncamientos de terminal C. La α -sinucleína truncada en terminal C se observó tanto en la fracción de cerebro particulado del control como del Contursi. Sin embargo, todos los truncamientos detectables fueron muy insolubles (urea/extracto SDS) en el paciente de Contursi, mientras que aquellas en el cerebro control fueron solubles (extracto de sacarosa amortiguada con tris). El enriquecimiento de sinucleína truncada en terminal C en una fracción enriquecida con CL de un paciente de Contursi está de acuerdo con nuestros hallazgos de enriquecimiento de sinucleína de terminal C en CsL en DCL. El cerebro de AMS también se enriqueció en fosfo (ser 129)- α -sinucleína y reveló truncamiento en terminal C y una abundancia de fosforilación y otras modificaciones ácidas también se ven en CsL. Niveles altos de fosfo (ser 129) también se vieron en el cerebro de paciente con dCL en relación con un control sano. En un experimento separado, niveles más altos de fosfo (ser 129) (aproximadamente 30% o más) también se observaron en células PEAK transfectadas con alfa-sinucleína que tenían una mutación A53T en relación con células PEAK transfectadas con alfa-sinucleína humana de tipo salvaje.

5. Análisis conductual en una animal transgénico

Para actividad locomotora, se analizaron ratones durante 2 días en el rodillo giratorio (San Diego Instruments, San Diego, CA), como se ha descrito previamente (Masliah, et al., (2000)). El primer día los ratones son entrenados para 5 ensayos: el primer a 10 rpm, el segundo a 20 rpm y del tercero a quinto a 40 rpm. El segundo día, los ratones se prueban para 7 ensayos a 40 rpm cada uno. Los ratones se colocan individualmente en el cilindro y la velocidad de la rotación aumenta de 0 a 40 rpm.

Motivat. 12; 239-260 (1981). En este procedimiento, el animal se coloca en un pozo grande lleno 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 entrada próxima visual. Alternativamente, una forma más compleja de la prueba donde no hay entradas formales para marcar la localización de la plataforma se darán a los animales. De esta forma, el animal debe aprender la localización de la plataforma en relación con las entradas distales visuales. La longitud de tiempo que el animal permanece en el agua se relaciona inversamente con su habilidad cognitiva.

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

Células 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 expresan un fragmento truncado de alfa-sinucleína como se ha descrito anteriormente, alfa-sinucleína de ratones y se comparan con células transfectadas solamente con vector de expresión. Las células transfectadas solamente con vector tienen una apariencia fibroblástica mientras que las células transfectadas con alfa-sinucleína son redondas, con cuerpos de inclusión en la superficie celular visibles por medio de luz y de microscopía con escaneo focal. Las células transfectadas GT1-1 pueden usarse para investigar agentes para actividad en el despeje de inclusiones de sinucleína.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* de investigación de un agente que tiene actividad farmacológica útil en el tratamiento de ECL que comprende:
- contactar el agente con un fragmento de alfa-sinucleína presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy que se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta; y
- 10 determinar la velocidad o extensión de agregación del fragmento de alfa-sinucleína, donde una reducción en la velocidad o extensión de agregación en relación con un control carente de agente indica que el agente tiene la actividad farmacológica.
- 15 2. Un método *in vitro* de investigación de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de ECL que comprende:
- contactar una célula que expresa alfa-sinucleína y procesar la alfa-sinucleína en un fragmento con un agente, donde dicho fragmento está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta, y
- 20 determinar un nivel del fragmento en la célula en relación con un nivel estándar en el mismo tipo de célula en ausencia del agente,
- una reducción en el nivel del fragmento en relación con el nivel estándar lo que indica que el agente tiene la actividad farmacológica útil en el tratamiento de una ECL
- 25 donde la célula es preferentemente una célula humana, más preferentemente una célula neuronal o una célula dopaminérgica.
- 30 3. Un método de investigación de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de ECL que comprende:
- contactar un animal transgénico no humano que expresa un fragmento de alfa-sinucleína presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy con el agente, donde el fragmento se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta; y
- 35 determinar el nivel de formas agregadas del fragmento en el cerebro del animal transgénico en relación con un nivel estándar de formas agregadas del fragmento en un animal transgénico comparable en ausencia del agente,
- una reducción en el nivel del fragmento de formas agregadas en relación con el nivel estándar lo que indica que el agente tiene la actividad farmacológica útil en el tratamiento de una ECL,
- 40 donde el animal transgénico es preferentemente un ratón o una *Drosophila*.
- 45 4. Un método de investigación de un agente para una actividad farmacológica útil en el tratamiento de ECL que comprende:
- contactar un animal transgénico no humano que tiene un transgén que expresa alfa-sinucleína y procesar la alfa-sinucleína en un fragmento con el agente, donde dicho agente está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta; y
- 50 determinar un nivel del fragmento en una célula neuronal en relación con un nivel estándar en ausencia del agente,
- una reducción en el nivel de los fragmentos en relación con el nivel estándar lo que indica que el agente tiene la actividad farmacológica útil en el tratamiento de una ECL.
- 55 5. Un animal transgénico no humano, preferentemente un ratón o *Drosophila*, que tiene un genoma que comprende un transgén que comprende:
- un promotor unido operativamente con un segmento de ácido nucleico que codifica un fragmento de alfa-sinucleína presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy que se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta,
- 60 donde la expresión del fragmento en el animal transgénico predispone al animal a desarrollar al menos una característica de ECL,
- donde el promotor es preferentemente un promotor PDGF, o
- 65 donde al menos una característica es una deficiencia en la función motora o una deficiencia en la función cognitiva.

6. Un método *in vitro* para detectar la presencia o susceptibilidad a una ECL en un paciente, que comprende:
- 5 detectar un nivel de un fragmento de alfa-sinucleína en una muestra de fluido cerebrospinal, donde dicho fragmento está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta,
 un nivel mayor que un nivel estándar en individuos sanos indica la presencia o susceptibilidad a ECL.
- 10 7. Un anticuerpo que se enlaza específicamente a un fragmento de alfa-sinucleína sin enlazarse específicamente con alfa sinucleína de longitud completa como se define en la SEQ ID NO. 1, donde el fragmento está presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy y se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta, donde el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo humano o humanizado, más preferentemente humano isotipo IgG1, o un fragmento de menos de 20 aminoácidos de alfa-sinucleína que induce tal anticuerpo, donde el fragmento que induce el anticuerpo incluye la terminal C del fragmento truncado en paciente con enfermedad con cuerpos de Lewy.
- 15 8. El anticuerpo de la reivindicación 7 para su uso en el diagnóstico de presencia o susceptibilidad a una ECL donde el anticuerpo se administrará a un paciente y el nivel de enlace del anticuerpo en el paciente se determinará, donde un mayor nivel de enlace en relación con un nivel estándar en individuos sanos indica presencia o susceptibilidad a ECL.
- 20 9. El anticuerpo de la reivindicación 7, o el fragmento de menos de 20 aminoácidos de alfa sinucleína que induce al anticuerpo de la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedad con cuerpos de Lewy.
- 25 10. Un fragmento de alfa-sinucleína presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy que se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta, para su uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedad con cuerpos de Lewy.
- 30 11. Un fragmento de alfa-sinucleína presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy que se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta
 bien en combinación con un adyuvante que aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos al fragmento,
 o unido a un transportador que forma una proteína de fusión, donde el transportador aumenta una respuesta inmune que comprende anticuerpos al fragmento.
- 35 12. Un método de investigación para una proteasa que divide alfa-sinucleína intacta para formar un fragmento presente en pacientes con enfermedad con cuerpos de Lewy que se caracteriza por la presencia de al menos 100 aminoácidos contiguos de alfa-sinucleína intacta y una eliminación de 1-25 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta que comprende:
 identificar un inhibidor de la proteasa;
 contactar el inhibidor con un extracto de célula o tejido que contiene la proteasa, por lo que la proteasa se enlaza al inhibidor; y
 liberar la proteasa del inhibidor.
- 40 13. El método de la reivindicación 12, donde 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, preferentemente donde el péptido comprende un segmento contiguo de al menos 5 residuos entre las posiciones 118 y 122, más preferentemente donde al menos uno de los residuos es un análogo en estado de transición.
- 45 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 6, 12 y 13, donde el fragmento de alfa-sinucleína tiene una mutación A53T.
- 50 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 6 y 12 a 14, donde el fragmento de alfa-sinucleína tiene una eliminación de 1-23 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta.
- 55 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 6 y 12 a 15, donde el fragmento de alfa-sinucleína es 1-119 o 1-122.
- 60 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 6 y 12 a 15, donde el fragmento de alfa-sinucleína es 1-X, donde X es 130-139.
- 65

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 6 y 12 a 15, donde el fragmento de alfa-sinucleína es alfa-sinucleína intacta truncada en la terminal C por 25 aminoácidos.

5 **19.** El fragmento de alfa-sinucleína de la reivindicación 11, o el fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde el fragmento de alfa-sinucleína tiene una mutación A53T.

10 **20.** El anticuerpo de la reivindicación 7, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, el fragmento de alfa-sinucleína de la reivindicación 11 o 19, o el fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 o 19, donde el fragmento de alfa-sinucleína tiene una eliminación de 1-23 aminoácidos contiguos de la terminal C de alfa-sinucleína intacta.

15 **21.** El anticuerpo de la reivindicación 7 o 20, el anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 o 20, el fragmento de alfa-sinucleína de la reivindicación 11, 19 o 20, o el fragmentos para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, 19 o 20, donde el fragmento de alfa-sinucleína es 1-119 o 1-122.

22. El anticuerpo de la reivindicación 7 o 20, el anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 o 20, el fragmento de alfa-sinucleína de la reivindicación 11, 19 o 20, o el fragmentos para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, 19 o 20, donde el fragmento de alfa-sinucleína es 1-X, donde X es 130-139.

20 **23.** El anticuerpo de la reivindicación 7, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, el fragmento de alfa-sinucleína de la reivindicación 11 o 19, o el fragmento para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 o 19, donde el fragmento de alfa-sinucleína es alfa-sinucleína intacta truncada en la terminal C por 25 aminoácidos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Ratón 3 meses: corteza/hipocampo

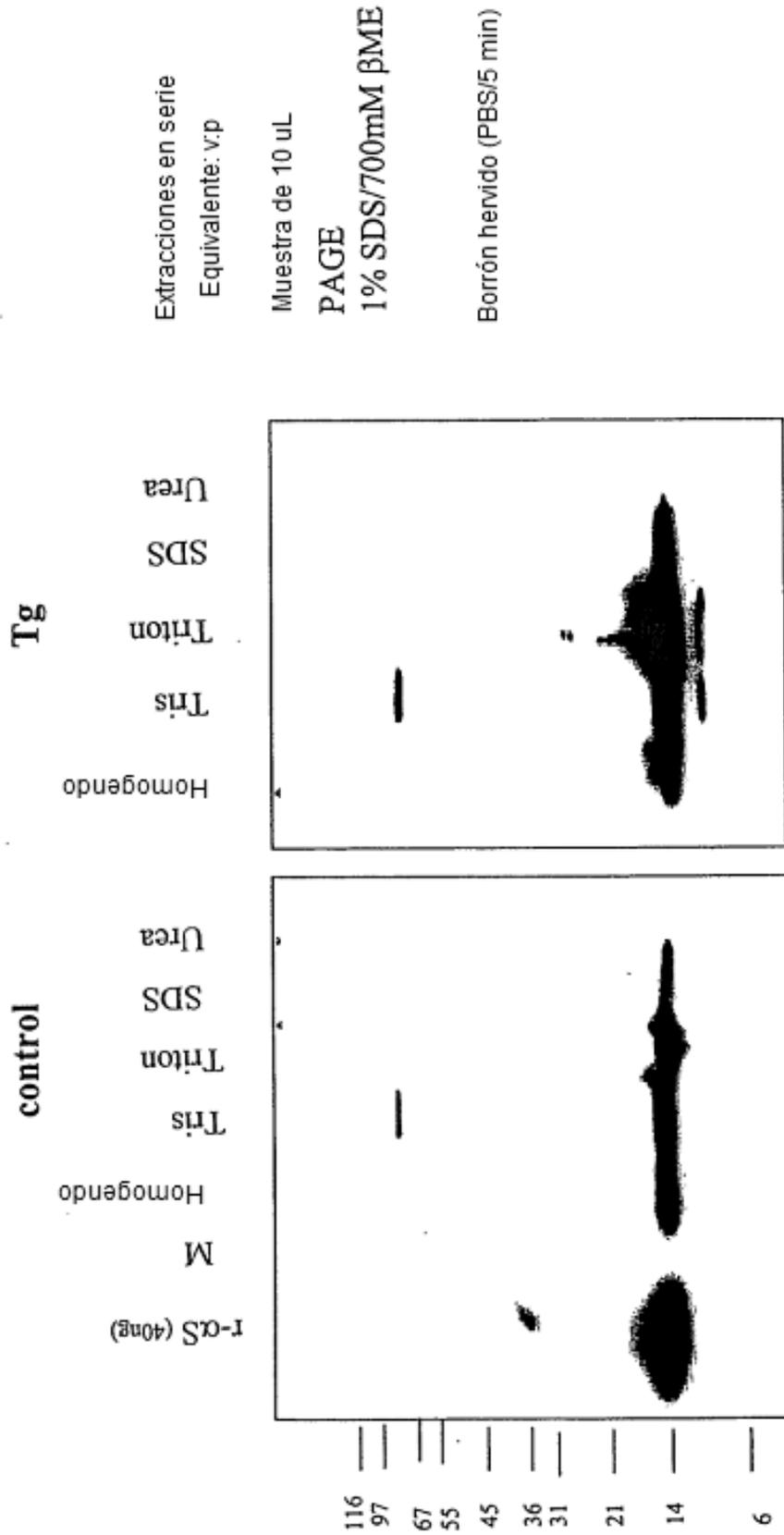


Fig. 1B

Fig. 1A Alfa-sinucleína humana preferencial Ab

Fig. 2
Ratón sinucleína: corteza e hipocampo

ELADW-47 (aa 116-122) 1:300
 control Tg
 3mo 12mo 3mo 12mo



Extracciones *Triton X-100*
 equivalent v:w

Muestra de 25µg
 PAGE
 1% SDS/700mM βME
 hervido

Borrón hervido (PBS/5 min)

Alfa-sinucleína humana preferencial Ab

Ratón 3 meses: corteza e hipocampo

I2CI (aa 58-65) 1:300

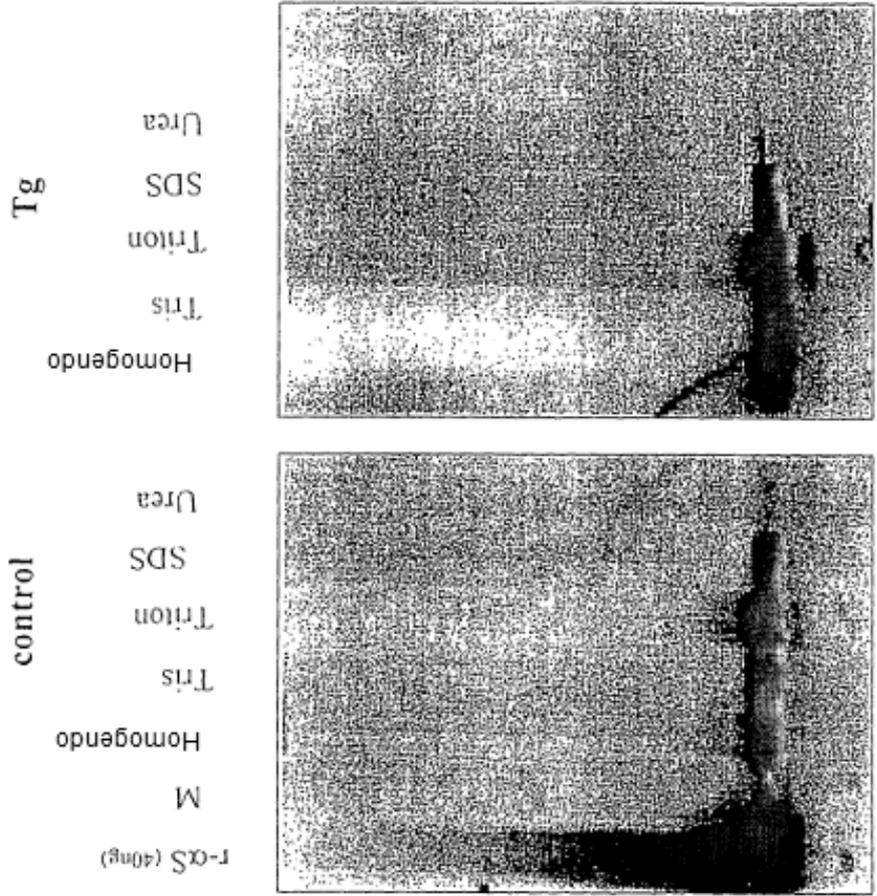


Fig. 3A Alfa-sinucleina humana preferencial Ab Fig. 3B

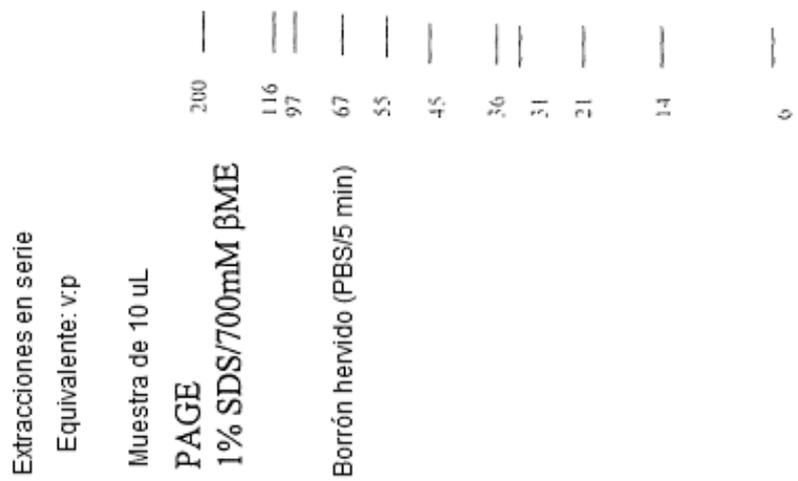
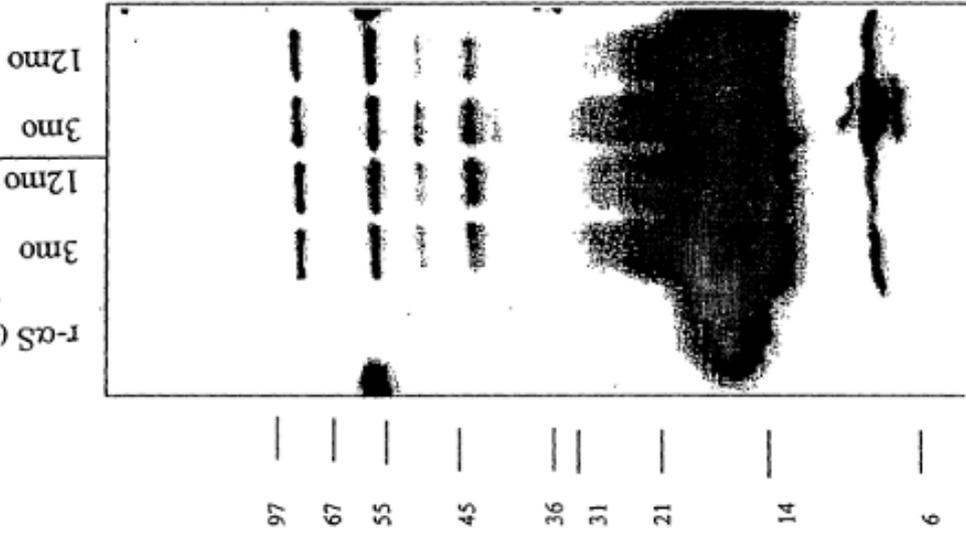


Fig. 4
Ratón sinucleína: corteza e hipocampo
 12C1 (aa 43-51; 58-65) 1:300

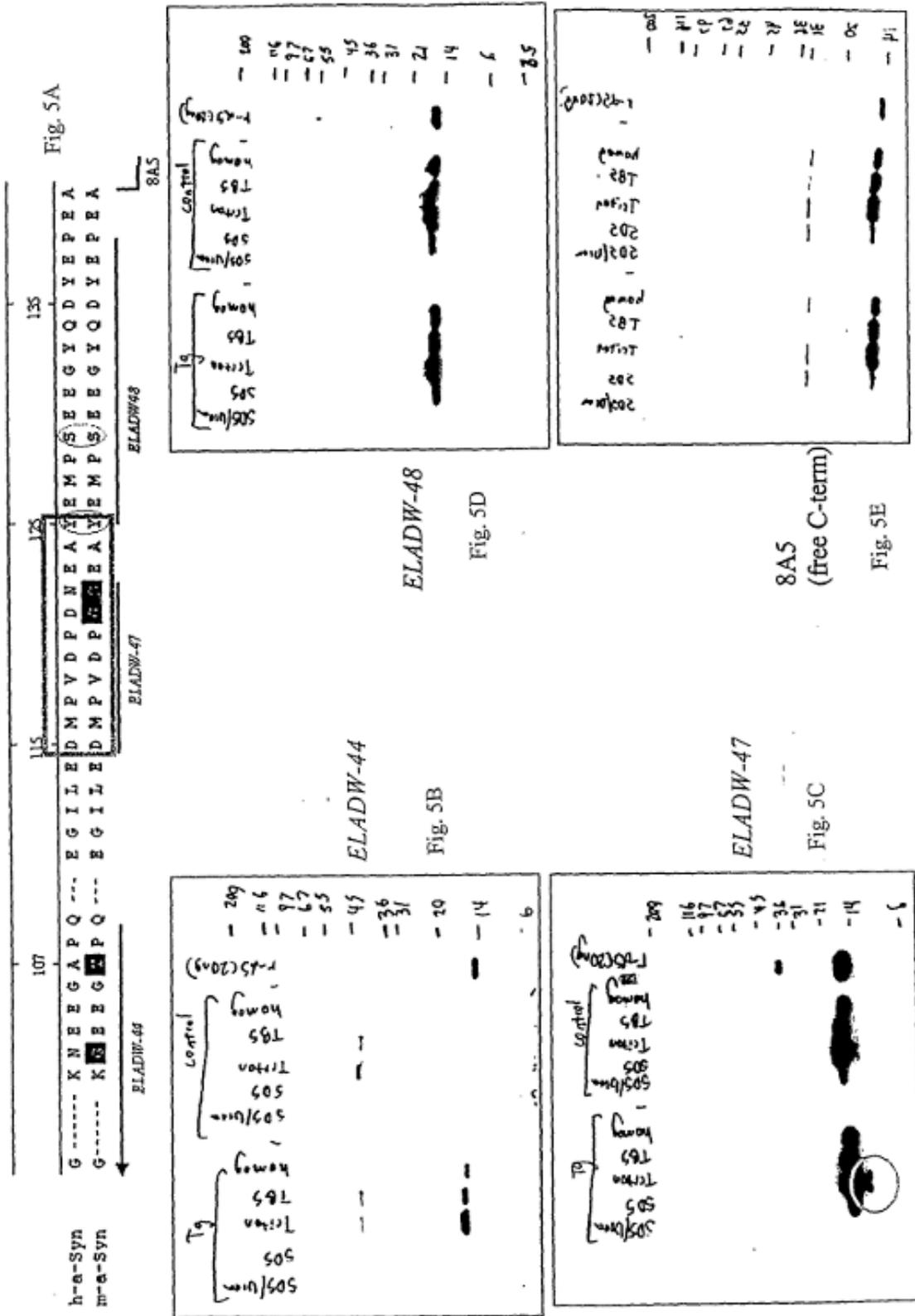


Extracciones *Triton X-100*
 equivalent v:w

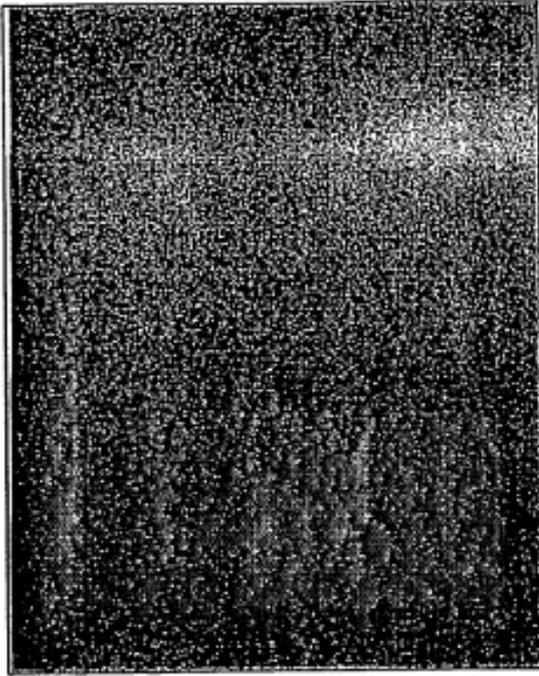
Muestra de 25 µg
 PAGE
 1% SDS/700mM βME
 hervido

Borrón hervido (PBS/5 min)

Alfa-sinucleína humana preferencial Ab



8A5 (aa 140 terminal carboxi libre)



ELADW43 (aa 1 terminal amino libre)

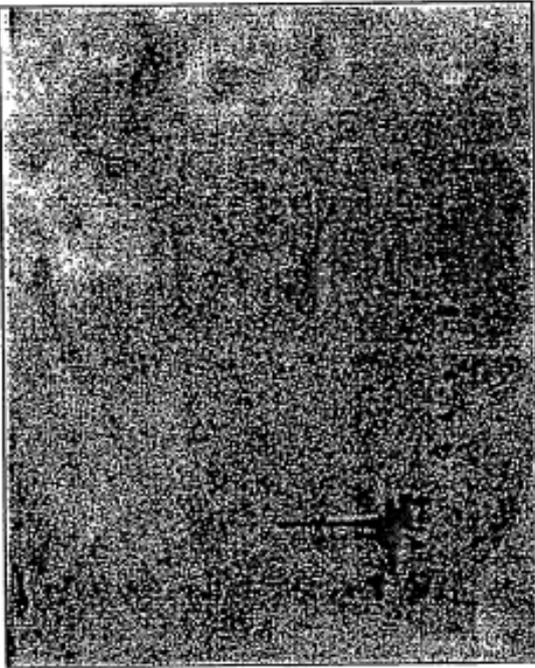


Fig. 6B



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

Fig. 6A

Volver a sondar inmunoensayos de proteínas solubles de Tris con anticuerpos de terminal C



Fig. 7A

Syn-1 (aa 91-96)

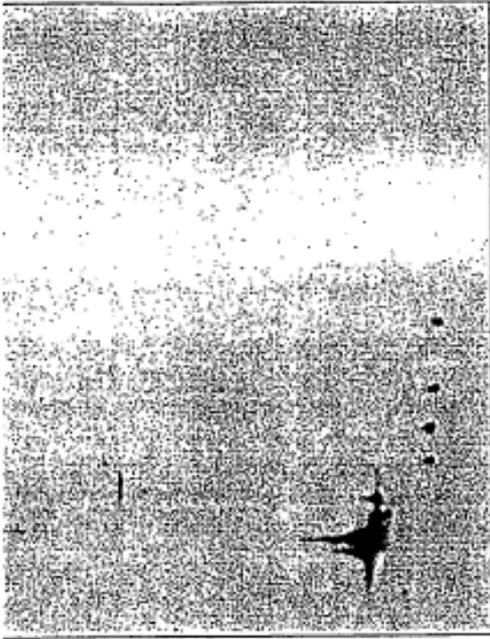


Fig. 7i

5C12 (aa 109-120)

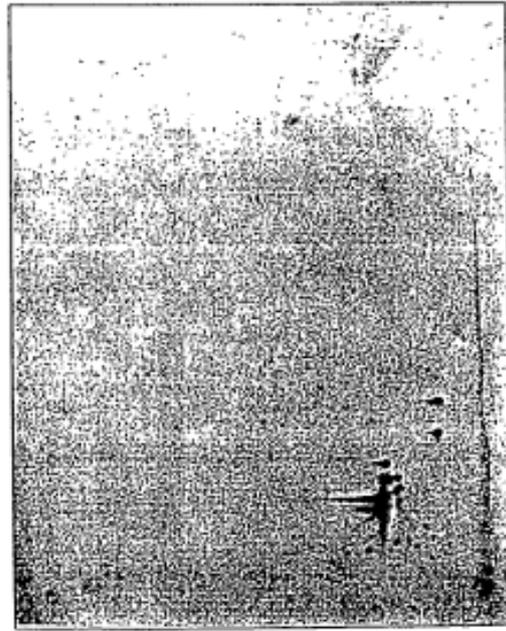


Fig. 7B

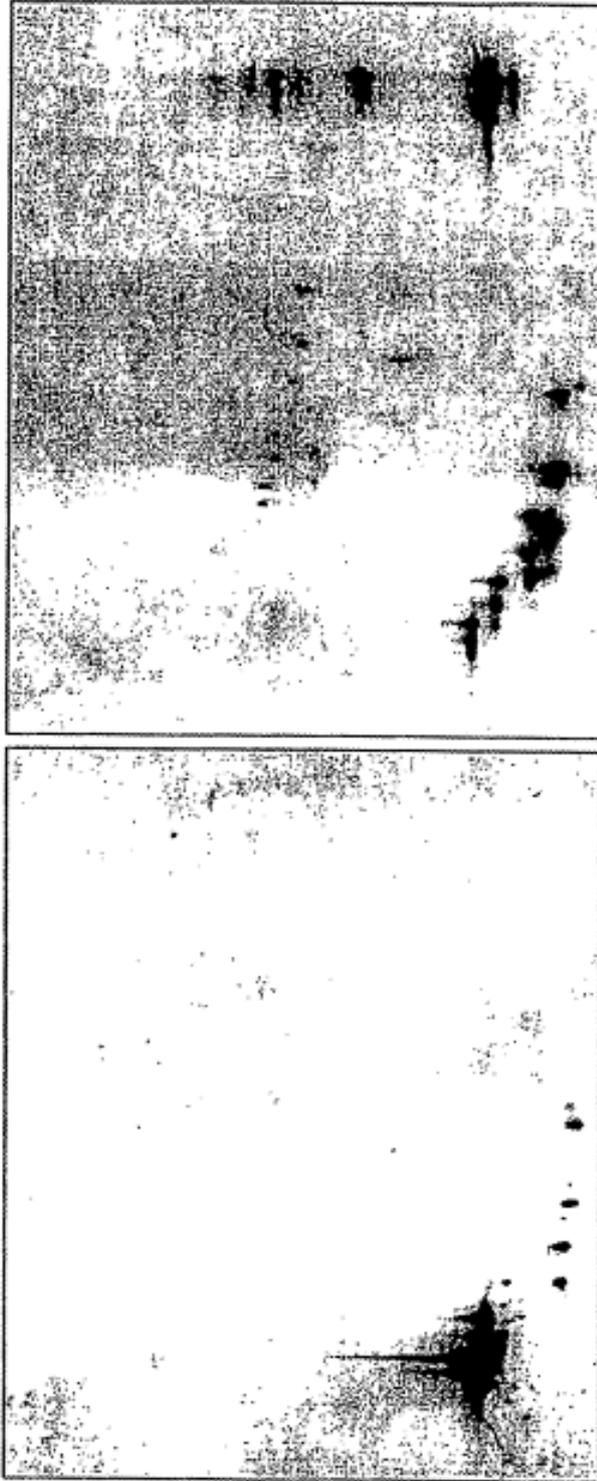
ELADW47 (aa 118-123)



Fig. 7

LB509 (aa 115-123)

Nuestros primeros borrões con cuerpos Lewy



Proteínas solubles de Tris (P23) Syn-1 Auto rad

Borrón de cuerpo Lewy 40 ug anticuerpo Syn-1

Fig. 9A

Fig. 9B



CONFIDENCIAL

Volver a sondear inmunoensayos de extractos UTC de cuerpos de Lewy con anticuerpos de terminal C

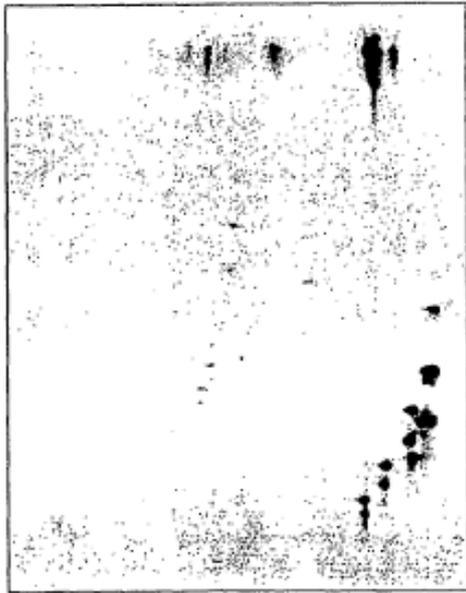


Fig. 10A

Syn-1 (aa 91-96)



Fig. 10C

5C12 (aa 115-120)

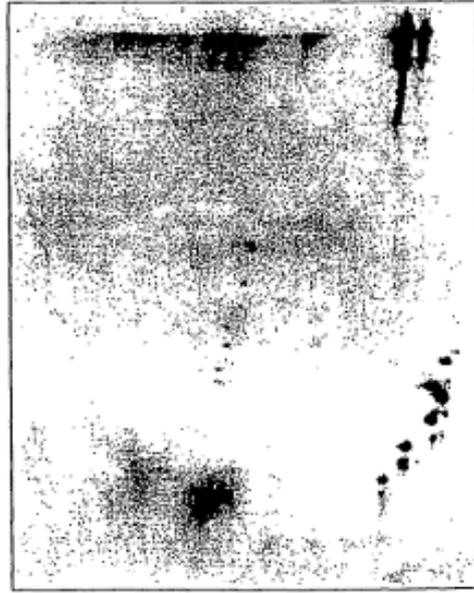


Fig. 10B

ELADW47 (aa 118-123)



Fig. 10D

LB509 (aa 115-125)

Fig. 11

