

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 925**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2011 PCT/IB2011/050826**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO11104696**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011 E 11713058 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2539366**

54 Título: **Anticuerpos de unión a las protofibrillas y su uso en métodos terapéuticos diagnósticos para la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy y otras α -sinucleinopatías**

30 Prioridad:

25.10.2010 US 406260 P
26.02.2010 US 308638 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2018

73 Titular/es:

BIOARCTIC AB (100.0%)
Warfvinges väg 35
112 51 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

NORDSTRÖM, EVA;
KASRAYAN, ALEX;
EKBERG, MONICA;
SCREPANTI SUNDQUIST, VALENTINA;
LANNFELT, LARS y
HOLMQUIST, MATS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 661 925 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

Anticuerpos de unión a las protofibrillas y su uso en métodos terapéuticos diagnósticos para la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy y otras α -sinucleinopatías

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos o a fragmentos de los mismos que tienen una elevada afinidad por las protofibrillas de la α -sinucleína humana y una baja unión de los monómeros de α -sinucleína, en la que los anticuerpos o los fragmentos tienen las secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) especificadas. La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden dicho anticuerpo o fragmento y a métodos para detectar las protofibrillas de α -sinucleína usando dicho anticuerpo o fragmento. En algunas formas de realización adicionales, la invención se refiere a dicho anticuerpo o fragmento para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo con patología de α -sinucleína o para el uso de dicho anticuerpo o fragmento en el diagnóstico o la monitorización del desarrollo de un trastorno neurodegenerativo con patología de α -sinucleína.

10

15

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Parkinson (PD) y la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) son dos de los ejemplos más prevalentes de trastornos neurodegenerativos con patología cerebral de α -sinucleína. La PD es el trastorno del movimiento más habitual, y está caracterizado por rigidez, hipocinesia, temblores e inestabilidad postural. Se cree que la PD afecta aproximadamente a entre cuatro y seis millones de personas en todo el mundo. La DLB representa un 5-15 % de todas las demencias. Además de la pérdida de memoria y de otros síntomas de demencia que a menudo fluctúan, los pacientes con DLB normalmente padecen caídas recurrentes y alucinaciones visuales.

20

25

La acumulación intraneuronal de α -sinucleína da como resultado bien la formación de cuerpos de Lewy, grandes inclusiones redondas y eosinofílicas de hialina de 10-20 μ m, o bien neuritas de Lewy, axones y dendritas alargados microfilamentosos distrofos. En el cerebro con PD, la deposición de los cuerpos de Lewy y de las neuritas de Lewy se limita en su mayor parte a las neuronas que conectan el estriado con la sustancia nigra. Estas células son cruciales para la ejecución del movimiento y las funciones posturales, explicando la naturaleza de los síntomas de la PD. En el cerebro con DLB, se encuentran deposiciones diseminadas de cuerpos de Lewy y de neuritas de Lewy tanto en el mesencéfalo como en las áreas corticales.

30

La alfa-sinucleína es una proteína que se encuentra principalmente intraneuronalmente. Dentro de la neurona, la α -sinucleína está ubicada predominantemente presinápticamente y por lo tanto se ha especulado que juega un papel en la regulación de la actividad sináptica. Se han identificado tres isoformas principales de la α -sinucleína, de las cuales la forma mayor y más habitual comprende 140 aminoácidos. Se ha usado esta isoforma, y las características relacionadas con la alfa-sinucleína (α -sinucleína) de los anticuerpos según la invención se refieren a esta isoforma de la α -sinucleína.

35

40

Además de la α -sinucleína, los cuerpos de Lewy consisten en una amplia variedad de moléculas, una de las cuales es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), un hidroxialquenal insaturado en α,β (Qin *et al.*, 2007). Se ha demostrado *in vitro* que el HNE puede modificar la α -sinucleína, y facilitar por tanto la oligomerización α -sinucleína. En particular, se ha demostrado que el HNE aumenta y estabiliza la formación de las protofibrillas, es decir, las grandes formas oligómeras de la α -sinucleína soluble (Qin *et al.*, 2007; documento WO 2009/133521).

45

Se ha implicado el estrés oxidativo en varios de los trastornos neurodegenerativos caracterizados por la acumulación patológica de α -sinucleína mal plegada. Varias especies de oxígeno reactivo pueden inducir la peroxidación de lípidos, tales como las membranas celulares o las lipoproteínas, y también dar como resultado la generación de aldehídos muy reactivos a partir de ácidos grasos poliinsaturados (Yoritaka *et al.*, 1996).

50

La patología cerebral indicativa de la enfermedad de Alzheimer (AD), es decir, las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, se observa en aproximadamente el 50 % de los casos con DLB. No está claro si la existencia de patologías paralelas implica dos enfermedades diferentes, o simplemente representa una variante de cada uno de los respectivos trastornos. A veces, los casos con una patología conjunta se describen como una variante con cuerpos de Lewy de la AD (Hansen *et al.*, 1990).

55

Investigaciones recientes han implicado el papel de la α -sinucleína en la AD y el síndrome de Down, ya que se ha demostrado que la proteína α -sinucleína se acumula en la región límbica en estos trastornos (Crews *et al.*, 2009).

60

El HNE reacciona con, y modifica, las cadenas laterales de cisteína, histidina y lisina, alterando sustancialmente la estructura y las propiedades físicas de estas cadenas laterales. Por lo tanto, el HNE puede reaccionar bien con el carbono C-3 o bien con el grupo aldehído, o mediante combinaciones de los mismos. Por lo tanto, el HNE puede modificar covalentemente proteínas, tanto inter- como intramolecularmente.

65

Genética de la enfermedad de Parkinson y de la demencia con cuerpos de Lewy

Las formas heredadas raras dominantes de la PD y de la DLB pueden estar causadas por mutaciones puntuales o duplicaciones del gen de la α -sinucleína. Se ha descrito que las mutaciones patógenas A30P y A53T (Kruger *et al.*, 1998) (Polymeropoulos *et al.*, 1998) y la duplicación del gen (Chartier-Harlin *et al.* 2004) provocan una PD familiar, mientras que se ha notificado que otra mutación de la α -sinucleína, la E46K (Zarranz *et al.*, 2004), así como la triplicación del gen de la α -sinucleína (Singleton *et al.*, 2003), provocan bien PD o bien DLB.

Las consecuencias patógenas de las mutaciones en la α -sinucleína sólo se comprenden parcialmente. Sin embargo, los datos *in vitro* han demostrado que las mutaciones A30P y A53T aumentan la tasa de agregación (Conway *et al.*, 2000). Hay un amplio abanico de diferentes formaciones de especies de α -sinucleína (monómeros, dímeros, oligómeros, incluyendo las protofibrillas) implicadas en el proceso de agregación, todas las cuales pueden tener diferentes propiedades tóxicas. No está claro qué especie molecular ejerce los efectos tóxicos en el cerebro. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que las formas oligómeras de la α -sinucleína son particularmente neurotóxicas. Una prueba adicional del papel de los oligómeros es proporcionada por la observación de que ciertas mutaciones en la α -sinucleína (A30P y A53T) que causan una enfermedad de Parkinson hereditaria, dan lugar a un aumento en la tasa de oligomerización.

No se conoce completamente como comienza la cascada de agregación de la α -sinucleína. Posiblemente, una conformación alterada de la α -sinucleína monomérica inicia la formación de los dímeros y de los trímeros, que continúan para formar mayores oligómeros solubles, incluyendo las protofibrillas, antes de que estas especies de tamaño intermedio se depositen en forma de fibrillas insolubles en cuerpos de Lewy. También es concebible que los oligómeros de α -sinucleína, una vez que se han formado, puedan unirse a nuevos monómeros y/o multímeros más pequeños de la α -sinucleína, y acelerar por tanto el proceso de formación de fibrillas. Dichos efectos de siembra también pueden ocurrir posiblemente en el espacio extracelular, como sugieren recientes pruebas de que la patología de α -sinucleína puede propagarse de una neurona a otra en el cerebro enfermo.

Aparte de los cambios neuropatológicos en las α -sinucleinopatías, los niveles de la proteína α -sinucleína generalmente están aumentados en las regiones cerebrales afectadas (Klucken *et al.*, 2006).

La principal patología en las α -sinucleinopatías es intracelular, lo que presenta un reto para la metodología terapéutica inmunitaria. Sin embargo, es probable que una fracción de los anticuerpos administrados inducida activa o pasivamente pueda unirse a sus antígenos objetivo también intraneuronalmente. Además, la identificación de la α -sinucleína tanto en el plasma como en el líquido cefalorraquídeo (El-Agnaf *et al.*, 2006) ilustra que la proteína no se encuentra exclusivamente dentro de las neuronas. La reducción de dicha α -sinucleína extracelular puede cambiar el equilibrio entre los conjuntos de proteína intracelular y extracelular, y dar como resultado también una disminución en la α -sinucleína intracelular. Hay pruebas que sugieren que la α -sinucleína en solución puede atravesar las bicapas lipídicas de las membranas celulares, y quedar por lo tanto internalizada o ser exportada fuera de la célula. Hallazgos recientes demuestran que la α -sinucleína ejerce sus efectos tóxicos en el espacio extracelular, proporcionando así una explicación probable de cómo la patología de la α -sinucleína se extiende por todo el cerebro según progresa la enfermedad. Algunos estudios demostraron que la patología de Lewy se transmitía a neuronas injertadas en pacientes trasplantados con PD (Li *et al.* 2008). Adicionalmente, la α -sinucleína es transmitida a través de endocitosis a las neuronas vecinas, y se ha relacionado la trasmisión de célula a célula de agregados de la α -sinucleína con la muerte de las células neuronales y la progresión patológica en la PD y en otras α -sinucleinopatías (Desplats *et al.* 2009).

Diagnóstico de la PD y de la DLB

Existe una necesidad de herramientas diagnósticas y métodos mejorados para identificar un riesgo de enfermedad neurodegenerativa con patología de α -sinucleína. Hoy en día, ningún método bioquímico puede ayudar al profesional clínico a diagnosticar los síntomas clínicos del paciente en etapas tempranas de la enfermedad, antes de que ya se haya producido un daño sustancial al cerebro.

La importancia de unos ensayos diagnósticos precisos se hará incluso mayor según aparezcan nuevas posibilidades terapéuticas. A día de hoy, únicamente hay un tratamiento sintomático (mediante la sustitución de la pérdida de la dopamina activa en el cerebro) para los pacientes con PD. Para los pacientes con DLB, hay disponibles incluso menos opciones diagnósticas. No obstante, los profesionales clínicos están evaluando frecuentemente los posibles efectos beneficiosos en los pacientes con DLB del tratamiento habitual de la AD, es decir, inhibidores de la colinesterasa. De cualquier forma, ninguna de las estrategias de tratamiento existentes para las α -sinucleinopatías están dirigidas contra los procesos patológicos subyacentes. Además, también hay una necesidad de monitorizar la progresión de la enfermedad y el efecto del tratamiento. Para una revisión de las diferentes metodologías que aspiran a alterar la progresión de la enfermedad de Parkinson, véase George *et al.* 2009.

En vista de la anteriormente mencionada implicación de la α -sinucleína en diversos trastornos neurodegenerativos, existe una necesidad de nuevos tratamientos que puedan eliminar o reducir el efecto de las especies tóxicas de α -

sinucleína, así como una necesidad de buenos biomarcadores para monitorizar nuevas intervenciones y proporcionar una buena especificidad pronóstica.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos y a fragmentos de los mismos mejorados, según se define en las reivindicaciones, que tienen una elevada afinidad por las protofibrillas de la α -sinucleína humana y una baja unión de los monómeros de α -sinucleína. La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden dicho anticuerpo o fragmento y a métodos para la detección de las protofibrillas de α -sinucleína que usan dicho anticuerpo o fragmento. En algunas formas de realización adicionales, la invención se refiere a dicho anticuerpo o fragmento para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo con patología de α -sinucleína, y al uso de dicho anticuerpo o fragmento en el diagnóstico *in vitro* o la monitorización del desarrollo de un trastorno neurodegenerativo con patología de α -sinucleína, en el que el trastorno con patología de α -sinucleína se caracteriza por la deposición de cuerpos de Lewy y de neuritas de Lewy.

En estas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento del mismo se une a las protofibrillas de la α -sinucleína humana que tienen un peso molecular en el intervalo de entre 1.000 y 5.000 kDa, en las que la unión del anticuerpo o del fragmento cada uno de los monómeros de α -sinucleína y de los monómeros de β -sinucleína es al menos 100 veces menor que la unión del anticuerpo o del fragmento a las protofibrillas de la α -sinucleína humana. y tiene tres secuencias variables pesadas (VH) de la CDR (VH-CDR-1, VH-CDR-2 y VH-CDR-3) y tres secuencias variables ligeras (VL) de la CDR (VL-CDR-1, VL-CDR-2 y VL-CDR-3), en las que las seis combinaciones de secuencias de la CDR del anticuerpo o del fragmento del mismo se seleccionan entre las siguientes combinaciones:

- (a) VH CDR-1: SEQ ID NO: 22, VH CDR-2: SEQ ID NO: 28, VH CDR-3: SEQ ID NO: 35, VL CDR-1: SEQ ID NO: 41, VL CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 50,
- (b) VH CDR-1: SEQ ID NO: 23, VH CDR-2: SEQ ID NO: 29, VH CDR-3: SEQ ID NO: 36, VL CDR-1: SEQ ID NO: 42, VL CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 50,
- (c) VH CDR-1: SEQ ID NO: 24, VH CDR-2: SEQ ID NO: 30, VH CDR-3: SEQ ID NO: 37, VL CDR-1: SEQ ID NO: 43, VL CDR-2: SEQ ID NO: 48 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 51,
- (d) VH CDR-1: SEQ ID NO: 25, VH CDR-2: SEQ ID NO: 31, VH CDR-3: SEQ ID NO: 38, VL CDR-1: SEQ ID NO: 44, VL CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 52,
- (e) VH CDR-1: SEQ ID NO: 26, VH CDR-2: SEQ ID NO: 32, VH CDR-3: SEQ ID NO: 39, VL CDR-1: SEQ ID NO: 45, VL CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 53,
- (f) VH CDR-1: SEQ ID NO: 23, VH CDR-2: SEQ ID NO: 33, VH CDR-3: SEQ ID NO: 37, VL CDR-1: SEQ ID NO: 43, VL CDR-2: SEQ ID NO: 48 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 54, y
- (g) VH CDR-1: SEQ ID NO: 27, VH CDR-2: SEQ ID NO: 34, VH CDR-3: SEQ ID NO: 40, VL CDR-1: SEQ ID NO: 46, VL CDR-2: SEQ ID NO: 49 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 55.

Los anticuerpos, los fragmentos, las composiciones y los métodos según la invención proporcionan mejoras en el diagnóstico, la monitorización, la prevención, el retraso en la aparición y/o el tratamiento de los trastornos neurodegenerativos con patología de α -sinucleína en individuos que tienen y/o están en riesgo de desarrollar dichos trastornos.

Los aspectos adicionales, las realizaciones y las ventajas de las diversas realizaciones de la presente invención serán más evidentes en vista de la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La descripción detallada se comprenderá más completamente en vista de los Dibujos, en los que:

La Fig. 1 muestra el comportamiento de los anticuerpos monoclonales específicos para las protofibrillas determinado mediante un ELISA de competición. El ensayo se llevó a cabo con protofibrillas de α -sinucleína estabilizadas con HNE según se describe en el Ejemplo 4.

Las Figs. 2A y 2B muestran el comportamiento del anticuerpo específico para las protofibrillas mAb49/G, analizado mediante un ELISA de competición, según se describe en el Ejemplo 4. La Fig. 2A muestra el anticuerpo monoclonal específico para las protofibrillas mAb49/G, que se une con elevada afinidad a las protofibrillas de la α -sinucleína humana estabilizadas con HNE o con ONE. La Fig. 2B muestra que el anticuerpo monoclonal también se une con una elevada afinidad a las protofibrillas estabilizadas con HNE de las formas humanas mutadas de la α -sinucleína, la A30P y la A53T.

Las Figs. 3A-3C muestran el comportamiento de los anticuerpos específicos para las protofibrillas analizado mediante un ELISA de competición, según se describe en el Ejemplo 4. Los anticuerpos monoclonales específicos para las protofibrillas se unen con una elevada afinidad a las protofibrillas naturales de la α -sinucleína humana estabilizadas con HNE (PF-HNE) o con ONE (PF-ONE). Los anticuerpos monoclonales también se unen con alta afinidad a las protofibrillas estabilizadas con HNE de las formas humanas mutadas de la α -sinucleína, la A30P (A30P-HNE) y la A53T (A30P-HNE).

Las Figs. 4A y 4B están dirigidas a la cuantificación de las protofibrillas de α -sinucleína mediante un ELISA en sándwich, según se describe en el Ejemplo 5. La Fig. 4A muestra un esquema del anticuerpo mAb49/G específico para las protofibrillas, usado como anticuerpo de captura y como anticuerpo de detección. La Fig. 4B muestra la curva patrón generada con protofibrillas de α -sinucleína estabilizadas con HNE. El rendimiento del ensayo alcanzó un límite de cuantificación LOQ = 9 pM.

Las Figs. 5A y 5B muestran los resultados del análisis de extractos cerebrales humanos patológicos (DLB) y de control con un ELISA en sándwich específico para las protofibrillas de α -sinucleína, según se describe en el Ejemplo 6.

La Fig. 6 muestra el análisis de los extractos cerebrales de los ratones de control (ntg, no transgénicos) y de ratones de 5 meses de edad del modelo de ratón transgénico Khale (tg) para la PD según se describe en el Ejemplo 7. El tejido cerebral se extrajo con una solución salina tamponada con tris (TBS) y con TBS en presencia de Triton. El análisis se llevó a cabo con un ELISA en sándwich específico para las protofibrillas de α -sinucleína, según se describe en el Ejemplo 5. Se usó el anticuerpo mAb49/G específico para las protofibrillas como anticuerpo de captura y como anticuerpo de detección. En la gráfica, el eje y representa la absorbancia a una DO450.

Las Figs. 7A-7F muestran los análisis inmunohistoquímicos (IHC) de los tejidos según se describe en el Ejemplo 8. La Fig. 7A muestra la unión del 38E2/7 a los cuerpos de Lewy y las neuritas en la sustancia nigra de la PD y un control positivo de α -sinucleína. La Fig. 7B muestra la unión del 38E2/7 a los cuerpos de Lewy y las neuritas en la corteza y la sustancia nigra de los DLB y un control positivo de α -sinucleína. La Fig. 7C muestra la unión de varios anticuerpos a los cuerpos de Lewy y las neuritas en la corteza y la sustancia nigra de los DLB, y un control negativo. La Fig. 7D muestra la unión de varios anticuerpos a los cuerpos de Lewy y las neuritas en la sustancia nigra de la PD y un control negativo. La Fig. 7E muestra la ausencia de unión del 38E2/7 en una sustancia nigra no relacionada con la enfermedad y un control positivo de α -sinucleína. La Fig. 7F muestra una comparación de la unión del 38E2/7 y un control positivo de α -A β en la corteza de un paciente con enfermedad de Alzheimer.

Las Figs. 8A y 8B muestran la inmunoprecipitación de extractos cerebrales humanos con el anticuerpo monoclonal selectivo para las protofibrillas 38E2/7 usando un protocolo de extracción cerebral según se describe en el Ejemplo 9.

Las Figs. 9A y 9B muestran los datos de la fluorescencia medidos usando un microscopio Axiovert200 equipado con un filtro de epifluorescencia FITC según se describe en el Ejemplo 10. La Fig. 9A muestra las células tratadas, mientras que la Fig. 9B muestra los datos calculados en forma de una reducción en el % relativo de la intensidad de la fluorescencia en comparación con las células que sobreexpresan la alfa-sinucleína no tratadas con el anticuerpo, que se estableció en el 100 %.

Las diversas figuras se comprenderán más completamente en vista de los Ejemplos establecidos a continuación.

Descripción detallada

En una primera realización, la presente invención se refiere a anticuerpos y a fragmentos de los mismos mejorados que tienen una elevada afinidad por las protofibrillas de la α -sinucleína humana y una baja unión de los monómeros de α -sinucleína. En una realización específica, los anticuerpos son de la clase IgG o mutaciones de los mismos. En la presente divulgación, la elevada afinidad por las protofibrillas de la α -sinucleína humana significa que los anticuerpos o los fragmentos muestran una constante de disociación K_d menor de 10^{-7} M para las protofibrillas de la α -sinucleína humana. Como es conocido en la materia, las protofibrillas son oligómeros solubles de α -sinucleína. Las protofibrillas típicas tienen un peso molecular en un intervalo de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 5.000 kDa, medido adecuadamente usando una cromatografía de exclusión por tamaños que usa proteínas globulares como referencia, pero la invención no está limitada a dichas protofibrillas típicas. Además, en la presente divulgación, la baja unión de los monómeros de α -sinucleína significa que la unión de un anticuerpo o de un fragmento según la invención a los monómeros de α -sinucleína es al menos 100 veces menor que a las protofibrillas de α -sinucleína. En una realización específica, estas afinidades de unión se miden mediante un ELISA de competición, por ejemplo, según se describe en el Ejemplo 4.

La invención también se refiere a dichos anticuerpos y fragmentos para su uso en la prevención, el retraso en la aparición, el tratamiento, la monitorización y/o el diagnóstico de trastornos neurodegenerativos con patología de α -sinucleína, que incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Parkinson (PD), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, la atrofia sistémica múltiple, la psicosis, la esquizofrenia y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. En las α -sinucleinopatías, la α -sinucleína agregada en forma de cuerpos de Lewy y de neuritas de Lewy se acumula en el cerebro, y en algunas indicaciones, también en otros órganos.

Algunos ejemplos de los anticuerpos según la invención se han desarrollado mediante técnicas clásicas de hibridoma. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. En una realización específica, los anticuerpos son monoclonales. Aunque la presente divulgación se refiere en muchos casos a los anticuerpos y a los fragmentos de los mismos, por conveniencia, el término "anticuerpo" en la presente divulgación incluye fragmentos del mismo, lo que significa fragmentos activos del mismo, es decir, fragmentos que tienen las mismas características que se usan para la definición de un anticuerpo según la invención, a saber, una elevada afinidad por los oligómeros/protofibrillas

de α -sinucleína y una baja unión de los monómeros de α -sinucleína. Los anticuerpos y los fragmentos de los mismos muestran una elevada eficacia en la eliminación de las formas patógenas de la α -sinucleína.

Los anticuerpos inventados se unen a las formas agregadas, en particular a las protofibrillas, que comprenden α -sinucleína, que está sin modificar o conjugada, por ejemplo, conjugada con 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) o con 4-oxo-2-nonenal (ONE), o con otros hidroxialquenos insaturados en α,β , o con ácidos grasos poliinsaturados, que estabilizan un epítipo patógeno de la protofibrilla/ α -sinucleína oligómera. Dicho epítipo o epítipos están presentes en la α -sinucleína conformacionalmente alterada o modificada, es decir, protofibrillas de α -sinucleína y oligómeros que están presentes en el cerebro humano de los pacientes con α -sinucleinopatías, tales como, pero no se limitan a, la enfermedad de Parkinson, la DLB, etc. Los anticuerpos inventados también se unen a las estructuras patógenas de protofibrillas/oligómeros formadas por mutantes de la α -sinucleína, por ejemplo, la A30P y la A53T (*Kruger et al.*, 1998) (*Polymeropoulos et al.*, 1997) que se han descrito como las causantes de la PD familiar. Otro ejemplo de dichos objetivos para los anticuerpos de la invención son las protofibrillas formadas por la α -sinucleína mutante E46K, que causa la PD o la DLB.

En una realización específica de la invención se proporcionan anticuerpos monoclonales para la diferenciación, el diagnóstico, la identificación del riesgo de desarrollo y/o el tratamiento de los trastornos relacionados con una α -sinucleinopatología, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy, la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la atrofia sistémica múltiple, la psicosis, la esquizofrenia, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y otros trastornos neurodegenerativos.

Los anticuerpos y los fragmentos de la invención comprenden secuencias definidas de aminoácidos de las regiones CDR1-3 de las cadenas variable ligera (VL) y variable pesada (VH) de los anticuerpos que tienen una elevada afinidad por las protofibrillas solubles de α -sinucleína que contienen el "epítipo de la enfermedad de PD y o de DLB". En algunas realizaciones específicas, las regiones CDR se combinan con modificaciones de la región Fc para modular las funciones efectoras tales como, pero no se limitan a, la unión al receptor de la Fc, la unión al factor del complemento C1q, la semivida eficaz, la activación del complemento y los procesos de inflamación. La región constante de un anticuerpo tiene muchas funciones importantes, especialmente la unión a los receptores de la Fc y al factor del complemento C1q. La última función puede ser inactivada para evitar reacciones inflamatorias.

Los anticuerpos y los fragmentos inventivos que tienen una elevada afinidad por las protofibrillas de α -sinucleína y una baja unión a los monómeros de α -sinucleína, tienen las siguientes ventajas perceptibles en comparación con otras modalidades conocidas de tratamiento inmunoterapéutico:

- 1) Los anticuerpos y los fragmentos inventivos se dirigen e inactivan, o al menos reducen, las protofibrillas de α -sinucleína causantes de la enfermedad, por ejemplo, mediante una inhibición de la oligomerización (véase el Ejemplo 10) o mediante otros mecanismos.
- 2) La elevada afinidad por las protofibrillas de α -sinucleína mostrada por los anticuerpos y los fragmentos inventivos reduce la dosis clínica necesaria para un tratamiento eficaz.
- 3) Los anticuerpos y los fragmentos inventivos proporcionan una modalidad para la dosificación adecuada en pacientes ancianos en comparación con una estrategia de inmunización activa, tal como una vacuna.
- 4) La baja unión a los monómeros de α -sinucleína en la periferia/sistémicamente permite por lo tanto que haya más anticuerpos/fragmentos disponibles para la unión y la eliminación de las formas oligómeras de α -sinucleína en el cerebro.
- 5) Los anticuerpos y los fragmentos reducen el riesgo de efectos secundarios inflamatorios, por ejemplo, meningoencefalitis, por una baja unión, o ninguna, al factor del complemento C1q.

Un aspecto de la invención es el descubrimiento de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo de las regiones CDR, que juegan un importante papel para la unión a las protofibrillas de α -sinucleína humanas naturales y mutantes. Los anticuerpos que tienen unos sitios de unión (regiones CDR) según la invención se caracterizan por una elevada afinidad por los oligómeros/protofibrillas de α -sinucleína humanos naturales, para su uso como productos terapéuticos o diagnósticos.

La estructura básica de una molécula de inmunoglobulina (IgG) comprende dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas entre sí por puentes de disulfuro. La cadena ligera, que es lambda o kappa, tiene una región variable (VL) y una región constante (CL) de aproximadamente 110 residuos de aminoácidos cada una. La cadena pesada tiene una región variable (VH) de aproximadamente 110 residuos de aminoácidos, pero una región constante mucho mayor (CH) de 300-400 residuos de aminoácidos, que comprende regiones o dominios CH₁, CH₂ y CH₃.

La región constante (Fc) activa el sistema del complemento y se une a los receptores de la Fc en los macrófagos, la microglía y los neutrófilos, que ingieren y destruyen los microorganismos infecciosos o los antígenos foráneos/no propios. Esta función es importante dado que es parte del principio terapéutico del anticuerpo, es decir, la fagocitosis microglial mediada por el receptor de la Fc y la eliminación de las protofibrillas de α -sinucleína. Se ha demostrado la eliminación de los intermedios oligómeros de α -sinucleína a través de la ruta de degradación lisosómica (*Lee et al.*,

2004). Este proceso implica una endocitosis dependiente del receptor o independiente del receptor de los complejos de anticuerpo/protofibrilla, seguido de una fusión con los lisosomas, en los que las protofibrillas de α -sinucleína son degradadas (*Masliah et al.*, 2005). Se ha sugerido que los receptores que controlan este proceso incluyen el receptor Thy 1.1 y la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas (LPR).

5 Asimismo, es probable que operen otros mecanismos de eliminación anti- α -sinucleína. La eliminación de las protofibrillas solubles de α -sinucleína es un mecanismo central del tratamiento según la invención. Se considera que las protofibrillas de α -sinucleína son muy neurotóxicas, iniciando y guiando el proceso de la enfermedad. La eliminación de las protofibrillas de α -sinucleína del cerebro es de un valor clínico significativo. Además de la
10 eliminación de las protofibrillas de α -sinucleína, indirectamente se reducirán otras formas agregadas de α -sinucleína, incluyendo las fibrillas de α -sinucleína, a través de la eliminación de las formas precursoras de las fibrillas de α -sinucleína, tales como las protofibrillas, los dímeros, los trímeros, los tetrameros y otras formas oligómeras mayores de la α -sinucleína. Las diferentes formas de la α -sinucleína que incluyen las protofibrillas y las fibrillas, están en equilibrio. El tratamiento con un anticuerpo de alta afinidad de unión por la protofibrilla y la eliminación de las
15 protofibrillas de α -sinucleína por parte de dicho anticuerpo también tendrá la ventaja de reducir indirectamente otros agregados o formas oligómeras de la α -sinucleína. Otro mecanismo de acción más de los anticuerpos sería bloquear o inhibir la toxicidad de la α -sinucleína mediante la unión a las especies tóxicas de α -sinucleína, impidiendo sus interacciones con las neuronas.

20 Las respectivas regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen tres regiones hipervariables denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las regiones CDR son unos tramos cortos de aproximadamente 7-23, por ejemplo, de 13-23 aminoácidos, ubicados en las regiones VL y VH. Las seis regiones CDR de un "brazo" del anticuerpo forman el "bolsillo" que se une al antígeno. En la bibliografía se usan numerosas definiciones de las secuencias de CDR. Las SEQ ID NOS: 1-21 definen las secuencias CDR inventivas usando un
25 primer sistema de identificación, y las secuencias de CDR así identificadas se muestran en la VL y en la VH en anticuerpos monoclonales específicos para las protofibrillas de α -sinucleína humanas naturales y mutantes en la Tabla 1 (véase el Ejemplo 2) mediante las regiones subrayadas. Las SEQ ID NOS: 22-55 identifican las secuencias de CDR inventivas usando el conocido sistema de Kabat, y las secuencias de CDR de Kabat así identificadas se muestran en la VL y en la VH en anticuerpos específicos para las protofibrillas de α -sinucleína humanas naturales y mutantes en la Tabla 2 (véase el Ejemplo 2) mediante las regiones subrayadas. En la presente divulgación se usa la
30 identificación de las secuencias de CDR inventivas según Kabat (SEQ ID NOS: 22-55).

35 Por lo tanto, un anticuerpo según la invención se caracteriza por tener las seis secuencias de CDR (VH-CDR-1, VH-CDR-2, VH-CDR-3, VL-CDR-1, VL-CDR-2 y VL-CDR-3) seleccionadas entre cada uno de los siguientes grupos respectivos de secuencias de CDR en las combinaciones como se ha especificado anteriormente.

VH CDR-1

GFTFNTYAM	SEQ ID NO: 1	GFTFNTYAMN	SEQ ID NO: 22
GFTFSNYAM	SEQ ID NO: 2	GFTFSNYAMS	SEQ ID NO: 23
GFTFSSYAM	SEQ ID NO: 3	GFTFSSYAMS	SEQ ID NO: 24
GDSFTSGYW	SEQ ID NO: 4	GDSFTSGYWN	SEQ ID NO: 25
		GFSLSYGVH	SEQ ID NO: 26
		GFTFTDYMS	SEQ ID NO: 27

VH CDR-2

RIRTKSNDYATYYADSVKG	SEQ ID NO: 5
TKSNDYATYYADSV	SEQ ID NO: 28
SGGSYTYYPDSVRG	SEQ ID NO: 6
SGGSYTYYPDSV	SEQ ID NO: 29
VGGSYTYYPDSVKG	SEQ ID NO: 7
VGGSYTYYPDSV	SEQ ID NO: 30
YSGNTYYNPSLKS	SEQ ID NO: 8
YSGNTYYNPSL	SEQ ID NO: 31
RGGSTDYSAAF	SEQ ID NO: 32

ES 2 661 925 T3

FGGSYTYYPDSV	SEQ ID NO: 33
∨ KANGYTTEYSASV	SEQ ID NO: 34

	VH CDR-3
VGYPYAMDY	SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 35)
QNFGRGWYFDV	SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 36)
HSDYSGAWFAY	SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 37)
SYDYDRAWFAY	SEQ ID NO: 12 (SEQ ID NO: 38)
LLRSVGGFAD	SEQ ID NO: 39
DYGNYAMDY	SEQ ID NO: 40

	VL CDR-1
RSSQNVHNSNGNTYLE	SEQ ID NO: 13 (SEQ ID NO: 41)
RSSQSIVNSNGNTYLE	SEQ ID NO: 14 (SEQ ID NO: 42)
SASSVSYMY	SEQ ID NO: 15 (SEQ ID NO: 43)
RSSQSLVHNSNGNTYLH	SEQ ID NO: 16 (SEQ ID NO: 44)
RSSQTIVHNSNGNTYLE	SEQ ID NO: 45
KSSQSLLYSSNQKNYLA	SEQ ID NO: 46

5

	VL CDR-2
KVSNRFS	SEQ ID NO: 17 (SEQ ID NO: 47)
RTSNLAS	SEQ ID NO: 18 (SEQ ID NO: 48)
WASTRES	SEQ ID NO: 49

	VL CDR-3
FQGSHPVPLT	SEQ ID NO: 19 (SEQ ID NO: 50)
QQYHSYPYT	SEQ ID NO: 20 (SEQ ID NO: 51)
SQSTHVPWT	SEQ ID NO: 21 (SEQ ID NO: 52)
FQGSHPVFT	SEQ ID NO: 53
QQFHSYPYT	SEQ ID NO: 54
QQYYSYPYT	SEQ ID NO: 55

10 Uno de los anticuerpos que fue inicialmente seleccionado por ciertas características interesantes fue rechazado porque no cumplía los criterios que definen un anticuerpo según la presente invención. Un parámetro importante de rechazo fue la comparativamente corta secuencia VH CDR-3, con cinco aminoácidos expuestos por este anticuerpo. Por lo tanto, se concluye que la secuencia VH CDR-3 necesita tener más de 5 aminoácidos. En algunas realizaciones específicas, la secuencia VH CDR-3 tiene 9, 10, 11 o 12 aminoácidos.

15 Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos y los fragmentos de unión a las protofibrillas de α -sinucleína según la invención se caracterizan por una elevada afinidad por el objetivo. La elevada afinidad, expresada como la constante de disociación K_d , es menor de 10^{-7} M. En realizaciones adicionales, la constante de disociación K_d para las protofibrillas de la α -sinucleína humana es menor de 10^{-8} M, menor de 10^{-9} M, menor de 10^{-10} M o incluso menor de 10^{-11} M. Estos anticuerpos y fragmentos tienen la ventaja de que pueden ser administrados a bajas dosis en comparación con los anticuerpos con unas afinidades de alrededor de 10^{-6} M o mayores. Esto tiene una ventaja clínica significativa, ya que estos anticuerpos de alta afinidad, que pueden ser administrados mediante inyección, pueden ser administrados por vía subcutánea dado que sólo es necesaria una pequeña cantidad del anticuerpo para conseguir eficacia. Las modalidades de administración no están limitadas a las inyecciones subcutáneas o intravenosas. Adicionalmente, las menores dosis necesarias para la eficacia reducirán el coste de los materiales para la producción del anticuerpo.

30 Además de los anticuerpos de alta afinidad por las protofibrillas de α -sinucleína, los anticuerpos y los fragmentos muestran una baja unión a los monómeros de α -sinucleína y opcionalmente una baja unión a las fibrillas de α -sinucleína. Como se ha mencionado anteriormente, la baja unión a los monómeros de α -sinucleína significa que la unión de un anticuerpo o de un fragmento según la invención a los monómeros de α -sinucleína es al menos 100 veces menor que a las protofibrillas de α -sinucleína. En realizaciones más específicas, la unión de un anticuerpo o de un fragmento según la invención a las protofibrillas de α -sinucleína es mayor de 500 veces, o incluso más de 1.000 veces mayor que a los monómeros de α -sinucleína.

35

En otra realización, los anticuerpos y los fragmentos muestran una baja unión a las fibrillas de α -sinucleína. En realizaciones más específicas, la unión de un anticuerpo o de un fragmento según la invención a las protofibrillas de α -sinucleína es mayor de 100 veces, más de 500 veces, o incluso más de 1.000 veces mayor que a las fibrillas de α -sinucleína.

5 En otra realización más de la invención, los anticuerpos y los fragmentos muestran una baja unión a las protofibrillas de beta amiloide ($A\beta$) (por ejemplo, una $K_d > 10^{-5}$ M) y a los monómeros de beta amiloide (por ejemplo, una $K_d > 10^{-5}$ M).

10 En otra realización más de la invención, los anticuerpos y los fragmentos muestran una baja unión al monómero de β -sinucleína, al monómero de γ -sinucleína, IAPP (polipéptido de amiloide en islote) y/o al polipéptido Medin, por ejemplo, la unión de los anticuerpos y de los fragmentos es al menos 100 veces menor a uno o más de estos péptidos/proteínas que a las protofibrillas de la α -sinucleína humana.

15 Según otra realización de la invención, el anticuerpo o el fragmento según la presente invención puede estar definido por la unión en un sistema modelo a un epítipo lineal de la α -sinucleína en la región de los aminoácidos (aa) 113-140, por ejemplo, la región de los aa 113-131, con los aa 125-131, 121-124, 121-127, 121-131, 113-123 y 136-140 como ejemplos de epítipos específicos. En este sistema modelo se usan los péptidos de α -sinucleína de 15-mer con un solapamiento de secuencia de 11 aminoácidos (véase el siguiente Ejemplo 3).

20 Según una realización adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento que tiene una elevada afinidad por las protofibrillas de la α -sinucleína humana y una baja unión de los monómeros de α -sinucleína y que comprende una combinación de secuencias de CDR seleccionada entre las siguientes combinaciones:

- 25 (a) VH CDR-1: SEQ ID NO: 22, VH CDR-2: SEQ ID NO: 28, VH CDR-3: SEQ ID NO: 35, VL CDR-1: SEQ ID NO: 41, VL CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 50,
 (b) VH CDR-1: SEQ ID NO: 23, VH CDR-2: SEQ ID NO: 29, VH CDR-3: SEQ ID NO: 36, VL CDR-1: SEQ ID NO: 42, VL CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 50,
 (c) VH CDR-1: SEQ ID NO: 24, VH CDR-2: SEQ ID NO: 30, VH CDR-3: SEQ ID NO: 37, VL CDR-1: SEQ ID NO:
 30 43, VL CDR-2: SEQ ID NO: 48 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 51,
 (d) VH CDR-1: SEQ ID NO: 25, VH CDR-2: SEQ ID NO: 31, VH CDR-3: SEQ ID NO: 38, VL CDR-1: SEQ ID NO: 44, VL CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 52,
 (e) VH CDR-1: SEQ ID NO: 26, VH CDR-2: SEQ ID NO: 32, VH CDR-3: SEQ ID NO: 39, VL CDR-1: SEQ ID NO: 45, VL CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 53,
 35 (f) VH CDR-1: SEQ ID NO: 23, VH CDR-2: SEQ ID NO: 33, VH CDR-3: SEQ ID NO: 37, VL CDR-1: SEQ ID NO: 43, VL CDR-2: SEQ ID NO: 48 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 54, y
 (g) VH CDR-1: SEQ ID NO: 27, VH CDR-2: SEQ ID NO: 34, VH CDR-3: SEQ ID NO: 40, VL CDR-1: SEQ ID NO: 46, VL CDR-2: SEQ ID NO: 49 y VL CDR-3: SEQ ID NO: 55.

40 El anticuerpo o el fragmento se une a un epítipo en la región de los aminoácidos (aa) 113-140, por ejemplo, la región de los aa 113-131 y en particular los aa de los epítipos 125-131, 121-124, 121-127, 121-131, 113-123 o 136-140, de la α -sinucleína lineal inmovilizada en un sistema modelo que comprende péptidos de α -sinucleína de 15-mer con un solapamiento de 11 aminoácidos.

45 Según otra realización específica de la invención, los anticuerpos de unión de alta afinidad a las protofibrillas de la α -sinucleína pueden reducir o inhibir la agregación de la α -sinucleína, reduciendo así los niveles de las formas oligómeras solubles de la α -sinucleína en el cerebro.

50 Según otra realización específica de la invención, los anticuerpos de unión de alta afinidad a las protofibrillas de la α -sinucleína pueden unirse a los oligómeros/protofibrillas de α -sinucleína también fuera del SNC, cambiando así el equilibrio de dichas formas de α -sinucleína a través de la barrera hematoencefálica de tal forma que se reduzcan los niveles de dichas formas de α -sinucleína en el SNC (drenaje).

55 Según otra realización específica de la invención, los anticuerpos son de la clase de la IgG, adecuados para su uso terapéutico, que pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Los anticuerpos de IgG de unión de alta afinidad a las protofibrillas de la α -sinucleína pueden estar diseñados para reducir la unión del factor del complemento C1q al dominio CH2 de la IgG 1 y reducir la activación del complemento y el riesgo de inflamación. Esta modificación puede llevarse a cabo de diferentes formas. Una forma es crear un anticuerpo quimérico en el que el CH2 de la región constante de la IgG1 ha sido deletado y cambiado por el correspondiente dominio de la IgG4 o parte del dominio
 60 que confiere unión al C1q. Está bien establecido que la IgG4 no se une al C1q y por lo tanto, no activa la cascada del complemento. Para conseguir esto, la región constante de la cadena pesada (CH) es diseñada de tal forma que se combine el dominio del receptor de la Fc de alta afinidad (CH γ 3) de la IgG1 con el dominio de la IgG4 (CH γ 2), que no tiene ninguna unión por el factor del complemento C1q. Este nuevo anticuerpo que contiene la cadena pesada constante quimérica (IgG1:CH γ 1, CH γ 2:IgG4, CH γ 3:IgG1) tiene las importantes propiedades tanto de una eficaz
 65 eliminación de las protofibrillas de α -sinucleína a través de una fagocitosis mediada por el receptor de la Fc, como de un riesgo reducido de efectos secundarios, es decir, de una inflamación tal como una meningoencefalitis.

Otra forma más de reducir el riesgo de inflamación es alterar la estructura de oligosacárido del anticuerpo, que reducirá la unión al factor del complemento C1q y la activación del complemento. Se han descrito treinta estructuras diferentes de los oligosacáridos biantenarios en complejo en la Asn-297 de la IgG1 humana. Se cree que la ausencia de los carbohidratos asociados al CH2 causa un cambio conformacional en la región de "bisagra" del anticuerpo, reduciendo las eficacias de interacción con las moléculas efectoras y perdiendo la función de activación y la unión al complemento y al C1q.

La modificación de un anticuerpo de unión de alta afinidad a las protofibrillas de la α -sinucleína humana mediante una mutagénesis dirigida de la Asn-297 por cualquier otro aminoácido generará un anticuerpo con la unión al receptor de la Fc conservada con menos unión al C1q, y por lo tanto un riesgo reducido de inflamación, en particular en la barrera hematoencefálica. Una alternativa para la modificación de la glicosilación del anticuerpo es expresar el anticuerpo en un tipo de célula en el que se ha inactivado la enzima N-acteilglucosaminil-transferasa I. Esto producirá un anticuerpo con la estructura de carbohidrato alterada en la Asn-297. Se forma una estructura de $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, pero no se limita a esta estructura. Esta modificación del carbohidrato reducirá la unión al factor del complemento C1q e inhibirá la inflamación (*Wright et al.* 1998). Alternativamente, pueden conseguirse anticuerpos de unión a la protofibrilla aglicosilada cultivando células que expresen los anticuerpos en presencia de tunicamicina, que inhibe la glicosilación. Estos anticuerpos tendrán una actividad activadora del complemento alterada, así como una función del receptor de la Fc alterada (*Leatherbarrow et al.* 1985). El cribado de los clones que expresan los anticuerpos con una baja activación del complemento y una elevada unión al receptor de la Fc generará anticuerpos de unión a las protofibrillas que muestran una elevada eliminación mediada por la Fc de las protofibrillas de α -sinucleína y una baja unión al C1q.

En otra realización, el anticuerpo de unión de alta afinidad a las protofibrillas de la α -sinucleína humana es de la subclase de la IgG, por ejemplo, la IgG1 o la IgG4, donde el sitio de unión al factor del complemento C1q ha sido modificado, es decir, Pro331 > Ser331 (*Xu et al.* 1994), de tal forma que se reduce o se inhibe la unión del factor del complemento C1q. Dichos anticuerpos son particularmente adecuados para su administración, es decir, para el tratamiento, la prevención o el retraso en la aparición de un trastorno neurodegenerativo con patología de α -sinucleína, en un individuo con dicho trastorno o que está en riesgo de desarrollar dicho trastorno, por ejemplo, pero no se limita a, un individuo que tiene, o que está en riesgo de desarrollar, la PD. El residuo de prolina en la posición 331 de la IgG1 humana también puede ser cambiado por una treonina o una glicina o por cualquier otro aminoácido polar. Esta modificación puede llevarse a cabo mediante las técnicas de biología molecular habituales, tales como una mutagénesis dirigida o deleciones en el ADN.

Otro aspecto más de la invención es el uso de un anticuerpo de unión de alta afinidad a las protofibrillas de la α -sinucleína humanas para determinar específicamente los niveles de protofibrillas en tejidos humanos o animales, por ejemplo, en líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, orina, saliva o tejido cerebral, como una herramienta diagnóstica o como un biomarcador de, o para monitorizar un trastorno neurodegenerativo con patología de α -sinucleína. La enfermedad de Parkinson (PD), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, la atrofia sistémica múltiple, la psicosis, la esquizofrenia y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob son únicamente algunos ejemplos de dichos trastornos neurodegenerativos con patología de α -sinucleína. Por ejemplo, es probable que los niveles de las protofibrillas de la α -sinucleína humana en el LCR o en la sangre de un paciente con PD sean diferentes en comparación con un grupo de ancianos de control emparejados que no tienen la enfermedad de Parkinson o cualquier otra α -sinucleinopatía. Es probable que una persona que está desarrollando la enfermedad de Parkinson o cualquier otra α -sinucleinopatía tenga unos niveles alterados de los niveles de las protofibrillas de α -sinucleína en el LCR o la sangre en comparación con los sujetos de control. Por lo tanto, la determinación de los niveles de las protofibrillas de α -sinucleína en el LCR o en la sangre puede proporcionar un diagnóstico temprano de la enfermedad. Esto es posible conseguirlo con los nuevos anticuerpos de unión de alta afinidad a las protofibrillas de la α -sinucleína según la invención y, en una realización específica, puede conseguirse junto con un método de ELISA en sándwich (véase el Ejemplo 5), donde las protofibrillas de α -sinucleína se han determinado por debajo de un nivel de 9 pM. La interferencia de otras formas de la α -sinucleína, particularmente de los monómeros de α -sinucleína y opcionalmente de las fibrillas de α -sinucleína y de los fragmentos de α -sinucleína fragmentos en el ensayo, es despreciable.

Algunos ejemplos de métodos adecuados para el ensayo de las protofibrillas de α -sinucleína en estos tejidos, así como en cultivos celulares usando un anticuerpo anti- α -sinucleína comprenden inmunoensayos tales como un ELISA, un RIA, una inmunotransferencia Western o una transferencia de manchas. Estos métodos son adecuados para hacer un seguimiento de la eficacia del tratamiento medido por la reducción en las protofibrillas en ensayos clínicos y/o como una prueba diagnóstica. Dado que los niveles de las protofibrillas de α -sinucleína son muy bajos en el LCR y en la sangre, el anticuerpo de unión de alta afinidad a las protofibrillas de la α -sinucleína de la invención es ventajoso para una prueba diagnóstica, por ejemplo, basada en un método de ELISA, para permitir la medición de bajos niveles de las protofibrillas de α -sinucleína.

Según dichos métodos, se añade el anticuerpo o el fragmento según la invención a una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende protofibrillas de α -sinucleína, y se detecta la presencia de un complejo formado entre las protofibrillas de α -sinucleína y el anticuerpo o el fragmento. El complejo puede ser detectado

cualitativamente, es decir, se detecta la presencia del complejo, o cuantitativamente, es decir, puede detectarse la concentración del complejo o una concentración umbral del complejo, según se desee.

5 En algunas realizaciones adicionales, la invención incluye el uso de los anticuerpos y de los fragmentos específicos de alta afinidad para las protofibrillas en la obtención de imágenes para la detección, la localización y la cuantificación de las protofibrillas de α -sinucleína en tejidos humanos y animales. El anticuerpo o el fragmento puede estar marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un ligando radioactivo tal como I^{131} , C^{14} , H^3 o Galio⁶⁸, pero no se limita a estos radioisótopos, y ponerse en contacto con una muestra o ser administrado con fines de detección.

10 Dichos métodos son adecuados como una herramienta diagnóstica de los trastornos neurodegenerativos con patología de α -sinucleína, que incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy y otros trastornos neurodegenerativos relacionados con la α -sinucleína. Dichos métodos pueden llevarse a cabo para realizar un seguimiento del desarrollo de una enfermedad relacionada con una α -sinucleína en un sujeto sin o con medicación, u otro posible tratamiento.

15 Por lo tanto, en un aspecto de la invención, se añaden los anticuerpos a una muestra biológica que comprende o que se sospecha que comprende las protofibrillas de α -sinucleína, se mide la concentración del complejo formado entre dichas protofibrillas y dicho anticuerpo para la detección y/o la cuantificación de las protofibrillas en la muestra. En algunas realizaciones específicas, los métodos de detección incluyen un inmunoensayo y un ensayo de unión por proximidad. La muestra biológica puede ser una muestra *in vitro* tomada a partir de un sujeto. Alternativamente, puede llevarse a cabo un método de detección usando un volumen de líquido *in vivo*.

20 Otro aspecto más de la invención es la creación de especies de anticuerpos específicas para su uso en medicina veterinaria. Los métodos diagnósticos descritos también son adecuados para su uso veterinario.

25 Otro aspecto de la invención es la humanización de dichos anticuerpos para evitar efectos secundarios, es decir, para evitar una respuesta inmunitaria contra los anticuerpos en los seres humanos cuando se usa como un agente terapéutico o diagnóstico. Dichas técnicas de humanización están en la capacidad del experto habitual en la materia.

30 Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden un anticuerpo o un fragmento según se describe en el presente documento, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica para uso terapéutico, las composiciones son formulaciones fisiológicamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente activa de un anticuerpo o de un fragmento según la invención en un tampón fisiológico, por ejemplo, pero no se limita a, PBS, adecuado para su administración a seres humanos y/o animales. El anticuerpo o el fragmento puede ser liofilizado para una mejor estabilidad. La formulación liofilizada puede contener cualquier excipiente adecuado convencional, incluyendo estabilizantes, lioprotectores, tampones, y similares, tales como, pero no se limitan a, manitol, para proteger y/o estabilizar el producto durante y/o después de la liofilización y/o en su posterior conservación.

40 Opcionalmente, la formulación del anticuerpo puede contener un agente antibacteriano u otro conservante o aditivo que no interfiera con la función o la eficacia del anticuerpo o el fragmento de unión a las protofibrillas.

Ejemplos

45 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, y no pretenden limitar la invención a estos ejemplos específicos.

Ejemplo 1

50 Anticuerpos contra las protofibrillas de α -sinucleína

Anticuerpos de inmunización/policlonales

55 En el esquema de inmunización se utilizan ratones Balb/C. Como antígeno se usan protofibrillas de α -sinucleína estabilizadas con HNE. Éstas se han producido como se describió previamente (documento WO 2009/133521), con la siguiente excepción: se usa una proporción de 60:1 entre el HNE y la α -sinucleína. Para la inmunización, se les inyectan a los ratones las protofibrillas de α -sinucleína estabilizadas con HNE y adyuvante (por ejemplo, 3-6 veces). Se realizó una inyección de refuerzo que contiene protofibrillas de α -sinucleína modificadas con HNE antes de sacrificar a los ratones. La sangre de los ratones inmunizados se analizó para evaluar la reactividad frente a las protofibrillas de α -sinucleína y a los monómeros de α -sinucleína. La especificidad de la respuesta frente al anticuerpo policlonal se analizó mediante un ELISA directo. En un experimento típico, se recubre una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano de elevada unión con α -sinucleína monomérica (sin modificar o modificada con HNE o con otros aldehídos), protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína (sin modificar o modificada con HNE o con otros aldehídos) o α -sinucleína fibrilar, a una concentración final de 400 ng/pocillo. Los pocillos se bloquean con BSA al 2 %, se lavan con Tween-20 al 0,05 %/ PBS y se añaden los sobrenadantes del medio celular (sin diluir o diluidos a 1:1 con solución salina tamponada con fosfato) de los anticuerpos policlonales investigados a

los pocillos como anticuerpos primarios. Se usa un anticuerpo de IgG/IgM de ratón anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.) como el anticuerpo secundario a una dilución de 1/1.000. La inmunorreactividad se visualiza usando p-nitrofenil-fosfato (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.).

- 5 En el suero se detectan los anticuerpos que reconocen específicamente las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína. Además, pueden encontrarse anticuerpos que reconocen los monómeros de α -sinucleína. El control negativo representa un ratón no inmunizado.

Hibridoma/anticuerpos monoclonales

10 Se usaron hibridomas de linfocitos B de ratón para producir los anticuerpos monoclonales de unión a las protofibrillas de α -sinucleína. Se aíslan células de bazo y se muelen en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se centrifugan a 1200 x g durante 10 min para recoger un sedimento rico en células. Las células se lavan adicionalmente con PBS y se centrifugan a 1200 x g durante 10 min. El sedimento celular se resuspende en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM, Invitrogen La Jolla, CA, EE.UU.) complementado con un 1 % de antibióticos. 15 Las células de bazo se mezclan en una proporción de 1:1 con células Sp2/0 (línea celular de mieloma de ratón) en DMEM. Para facilitar la fusión celular se añade 1 ml de polietilenglicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) a la mezcla de células, y la reacción se detiene mediante la adición de DMEM. Las células se recogen y el sedimento se resuspende en DMEM complementado con un 10 % (v/v) de suero bovino fetal (Cambrex, Charles City, IA, EE.UU.) y que también contiene un 1 % (v/v) de piruvato de sodio (Cambrex, Charles City, IA, EE.UU.), un 1 % (v/v) de 20 glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y un 1 % (v/v) de L-glutamina (Cambrex, Charles City, IA, EE.UU.), un 5 % (v/v) de medio BM condicionado (Roche Diagnostics Scandinavia, Bromma, Suecia) y un 2 % (v/v) de complemento de medio HAT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Las células se ponen en placas de cultivo celular de 96 pocillos y se dejan reposar y crecer durante 2 semanas.

25 Los sobrenadantes de las células de hibridoma se analizan en un ELISA directo. En un experimento típico se recubre una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de elevada unión con fondo redondo con α -sinucleína monomérica (sin modificar o modificada con HNE o con otros aldehídos), con α -sinucleína oligómera/protofibrilar (sin modificar o modificada con HNE o con otros aldehídos) o con α -sinucleína fibrilar. Los pocillos se bloquean con BSA al 1 %, se lavan con PBS-Tween 20 (al 0,05 %) y se añaden los sobrenadantes del medio celular (sin diluir o diluidos a 1:2 o a 1:5 con PBS-Tween 20 (al 0,05 %)) del hibridoma investigado a los pocillos como anticuerpos primarios. Se usa Ig anti-ratón de cabra acoplada a HRP conjugada con peroxidasa de rábano picante (Southern Biotechnology, prod. nº 1010-05) como el anticuerpo secundario a una dilución de 1/5.000. La inmunorreactividad se visualiza usando sustrato de TMB K-Blue Aqueous (Neogen Corp. prod. nº 331177).

Ejemplo 2

Sequencia de aminoácidos de los anticuerpos monoclonales de las regiones variables de la cadena pesada (VH) y de la cadena ligera (VL/Vkappa) específicos para las protofibrillas de α -sinucleína

40 Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada (VH) y de la cadena ligera (VL), que incluyen las regiones CDR de los anticuerpos, se determinaron mediante una RT PCR del molde de ARNm, seguido de la secuenciación del ADN. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) y de la cadena ligera de la región variable (VL) de los anticuerpos seleccionados se muestran en la Tabla 1. Las posiciones de las regiones CDR 1-3 se muestran subrayadas. Las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR forman la base estructural para la unión de las protofibrillas de α -sinucleína humanas naturales y mutantes que constituyen el "epítipo patógeno" de las protofibrillas de α -sinucleína.

50 Las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR 1-3 de las respectivas cadenas VL y VH para los anticuerpos específicos para las protofibrillas según la invención se muestran en la Tabla 1. En la Tabla 2 están incluidas las secuencias de CDR de una serie de anticuerpos adicionales según la invención.

55 Las secuencias de aminoácidos combinadas de las regiones CDR1-3 de las cadenas VH y VL crean el "bolsillo" molecular que se une a las protofibrillas de α -sinucleína humanas naturales con una elevada afinidad y especificidad. Este "bolsillo" forma la base estructural del "epítipo de PD/DLB". Se usaron variaciones en la longitud de la secuencia de aminoácidos de la CDR tanto en la cadena VH como en la cadena VL, y son compatibles con la unión a las protofibrillas de la α -sinucleína humana. Una región CDR más corta proporciona una estructura tridimensional más restringida en el bolsillo de unión del anticuerpo, mientras que una región CDR más larga es más flexible.

60 Las secuencias de CDR según se muestran en las Tablas 1 y 2 son realizaciones de la presente invención, ya que son las secuencias de aminoácidos de las "en marco de ratón" de las cadenas VH y VL, es decir, fuera de las regiones CDR, así como las regiones en marco de las VL y VH humanas para los anticuerpos específicos para las protofibrillas como, pero no se limita a, esas.

65

Otras sustituciones de aminoácidos en las regiones CDR distintas a las que se muestran en las Tablas 1 y 2 son compatibles con una unión de alta afinidad y de alta especificidad a las protofibrillas de la α -sinucleína humana.

- 5 Cuando hay presente un aminoácido polar en una posición en particular de una región CDR, ese aminoácido en particular puede ser sustituido por otro aminoácido polar, con una elevada afinidad y especificidad de unión por las protofibrillas de α -sinucleína conservada o mejorada. Asimismo, si hay presente un aminoácido no polar o con carga negativa o positiva en una cierta posición, ese aminoácido puede ser sustituido por un aminoácido similar con el mismo grupo de polaridad.
- 10 Con respecto al aminoácido o los aminoácidos en particular que pueden ser intercambiados en cualquier posición de las regiones CDR por equivalentes funcionales que confieren sustancialmente la misma función y estructura al anticuerpo con respecto a la afinidad por las protofibrillas de α -sinucleína, dichas construcciones están, por supuesto, en el ámbito de la presente invención. A este respecto, los anticuerpos y los fragmentos que tienen una similitud mayor del 70, del 80, del 90, del 95 o del 98 % con una de las previamente indicadas secuencias de VH
- 15 CDR y VL CDR de los respectivos grupos, con el epítipo de unión mantenido según se describe en el presente documento, están en el ámbito de la presente invención.

20 Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada (VH) y de la cadena ligera (VL/Vkappa) de cuatro anticuerpos monoclonales diferentes específicos para las protofibrillas de α -sinucleína humanas naturales y mutantes. Las posiciones de las diversas regiones CDR (1-3) están subrayadas en la VL y en la VH. Los anticuerpos BA1-BA4 son ejemplos de los anticuerpos específicos de alta afinidad para las protofibrillas según la invención.

VH-BA1: 49/G (SEQ ID NO: 56) EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCATSGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRTKSNDYATYYADSVKGRITIS RDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYCYCVR <u>VGYRPYAMDY</u> WGQGTSTVSS
VH-BA2: 38E2/7 (SEQ ID NO: 57) EVQLVESGGDLVKPGGSLKFSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPDKRLEWVATVTSGGSYTYYPDSVGRFTISR DNAKNTLYLQLSSLKSEDTAMYFCAR <u>QNFGRGWYFDV</u> WGAGTTVTVSS
VH-BA3: 38F11/2_8 (SEQ ID NO: 58) EVMLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISNGGSYTYYPDSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYCAR <u>HSDYSGAWFAY</u> WGQGLTVTVSA
VH-BA4: 48B11/8 (SEQ ID NO: 59) EVQLQESGPSLVKPSQTLSTLCSVTGDSFTSGYWNWIRKFPGNKLEYMGYIRYSGNTYYNPSLKRISITRDT KNQYYLQLISVTTEDATFYCAR <u>SYDYDRAWFAY</u> WGQALTVTVSA
Vkappa-BA1: 49/G (SEQ ID NO: 60) DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPSTLLIY <u>KVSNRFS</u> GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYYC <u>FQGSHVPLT</u> FGAGTKLELK
Vkappa-BA2: 38E2/7 (SEQ ID NO: 61) DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVNSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY <u>KVSNRFS</u> GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYYC <u>FQGSHVPLT</u> FGAGTTLELK
Vkappa-BA3: 38F11/2_8 (SEQ ID NO: 62) QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQKPGSSPKWIY <u>RTSNLAS</u> GVPARFSGSGSGTSSYSLTI SSMEAEDAATYYC <u>QQYHSYPYT</u> FGGGTKLEIK
Vkappa-BA4: 48B11/8 (SEQ ID NO: 63) DWMQTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIY <u>KVSNRFS</u> GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYFC <u>SQSTHVPWT</u> FGGGTKLEIK

Tabla 2: secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de ocho anticuerpos diferentes específicos para las protofibrillas de α -sinucleína humanas naturales y mutantes. Están marcadas las posiciones de las diversas regiones CDR según el sistema de Kabat. Los anticuerpos son ejemplos de anticuerpos específicos de alta afinidad para las protofibrillas según la invención. Las cadenas pesadas son respectivamente las SEQ ID NOS: 64-71, y las cadenas ligeras son respectivamente las SEQ ID NOS: 72-79.

Cadenas pesadas

49/G EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSKCATSGFTPTNYAMNWRQAPGKLEWVAIRTRKSNDAIYVADSVKGRITISRDDSQSMLYLQMNLLKTEDTAMYCYVRYGYPYA--MDYWGQGTSVTVSS
 38E2/7 EVQLVESGGDLVQPKGGSLKLSKCAASGFTFSNYAMSWVRQTPDKRLEWVAIVTS--CGSYTYYPDSVYRGRFTISRDNAKNTLYLQLSLSLKSEDTAMYFCARQNFSGRWYFDWAGAGTIVTVSS
 38F11/2.8 EVMLVESGGGLVQPKGGSLKLSKCAASGFTFSSYAMSWVRQTPDKRLEWVAIVTSN--CGSYTYYPDSVYRGRFTISRDNAKNTLYLQMSLSRSEDTAMYFCARHSDYSGAW--FAYWGQGTIVTVSSA
 48B11/8 EVQLQESGFLVQPKGSLKLSKCAASGFTFSGYMNWIRKPPGNKLEWVAVIR--YSGNTYYPDSVYRGRFTISRDNAKNTLYLQMSLSRSEDTAMYFCARHSDYSGAW--FAYWGQGTIVTVSSA
 47E7/3.47 QVQLKQSGPSLVQPSQSLITCSVSGFSLTSGYVHWVRLSPGKLEWLVGIW--RGGSTDYSAAMSRSLITKDNKSQVFFKMSLQADDTAIYCAKLLRSVGG--FADWGQGTIVTVSSA
 37D2/14 EVMLVESGGGLVQPKGGSLKLSKCAASGFTFSNYAMSWVRQTPDKRLEWVAIVTS--CGSYTYYPDSVYRGRFTISRDNANNALYLQMSLSRSEDTAMYFCARHSDYSGAW--FAYWGRGTLIVTVSSA
 43B9/1.4 EVQLQESGFLVQPKGSLKLSKCAASGFTFSGYMNWIRKPPGNKLEWVAVIR--YSGNTYYPDSVYRGRFTISRDNANNALYLQMSLSRSEDTAMYFCARHSDYSGAW--FAYWGRGTLIVTVSSA
 38E10/13.6.4 EVKLIVESGGGLVQPKGGSLKLSKCATSGFTPTDYXMSWVRQPPGKALEWLVGFIIRKANGYITTEYSASVYKGRFTISRDNNSQSIILYLQMNLTLRAEEDSATYFCARDYGNVA--MDYWGQGTSVTVSS

Cadenas pesadas

49/G DVILMTQTPLSLPVLGDDQASISCRSSQ--NIVHNSNGNTVLEWYIQKPGQSPFTLLIYKVSNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPV-----ITFGAGTKLEIK
 38E2/7 DVILMTQTPLSLPVLGDDQASISCRSSQ--SIVNSNGNTVLEWYIQKPGQSPKLLIYKVSNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPV-----ITFGAGTKLEIK
 38F11/2.8 QIVLTQSPAIMSAPGKVTISCSASS--SIVNSNGNTVLEWYIQKPGQSPKLLIYKVSNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPV-----ITFGAGTKLEIK
 48B11/8 DVVMTQTPLSLPVLGDDQASISCRSSQ--SIVHNSNGNTVLEWYIQKPGQSPKLLIYKVSNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPV-----WTFGGGTKLEIK
 47E7/3.47 DVILMTQTPLSLPVLGDDQASISCRSSQ--TIVHNSNGNTVLEWYIQKPGQSPKLLIYKVSNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPV-----ETFGGTKLEIK
 37D2/14 QIVLTQSPAIMSAPGKVTISCSASS--SIVNSNGNTVLEWYIQKPGQSPKLLIYKVSNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPV-----YTFGGGTKLEIK
 43B9/1.4 DVVMTQTPLSLPVLGDDQASISCRSSQ--SIHNSNGNTVLEWYIQKPGQSPKLLIYKVSNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPV-----WTFGGGTKLEIK
 38E10/13.6.4 DIVMSQSPSSLAVSVGKVTMSCKSSQSLIYSSNQKMYLAWYDQKPGQSPKLLIYMASTRRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQIYSP-----YTFGGGTKLEIK

Las CDR 1-3 están destacadas

Ejemplo 3

Cartografiado de los epítomos de los anticuerpos monoclonales específicos para las protofibrillas de α -sinucleína

5 Los cartografiados de los epítomos de los anticuerpos se llevaron a cabo mediante una inmunotransferencia en una membrana PepSpots. Los péptidos sintéticos que abarcan la totalidad de la secuencia (los aminoácidos 1-140) de la α -sinucleína humana fueron sintetizados a medida por JPT Peptide Technologies (una subsidiaria de Sigma Aldrich, Reino Unido) y se inmovilizaron en la membrana PepSpots. Los 33 péptidos de 15-mer sintetizados estaban diseñados con una secuencia de solapamiento de 11 aminoácidos. Los péptidos se unieron covalentemente a una
 10 membrana de celulosa Whatman 50 (Whatman, Inglaterra) a través del C terminal, y habitualmente tienen un N acetilado debido a una mayor estabilidad frente a la degradación. El N-ac sin carga representa mejor la región en el antígeno nativo, después un grupo NH₃⁺ cargado. Los resultados se establecen en la Tabla 3.

Tabla 3:

Anticuerpo	Epítomo	Números de los residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80
49/G	YEMPSEE	125-131
38E2/7	DNEAYEM	121-127
38F11/2_8	LEDMPVDPDNE	113-123
48B11/8	DNEA	121-124
47E7/3_47	DNEAYEM	121-127
37D2/14	LEDMPVDPDNE	113-123
43B9/1_4	YEPEA	136-140
38E10/13_6_4	DNEAYEMPSEE	121-131

15

α -sinucleína humana (SEQ ID NO: 80)

1	10	20	30	40	50
I	I	I	I	I	I
MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAEAAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVH					
51	60	70	80	90	100
I	I	I	I	I	I
GVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQL					
101	110	120	130	140	
I	I	I	I	I	
GKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYPEA					

20 Alternativamente, el cartografiado de los epítomos de los anticuerpos se llevó a cabo mediante una inmunotransferencia en una membrana PepSpots (Sigma Aldrich) como sigue: los péptidos sintéticos que abarcan la secuencia C-terminal de la α -sinucleína humana del aminoácido 100 al 140 fueron sintetizados a medida e inmovilizados en la membrana PepSpots (Sigma Aldrich). Los 30 péptidos de 10-mer sintetizados estaban diseñados con un solapamiento de 9 aminoácidos. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

25

Tabla 4:

Anticuerpo	Epítomo	Números de los residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80
38E2/7	EAYEMP	123-128
47E7/3_47	NEAY	122-125

Consecuentemente, la longitud y la posición precisa del epítomo depende del método usado para la determinación.

30 Ejemplo 4

Caracterización de los anticuerpos monoclonales de alta afinidad de unión a las protofibrillas de la α -sinucleína humanas mediante un ELISA de competición

35 Este ejemplo muestra cuatro anticuerpos (mAb49/G, mAb38E2/7, mAb38F11/2_8 y mAb48B11/8). Estos anticuerpos muestran una elevada afinidad por las protofibrillas de α -sinucleína y una baja reactividad cruzada (unión) a los

monómeros de α -sinucleína, medidos por medio del ensayo ELISA de competición descrito a continuación. En resumen, el anticuerpo anti- α -sinucleína que se va a ensayar se deja interactuar en solución con monómeros o protofibrillas de α -sinucleína, y a continuación se añade la mezcla a una placa de microtitulación prerrecubierta con protofibrillas de α -sinucleína. Si el anticuerpo se une al antígeno en la etapa de incubación previa, menos anticuerpos se unirán al antígeno inmovilizado en la placa de microtitulación. El anticuerpo unido al antígeno inmovilizado es detectado por un anticuerpo secundario conjugado con una enzima fosfatasa alcalina (ALP). El conjugado es incubado con el sustrato de la ALP (pNPP) generando un color amarillo que puede ser detectado con un lector de placas de microtitulación a 405 nm. Consecuente, un bajo valor de la DO refleja una elevada afinidad del anticuerpo por el antígeno en solución.

Específicamente, se recubrió una placa de microtitulación de ELISA de alta unión con 100 μ l/pocillo de 1 μ g/ml de protofibrillas de α -sinucleína, diluida en 1x de PBS, se precintó con un precinto adhesivo y se incubó durante una noche a +4 °C. Después, la solución de recubrimiento se desechó y la capacidad de unión residual de la placa se bloqueó mediante la adición de 200 μ l/pocillo de PBS-Tween 20 (al 0,05 %). La placa precintada se incubó durante 60 min a la temperatura ambiente (T.A.) con agitación a 900 rpm.

Mientras tanto se preparó la solución de péptido en 1x de PBS-Tween 20 (al 0,05 %) mediante la dilución de los monómeros o de las protofibrillas de α -sinucleína hasta una concentración de 140 nM. Se llevaron a cabo series de diluciones a 3x en 10 etapas de los monómeros y de las protofibrillas de α -sinucleína en un volumen de 50 μ l en una placa de microtitulación de baja unión de proteínas de fondo redondo. A esta solución se añadieron 50 μ l del anticuerpo ensayado diluido en PBS-Tween 20 (al 0,05 %) hasta una concentración de 100 ng/ml y se dejó interactuar durante 60 min a la T.A. con agitación a 900 rpm. Posteriormente, estas muestras preincubadas se añadieron a la placa de alta unión cubierta lavada (3x lavados) y se dejó incubar durante 15 min a la T.A. sin agitación. Después, la placa de ELISA se lavó para retirar los anticuerpos no unidos. Los anticuerpos unidos se detectaron con 100 μ l de IgG anti-ratón acoplada a ALP (Mabtech, Suecia 3310-4) en PBS-Tween 20 (al 0,05 %) diluido a 1/1.000 incubado durante 60 min a la T.A. con agitación a 900 rpm.

Finalmente, la placa de ELISA se lavó para retirar los anticuerpos no unidos, y a cada pocillo se añadieron 100 μ l del sustrato de la ALP. La placa se mantuvo en la oscuridad durante una incubación a la T.A. hasta que se desarrolló un color amarillo. Los valores de la absorbancia se midieron de forma continua a una longitud de onda de 405 nm cada 15 minutos hasta los 120 minutos. Las mediciones se usaron para las determinaciones de las CI50 únicamente si había linealidad entre el tiempo y la absorbancia.

Los valores de la CI50 se calcularon como la concentración de los monómeros o de las protofibrillas necesaria para inactivar la mitad de la señal en el ELISA. La concentración de los monómeros o de las protofibrillas de α -sinucleína usados en este método se determinó por medio de una UV-SEC, usando un patrón comercial de α -sinucleína como referencia (cat. S-1001-1, rPeptide, EE.UU., 0,5 mg determinado con BCA). La Fig. 1 muestra la absorbancia a 450 nm para los cuatro anticuerpos específicos para las protofibrillas monoclonales, determinada mediante el ELISA de competición descrito. El ensayo se llevó a cabo con protofibrillas de α -sinucleína estabilizadas con HNE.

Experimentos de ELISA adicionales demostraron que los anticuerpos candidatos muestran la misma afinidad por las protofibrillas de la α -sinucleína humana estabilizadas con HNE o con ONE. Los anticuerpos también se unen a las protofibrillas/agregados de α -sinucleína formados por los mutantes de la α -sinucleína A30P o A53T estabilizados con HNE, según se demostró por medio de un ELISA de competición.

Específicamente, las Figs. 2A y 2B muestran los resultados del anticuerpo mAb49/G específico para las protofibrillas analizado mediante un ELISA de competición. El anticuerpo monoclonal mAb49/G específico para las protofibrillas se une con una elevada afinidad a las protofibrillas de la α -sinucleína humana estabilizadas con HNE o con ONE (Fig. 2A). El anticuerpo monoclonal también se une con una elevada afinidad a las protofibrillas estabilizadas con HNE de las formas humanas mutadas de la α -sinucleína, la A30P y la A53T (Fig. 2B). La agregación de los monómeros de α -sinucleína con ONE genera dos poblaciones distintas de complejos, definidas mediante una cromatografía de exclusión por tamaños. Estos dos picos distintos se eluyeron por separado y se marcaron como FP-ONE_large y FP-ONE_small.

Adicionalmente, las Figs. 3A-3C muestran los resultados de los anticuerpos específicos para las protofibrillas 38E2/7, 38F11/2_8 y 48B11/8 adicionales, analizados mediante un ELISA de competición. Los anticuerpos monoclonales específicos para las protofibrillas se unen con una elevada afinidad a las protofibrillas naturales de la α -sinucleína humana estabilizadas con HNE (PF-HNE) o con ONE (PF-ONE). Los anticuerpos monoclonales también se unen con una elevada afinidad a las protofibrillas estabilizadas con HNE de las formas humanas mutadas de la alfa sinucleína, la A30P (A30P-HNE) y la A53T (A30P-HNE).

Ejemplo 5

Establecimiento de un ELISA en sándwich específico para las protofibrillas de α -sinucleína

5 Para permitir las mediciones de las protofibrillas de α -sinucleína en muestras biológicas, se estableció un ELISA en sándwich con el mAb49/G como anticuerpo de captura y como anticuerpo de detección. Este ensayo mide las protofibrillas de α -sinucleína con un límite de cuantificación LOQ = 9 pM (véase la Fig. 4B). Debido a las incertidumbres relativas al tamaño de las protofibrillas de α -sinucleína usadas en la curva patrón, la concentración en pM se basa en el peso molecular de un monómero de α -sinucleína (14.000 g/mol). Como el peso molecular de una protofibrilla se ha estimado, mediante una cromatografía de exclusión por tamaños, en al menos 1.000.000 g/mol, el límite de detección calculado en molar para las protofibrillas de α -sinucleína podría ser tan bajo como de 0,13 pM.

15 Se usaron las protofibrillas de α -sinucleína estabilizadas con HNE y la α -sinucleína monomérica para validar la especificidad de conformación del ELISA.

Un ELISA formado por dos anticuerpos idénticos requiere al menos un dímero de una proteína para producir una señal. Sin embargo, un gran exceso de la α -sinucleína monomérica, que puede producirse de forma natural en las muestras biológicas, podría interferir en el análisis de las protofibrillas de α -sinucleína al ocupar los sitios de unión del recubrimiento del anticuerpo de captura, inhibiendo así la unión de las protofibrillas. Este problema fue investigado mediante la adición de un exceso creciente de monómero de α -sinucleína a una concentración fija de las protofibrillas de α -sinucleína (500 pM, expresada en forma de unidades monoméricas) y se analizó con el ELISA del mAb49/G. Un exceso molar de 30.000 veces del monómero de α -sinucleína (15 μ M), en comparación con las protofibrillas de α -sinucleína (500 pM), no alteró las mediciones con el ELISA en sándwich del mAb49/G, como se esperaba, dado que el monómero de la α -sinucleína se une poco al anticuerpo de captura.

25 La Fig. 4A muestra una ilustración esquemática de la unión del ELISA para la cuantificación de las protofibrillas de α -sinucleína mediante un ELISA en sándwich. La Fig. 4B muestra la curva patrón generada con las protofibrillas de α -sinucleína estabilizadas con HNE. El rendimiento del ensayo alcanzó un límite de cuantificación LOQ = 9 pM.

Ejemplo 6

Análisis de extractos cerebrales humanos patológicos y de control con un ELISA en sándwich específico para las protofibrillas de α -sinucleína

35 Se llevó a cabo un protocolo de extracción cerebral usando diferentes detergentes, generando tres extractos diferentes: un extracto de TBS (Fig. 5A, barra clara) que comprende especies extracelulares y citosólicas de α -sinucleína; un extracto de Triton (Fig. 5A, barra rayada) que comprende especies de α -sinucleína asociadas a la membrana; y un extracto de SDS (Fig. 5B, barra oscura), que comprende especies de α -sinucleína solubles en SDS. Los extractos cerebrales fueron analizados a partir de un paciente al que se le había diagnosticado una demencia por una α -sinucleinopatía con cuerpos de Lewy (DLB). Se analizó el tejido cerebral de la corteza y de la sustancia nigra. Como control, también se analizó tejido cerebral de la corteza de un sujeto sin ninguna patología por cuerpos de Lewy detectable inmunohistoquímicamente. El ELISA en sándwich se basó en el mAb49/G específico para las protofibrillas de α -sinucleína, como anticuerpo de captura y como anticuerpo de detección. Las Figs. 5A y 5B muestran los resultados del análisis de los extractos cerebrales humanos patológicos y de control con un ELISA en sándwich específico para las protofibrillas de α -sinucleína. Este ensayo permite la cuantificación de las protofibrillas a unos niveles > 9 pM (límite de cuantificación; LOQ = 9 pM).

Ejemplo 7

50 Medición de las protofibrillas de α -sinucleína en un extracto cerebral de un modelo de ratón transgénico para la PD

Se ha sugerido la presencia de protofibrillas de α -sinucleína en modelos celulares y de ratón, aunque hasta ahora no ha habido ningún método para el ensayo directo de las protofibrillas de α -sinucleína en muestras biológicas. El ELISA en sándwich con el mAb49/G proporciona por lo tanto la primera oportunidad para medir los niveles de las protofibrillas de α -sinucleína en muestras biológicas y en modelos de ratón de las α -sinucleinopatías, caracterizadas por la acumulación de α -sinucleína agregada.

60 Se compararon muestras de extractos cerebrales de ratones transgénicos que sobreexpresan el mutante de la α -sinucleína humana A53T con muestras de ratones naturales. Los cerebros se homogenizaron en TBS o en TBS + tween y se centrifugaron antes del análisis, con objeto de recuperar la fracción soluble de la α -sinucleína. Se compararon las mediciones de los niveles de las protofibrillas de α -sinucleína en las fracciones solubles en TBS de los homogenizados de cerebro de ratones no transgénicos con los de ratones transgénicos (modelo Kahle) (Fig. 6).

65 Para asegurar que toda la α -sinucleína medida en este ensayo estaba en un estado soluble, todas las muestras se centrifugaron durante 5 min a 16.000 x g antes del análisis. Los niveles de las protofibrillas de α -sinucleína se

midieron en los cerebros procedentes de ratones transgénicos de 5 meses de edad con una patología de α -sinucleína.

5 La Fig. 6 muestra los resultados del análisis de los extractos cerebrales de los ratones de control (ntg, no transgénico) y del modelo de ratón Khale transgénico con PD (tg) de 5 meses de edad, en la que el eje y representa la absorbancia a una DO450.

Ejemplo 8

10 Análisis inmunohistoquímico (IHC) de tejido cerebral humano

Se usó la corteza y la sustancia nigra de pacientes con PD y con DLB para realizar un análisis inmunohistoquímico (IHC) según se describe (*Oinas et al.* 2010). Como control se usó la corteza y la sustancia nigra de pacientes no enfermos emparejados por edades. El anticuerpo de control positivo para la α -sinucleína era un mAb anti- α -sinucleína de ratón (BD 610787).

15 La unión a las placas de A β fue evaluada como sigue: se trataron dos cortes consecutivos de la corteza de un paciente con AD para mostrar los antígenos, y se incubaron bien con un mAb anti-A β positivo (mAb158, BioArctic) o bien con cada uno de los anticuerpos candidatos. El anticuerpo unido se detectó mediante un anticuerpo específico anti-especie secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP). Después, el conjugado se incubó con el sustrato de la HRP, DAB, generando un precipitado coloreado que fue detectado mediante microscopía óptica. La región en la que se detectaron las placas de A β por medio de una precipitación coloreada en el control positivo fue analizada en el área correspondiente de los cortes tratados con el anticuerpo candidato. La ausencia de una precipitación coloreada fue evaluada visualmente e interpretada como la ausencia de unión a las placas de A β por parte de los anticuerpos candidatos.

20 La Fig. 7A muestra la unión del 38E2/7 a los cuerpos de Lewy y las neuritas en la sustancia nigra de PD y un control positivo de α - α -sinucleína. La Fig. 7B muestra la unión del 38E2/7 a los cuerpos de Lewy y las neuritas en la corteza y la sustancia nigra de DLB y un control positivo de α - α -sinucleína. La Fig. 7C muestra la unión de varios anticuerpos a los cuerpos de Lewy y a las neuritas en la corteza y la sustancia nigra de DLB y un control negativo. La Fig. 7D muestra la unión de varios anticuerpos a los cuerpos de Lewy y a las neuritas en la sustancia nigra de PD y un control negativo. La Fig. 7E no muestra ninguna unión del 38E2/7 en la sustancia nigra no relacionada con la patología, y un control positivo de α - α -sinucleína. La Fig. 7F muestra una comparación de la unión del 38E2/7 y un control positivo de α -A β en la corteza de un paciente con enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 9

Análisis de extractos cerebrales humanos mediante una inmunoprecipitación (IP) y una inmunotransferencia western

40 Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de extractos cerebrales humanos con el anticuerpo monoclonal de unión a las protofibrillas 38E2/7 usando una inmunotransferencia western. Se llevó a cabo un protocolo de extracción cerebral usando diferentes detergentes, generando cuatro extractos diferentes: un extracto de TBS, que comprende especies extracelulares y citosólicas de α -sinucleína; un extracto de Triton, que comprende especies de α -sinucleína asociadas a la membrana, un extracto de SDS, que comprende especies de α -sinucleína solubles en SDS, y un extracto de FA, que comprende α -sinucleína insoluble. Estos extractos se inmunoprecipitaron con microesferas magnéticas, a las que se acopló el anticuerpo 38E2/7 o el anticuerpo de control 15P. El anticuerpo 15P puede unirse a las protofibrillas y a los monómeros de α -sinucleína igualmente bien, y se espera que abata todas las especies presentes. La Fig. 8A muestra el extracto de SDS de la sustancia nigra del paciente con DLB, mientras que la Fig. 8B muestra el extracto de Triton de la sustancia nigra del paciente con DLB. Como se observa en las Figs. 8A y 8B, el mAb 38E2/7 únicamente captura las protofibrillas de α -sinucleína de la sustancia nigra del DLB, tanto en el extracto con Triton como con SDS, mientras que el mAb15 captura los monómeros de α -sinucleína en todos los extractos.

Ejemplo 10

55 Análisis de la inhibición de la oligomerización de la α -sinucleína

Este ejemplo demuestra que el anticuerpo mAb49/G inhibe la oligomerización de los monómeros de α -sinucleína usando un método *in vitro* en el que se transfectan células neuronales con 2 vectores, que contienen ambos una copia de la α -sinucleína (aa 1-140) fusionada con el fragmento condensado N-terminal o C-terminal de la GFP. Únicamente aquellas células en las que la α -sinucleína ha oligomerizado, uniendo ambos fragmentos de la GFP entre sí, generará un color fluorescente verde que podrá ser detectado con un microscopio fluorescente. La presencia de un anticuerpo que pueda inhibir y/o desestabilizar la oligomerización puede ser evaluada mediante la comparación de la fluorescencia en estos cultivos, en comparación con un control al que no se le ha añadido anticuerpo.

Específicamente, se transfectaron células de neuroglioma H4 con unas proporciones equimolares de construcciones de ADN que contienen α -sinucleína (aa 1-140) fusionada con un fragmento N-terminal de la proteína fluorescente verde (GFP) (aa 1-155) o α -sinucleína (aa 1-140) fusionada con un fragmento C-terminal de la GFP (aa 156-238) usando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Simultáneamente se añadieron un anticuerpo monoclonal de control anti- α -sinucleína (mAb5C2, Santa Cruz Bio) y el mAb49/G extracelularmente a las células, con una concentración final de 1 μ g/ml. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C con un 5 % de CO₂. Después de 24 horas, las células se trasladaron a 30 °C durante la reconstitución completa del fluoróforo de la GFP y se incubaron durante un tiempo adicional de 24 horas. La fluorescencia se midió usando un microscopio Axiovert200 equipado con un filtro de epifluorescencia FITC. Todos los datos se calcularon como el % de intensidad de fluorescencia relativa en comparación con las células que sobreexpresan la α -sinucleína no tratadas con el anticuerpo, que se estableció en el 100 %.

Como se observa en la Fig. 9A, el tratamiento con el mAb49/G mostró una reducción significativa (*p < 0,05) (reducción del 42 % en la intensidad de la fluorescencia en comparación con las células sin tratar) en la oligomerización de la α -sinucleína. La Fig. 9B muestra los resultados gráficamente en forma del porcentaje de la intensidad de la fluorescencia en comparación con las células que sobreexpresan la α -sinucleína sin tratar, que se estableció en el 100 %.

Los ejemplos y las realizaciones específicas descritos en el presente documento son únicamente de naturaleza ejemplar y no pretenden ser limitantes de la invención, definida por las reivindicaciones. Las realizaciones y los ejemplos adicionales, y las ventajas de los mismos, serán evidentes para el experto habitual en la materia en vista de esta memoria descriptiva, y están en el ámbito de la invención reivindicada.

REFERENCIAS

Chartier-Harlin, MC., et al. 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 1, 364,1167-1169.

Conway, K., et al., 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 571-576.

Crews, L., et al., 2009. Role of synucleins in Alzheimer's disease. *Neurotox Res.* 16, 306-317.

Desplats, P., et al., 2009. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 4, 106, 13010-13015. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009, 106, 17606. Comment in: *Proc Natl Acad Sci U SA.* 2009, 106, 12571-12572.

El-Agnaf, O. M., et al., 2006. Detection of oligomeric forms of α -synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *Faseb J* 20, 419-425.

George, J. L., et al. 2009. Targeting the progression of Parkinson's disease. *Curr Neuropharmacol.* 7, 9-36.

Hansen, L, et al., 1990. The Lewy body variant of Alzheimer's disease. A clinical and pathologic entity. *Neurology* 40, 1-8.

Klucken, J., et al., 2006. Clinical and biochemical correlates of insoluble α -synuclein in dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 111, 101-108.

Kruger, R., et al., 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18, 106-108.

Leatherbarrow, R. J., et al. 1985. Effector functions of a monoclonal aglycosylated mouse IgG2a: binding and activation of complement component C1 and interaction with human monocyte Fc receptor. *Mol Immunol* 22, 407-415.

Lee, H-J., et al. 2004. Clearance of a-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *Journal of Neuroscience* 24, 1888-1896.

Li, J. Y., et al Li et al. 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-graft disease propagation Nature Med., 14, 501-503.

5 Masliah, E., et al. 2005. Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. Neuron. 46, 857-868.

Oinas, M., et al. 2010. alpha-Synuclein pathology in the spinal cord autonomic nuclei associates with alpha-synuclein pathology in the brain: a population-based Vantaa 85+ study. Acta Neuropathol. 119, 715-722.
 10 Polymeropoulos, M. H., et al., 1997. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. Science 276, 2045-2047.

Qin, Z., et al., 2007. Effect of 4-hydroxy-2-nonenal modification on α -synuclein aggregation. J Biol Chem 282, 5862-5870.

15 Singleton, AB., et al., 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science 302: 841.

Wright, A., 1998. Effect of C2-associated carbohydrate structure on Ig effector function: studies with chimeric mouse-human IgG1 antibodies in glycosylation mutants of Chinese hamster ovary cells. J Immunol 160, 3393-3402.

Xu, Y., et al. 1994. Residue at position 331 in the IgG1 and IgG4 CH2 domains contributes to their differential ability to bind and activate complement. J Biol Chem. 269, 3469-3474.

25 Yoritaka, A., et al., 1996. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. Proc Natl Acad Sci USA 93, 2696-2701.

Zarranz, J., et al., 2004. The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. Ann Neurol. 55, 164-173.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> BioArctic Neuroscience AB Nordstrom, Eva

<120> ANTICUERPOS DE UNIÓN A LAS PROTOFIBRILLAS Y SU USO EN MÉTODOS TERAPÉUTICOS Y DIAGNÓSTICOS PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON, LA DEMENCIA CON CUERPOS DE LEWY Y OTRAS ALFA-SINUCLEINOPATÍAS

40 <130> 4007579-182517

<150> US 61/406.260
 <151> 25-10-2010

45 <150> US 61/308.638
 <151> 26-02-2010

<160> 80

50 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

55 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

60 Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met
 1 5

ES 2 661 925 T3

5
<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met
1 5

10
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15
<400> 3

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
1 5

20
<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25
<400> 4

Gly Asp Ser Phe Thr Ser Gly Tyr Trp
1 5

30
<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Arg Ile Arg Thr Lys Ser Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

35
Val Lys Gly

40
<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Thr Val Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

45
Gly

ES 2 661 925 T3

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 8

Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

20

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25

<400> 9

Val Gly Tyr Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

30

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35

<400> 10

Gln Asn Phe Gly Ser Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

40

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 11

His Ser Asp Tyr Ser Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

50

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 661 925 T3

<400> 12

Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

5 <210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 13

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

15 <210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 14

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

25 <210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

30 <210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

40 <210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

50

ES 2 661 925 T3

5
<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

10
<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 19

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
1 5

20
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 20

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

30
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

40
<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn
1 5 10

45
<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50

ES 2 661 925 T3

<400> 23

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser
1 5 10

5 <210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 24

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

15 <210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Gly Asp Ser Phe Thr Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5 10

20 <210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His

1 5 10

30 <210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

40 <210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 28

ES 2 661 925 T3

Arg Ile Arg Thr Lys Ser Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val

5 <210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

10 Thr Val Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
1 5 10 15

15 <210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

20 Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
1 5 10 15

25 <210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 31

30 Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
1 5 10

35 <210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

40 Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Ala Ala Phe
1 5 10

45 <210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
1 5 10 15

ES 2 661 925 T3

5 <210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 34
Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val
10 <210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 35
15 Val Gly Tyr Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10
20 <210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 36
25 Gln Asn Phe Gly Ser Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
30 <210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 37
35 His Ser Asp Tyr Ser Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
40 <210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 38
45 Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
50 <210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 661 925 T3

<400> 39

Leu Leu Arg Ser Val Gly Gly Phe Ala Asp
1 5 10

5 <210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 40

Asp Tyr Gly Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

15 <210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 41

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

25 <210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

30 <210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

40 1 5 10

45 <210> 44
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

50

ES 2 661 925 T3

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 45

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 46

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 47

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 48

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 49

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

45

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50

<400> 50

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
1 5

5 <210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 51

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

15 <210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 52

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

25 <210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
1 5

35 <210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 54

Gln Gln Phe His Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

45 <210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 55

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

50

ES 2 661 925 T3

<210> 56
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ser Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Ser Gln Ser Met
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Val Gly Tyr Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 57
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 57

ES 2 661 925 T3

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Tyr Ser Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 59
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 59

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Phe Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Phe Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 60
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

5

10

ES 2 661 925 T3

85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

5
 <210> 61
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 61

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

10
 15
 <210> 62
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 62

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 63
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 63

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

10
 15 <210> 64
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 64

ES 2 661 925 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ser Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Val Gly Tyr Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 65
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Val Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

10

ES 2 661 925 T3

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Asn Phe Gly Ser Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 66

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ser Asp Tyr Ser Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

10

<210> 67
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 67

ES 2 661 925 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Phe Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Phe Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 71
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 71

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

10

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 74
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 74

5

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10

ES 2 661 925 T3

<210> 75
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 75

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

10

<210> 76
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 76

ES 2 661 925 T3

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Asn
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 77
<211> 106
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 77

10

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe His Ser Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

ES 2 661 925 T3

<210> 78
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 78

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

10

<210> 79
<211> 113
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 79

ES 2 661 925 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 80
<211> 140
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> BioArctic Neuroscience AB Nordstrom, Eva
- <120> ANTICUERPOS DE UNIÓN A LAS PROTOFIBRILLAS Y SU USO EN MÉTODOS TERAPÉUTICOS Y DIAGNÓSTICOS PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON, LA DEMENCIA CON CUERPOS DE LEWY Y OTRAS ALFA-SINUCLINOPATÍAS
- 10 <130> 4007579-182517
- <150> US 61/406.260
- <151> 25-10-2010
- 15 <150> US 61/308.638
- <151> 26-02-2010
- <160> 80
- 20 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 661 925 T3

5 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met
1 5

10 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met
1 5

20 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 3

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met
1 5

30 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Gly Asp Ser Phe Thr Ser Gly Tyr Trp
1 5

35 <210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 5

Arg Ile Arg Thr Lys Ser Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

45 <210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50

ES 2 661 925 T3

<400> 6

Thr Val Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Arg
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 7

Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

15 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 8

Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

25 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Val Gly Tyr Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

30

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35

<400> 10

Gln Asn Phe Gly Ser Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

40

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45

ES 2 661 925 T3

<400> 11

His Ser Asp Tyr Ser Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

5 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 12

Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

15 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 13

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

25 <210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

35 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1 5 10

40 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 16

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

50

ES 2 661 925 T3

5
<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

10
<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15
<400> 18

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

20
<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25
<400> 19

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
1 5

30
<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

35
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40
<400> 21

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

45
<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50
<400> 22

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn
1 5 10

55

ES 2 661 925 T3

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 23

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser
1 5 10

 10
 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15
 <400> 24

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

 20
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 25
 <400> 25

Gly Asp Ser Phe Thr Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5 10

 30
 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 35
 <400> 26

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His
1 5 10

 40
 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 45
 <400> 27

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

 50
 <210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 661 925 T3

<400> 28

Arg Ile Arg Thr Lys Ser Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val

5 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 29

Thr Val Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 1 5 10 15

15 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 30

Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 1 5 10 15

25 <210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
 1 5 10

35 <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Ala Ala Phe
 1 5 10

40 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 33

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 1 5 10 15

50

ES 2 661 925 T3

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 34

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

Val
 10
 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 35

Val Gly Tyr Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

 <210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <400> 36
 25
Gln Asn Phe Gly Ser Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 37

His Ser Asp Tyr Ser Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
 35

 <210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 38

Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
 45

 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50

ES 2 661 925 T3

<400> 39

Leu Leu Arg Ser Val Gly Gly Phe Ala Asp
1 5 10

5 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 40

Asp Tyr Gly Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

15 <210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 41

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

25 <210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

35 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 43

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

40 <210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 44

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

50 <210> 45
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 661 925 T3

<400> 45

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

5 <210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 46

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

15 <210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 47

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

25 <210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

30 **Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser**
1 5

35 <210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

40 <210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 50

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
1 5

50

ES 2 661 925 T3

5 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 51

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

10 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 52

15 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
 1 5

20 <210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 53

25 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
 1 5

30 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 54

35 Gln Gln Phe His Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

40 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 55

45 Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

50 <210> 56
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 56

ES 2 661 925 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ser Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Val Gly Tyr Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 57
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

5

ES 2 661 925 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Val Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Asn Phe Gly Ser Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 58
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 58

ES 2 661 925 T3

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Ser Asp Tyr Ser Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 59
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

5

ES 2 661 925 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Phe Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Phe Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 60
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

5

ES 2 661 925 T3

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 61
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 61

5

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

10

ES 2 661 925 T3

<210> 62
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 62

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10 <210> 63
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 63

ES 2 661 925 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 64
<211> 121
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ser Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95

10

ES 2 661 925 T3

Tyr Cys Val Arg Val Gly Tyr Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 65
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 65

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Val Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Asn Phe Gly Ser Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 66
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 66

ES 2 661 925 T3

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Ser Asp Tyr Ser Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

5

<210> 67
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 67

ES 2 661 925 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Phe Thr Ser Gly
 20 25 30

 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

 Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

 Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80

 Gln Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Phe Tyr Cys Ala
 85 90 95

 Arg Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

5

<210> 68
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 68

ES 2 661 925 T3

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Ser Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Leu Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Ala Ala Phe Met
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80

Lys Met Ser Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Leu Leu Arg Ser Val Gly Gly Phe Ala Asp Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 69
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 69

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Ala Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

10

ES 2 661 925 T3

Ala Arg His Ser Asp Tyr Ser Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Arg
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

5
 <210> 70
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 70

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Phe Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Phe Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

10
 15
 <210> 71
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 71

ES 2 661 925 T3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 72
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 72

ES 2 661 925 T3

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 73
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 73

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

10

ES 2 661 925 T3

<210> 74
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 74

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10 <210> 75
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 75

ES 2 661 925 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 76
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 76

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Asn
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

10

ES 2 661 925 T3

100

105

110

5
 <210> 77
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 77

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe His Ser Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10
 15
 <210> 78
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 78

ES 2 661 925 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 79
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 79

5

ES 2 661 925 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

- <210> 80
- <211> 140
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 80

5

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

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

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

10

ES 2 661 925 T3

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a las protofibrillas de la α -sinucleína humana que tiene un peso molecular en un intervalo de entre 1.000 y 5.000 kDa, en el que la unión del anticuerpo o del fragmento a cada uno de los monómeros de α -sinucleína y de los monómeros de β -sinucleína es al menos 100 veces menor que la unión del anticuerpo o del fragmento a las protofibrillas de la α -sinucleína humana, teniendo el anticuerpo o el fragmento tres secuencias pesadas variables (VH) de CDR (VH-CDR-1, VH-CDR-2 y VH-CDR-3) y tres secuencias ligeras variables (VL) de CDR (VL-CDR-1, VL-CDR-2 y VL-CDR-3) y en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo tiene una combinación de secuencias de CDR seleccionada entre las siguientes combinaciones:
- (a) VH-CDR-1: SEQ ID NO: 22, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 28, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 35, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 41, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 50,
 (b) VH-CDR-1: SEQ ID NO: 23, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 29, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 36, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 42, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 50,
 (c) VH-CDR-1: SEQ ID NO: 24, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 30, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 37, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 43, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 48 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 51,
 (d) VH-CDR-1: SEQ ID NO: 25, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 31, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 38, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 44, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 52,
 (e) VH-CDR-1: SEQ ID NO: 26, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 32, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 39, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 45, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 53,
 (f) VH-CDR-1: SEQ ID NO: 23, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 33, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 37, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 43, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 48 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 54, and
 (g) VH-CDR-1: SEQ ID NO: 27, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 34, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 40, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 46, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 49 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 55.
2. El anticuerpo o un fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que las seis secuencias de CDR del anticuerpo o del fragmento del mismo tienen las secuencias de VH-CDR-1: SEQ ID NO: 22, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 28, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 35, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 41, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 50.
3. El anticuerpo o un fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que las seis secuencias de CDR del anticuerpo o del fragmento del mismo tienen las secuencias de VH-CDR-1: SEQ ID NO: 23, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 29, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 36, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 42, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 50.
4. El anticuerpo o un fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que las seis secuencias de CDR del anticuerpo o del fragmento del mismo tienen las secuencias de VH-CDR-1: SEQ ID NO: 24, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 30, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 37, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 43, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 48 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 51.
5. El anticuerpo o un fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que las seis secuencias de CDR del anticuerpo o del fragmento del mismo tienen las secuencias de VH-CDR-1: SEQ ID NO: 25, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 31, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 38, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 44, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 52.
6. El anticuerpo o un fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que las seis secuencias de CDR del anticuerpo o del fragmento del mismo tienen las secuencias de VH-CDR-1: SEQ ID NO: 26, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 32, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 39, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 45, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 47 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 53.
7. El anticuerpo o un fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que las seis secuencias de CDR del anticuerpo o del fragmento del mismo tienen las secuencias de VH-CDR-1: SEQ ID NO: 23, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 33, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 37, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 43, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 48 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 54.
8. El anticuerpo o un fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que las seis secuencias de CDR del anticuerpo o del fragmento del mismo tienen las secuencias de VH-CDR-1: SEQ ID NO: 27, VH-CDR-2: SEQ ID NO: 34, VH-CDR-3: SEQ ID NO: 40, VL-CDR-1: SEQ ID NO: 46, VL-CDR-2: SEQ ID NO: 49 y VL-CDR-3: SEQ ID NO: 55.
9. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. Un método *in vitro* de detección de las protofibrillas de α -sinucleína, que comprende las etapas de
- añadir el anticuerpo o el fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición según la reivindicación 9 a una muestra biológica que comprende o que se sospecha que comprende protofibrillas de α -sinucleína, y
 - detectar la presencia de un complejo formado entre las protofibrillas de α -sinucleína y dicho anticuerpo o fragmento.
11. Un anticuerpo o un fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención, el retraso en la aparición o el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo con patología de α -sinucleína en un individuo, en el que el trastorno con patología de α -sinucleína está caracterizado por la deposición de cuerpos de Lewy y de neuritas de Lewy.
12. El anticuerpo, el fragmento o la composición para su uso según la reivindicación 11, en el que el trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Parkinson (PD), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer o la atrofia sistémica múltiple.
13. Uso de un anticuerpo o de un fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o de una composición según la reivindicación 9 para el diagnóstico o la monitorización *in vitro* del desarrollo de un trastorno neurodegenerativo con patología de α -sinucleína, en el que el trastorno con patología de α -sinucleína está caracterizado por la deposición de cuerpos de Lewy y de neuritas de Lewy.
14. El uso según la reivindicación 13 para el diagnóstico o la monitorización *in vitro* del desarrollo de la enfermedad de Parkinson (PD), de la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), de la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer o de la atrofia sistémica múltiple.
15. El anticuerpo o el fragmento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición según la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de un trastorno por una α -sinucleinopatía en un sujeto mediante su unión a las protofibrillas de α -sinucleína en el cerebro del sujeto.

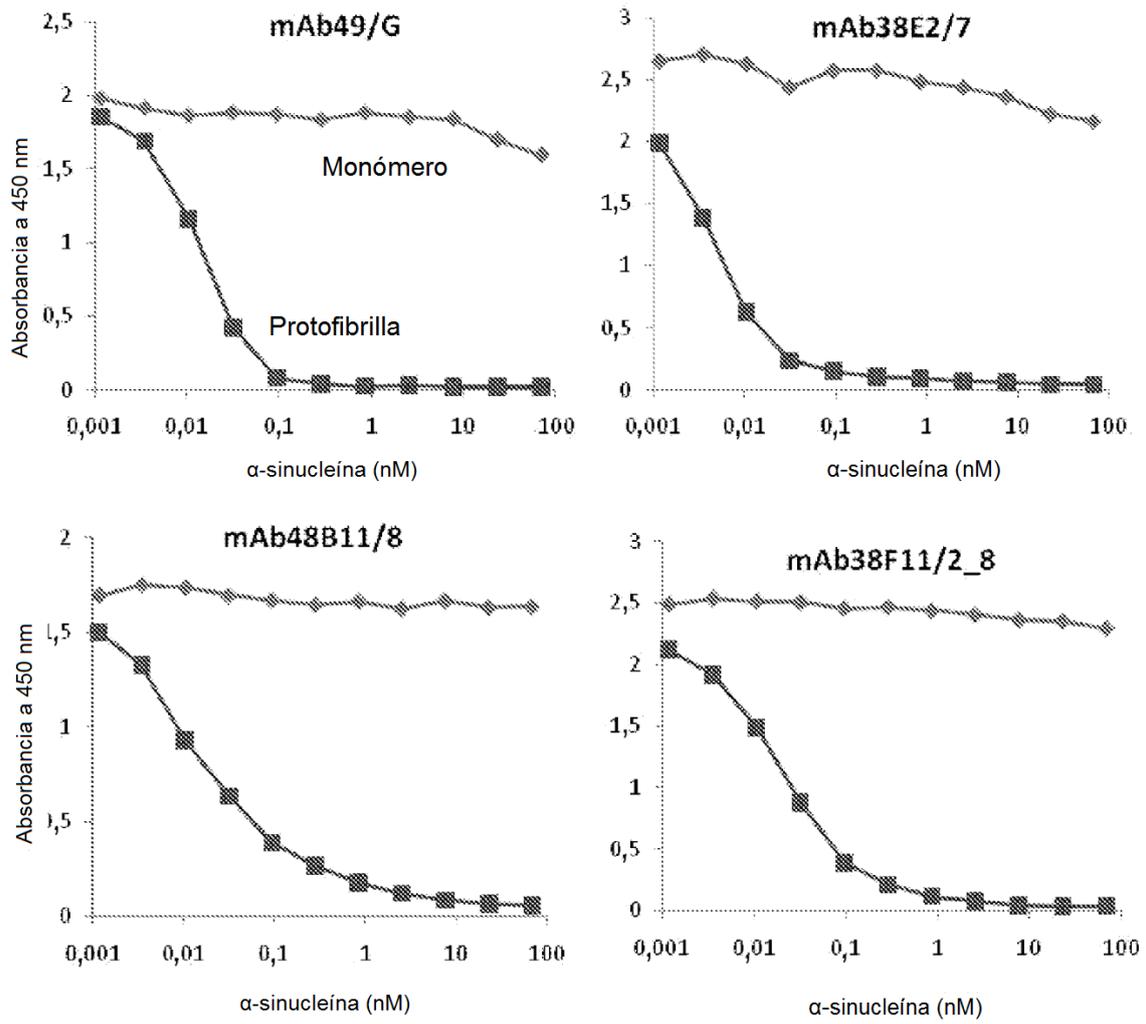


FIG. 1

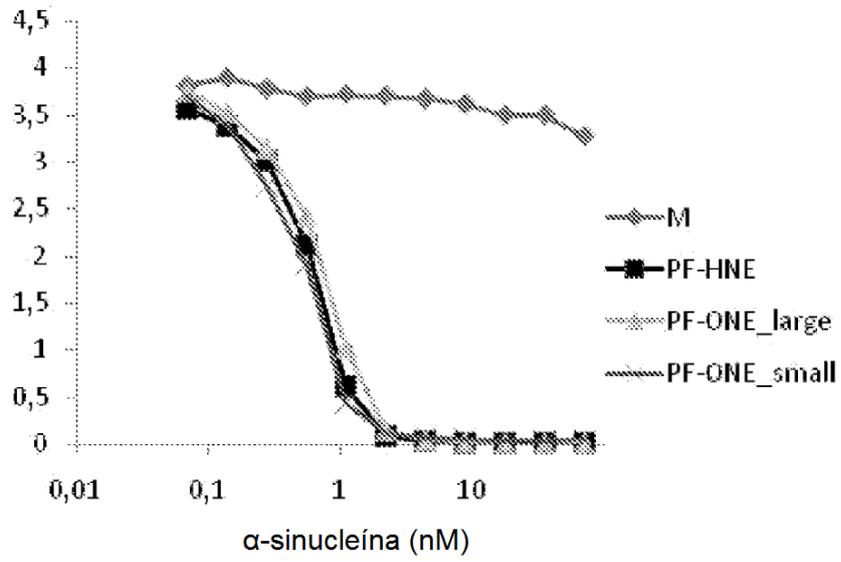


FIG. 2A

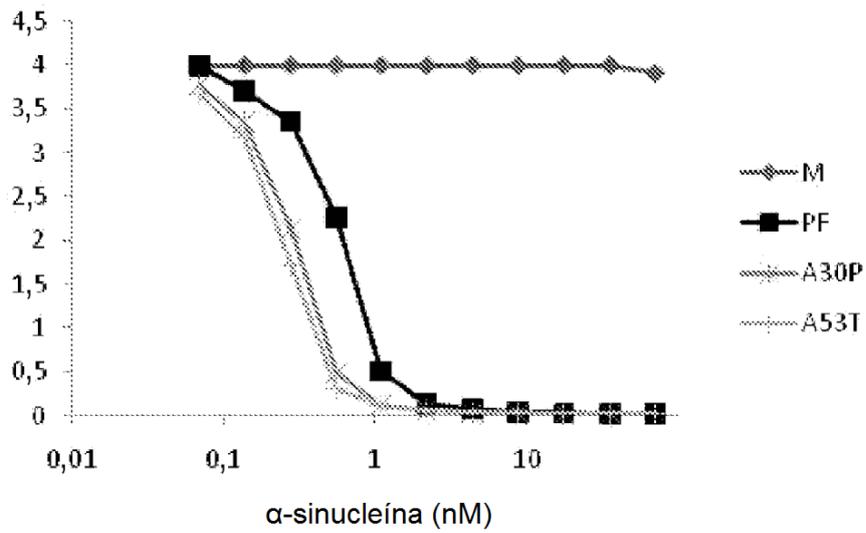


FIG. 2B

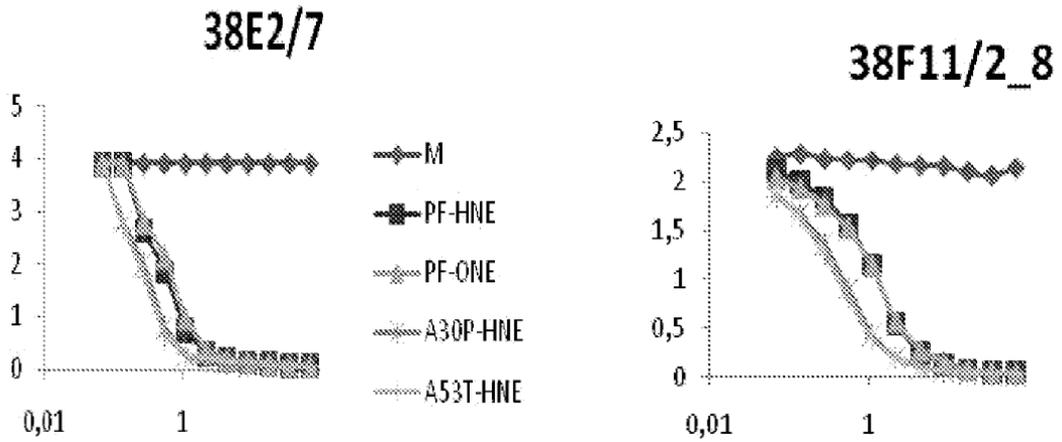


FIG. 3A

FIG. 3B

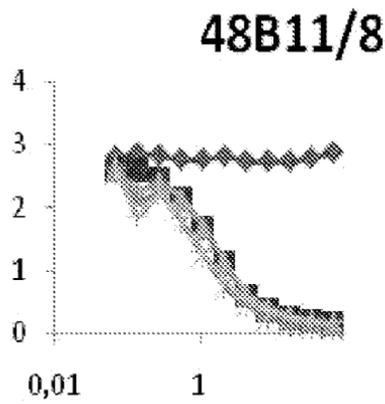


FIG. 3C

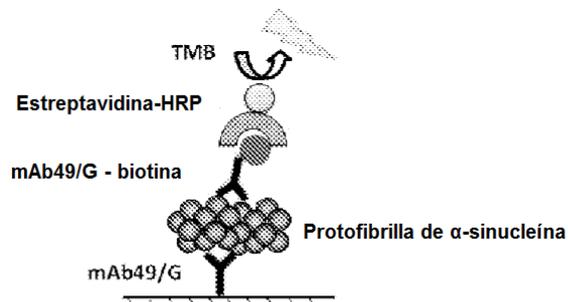


FIG. 4A

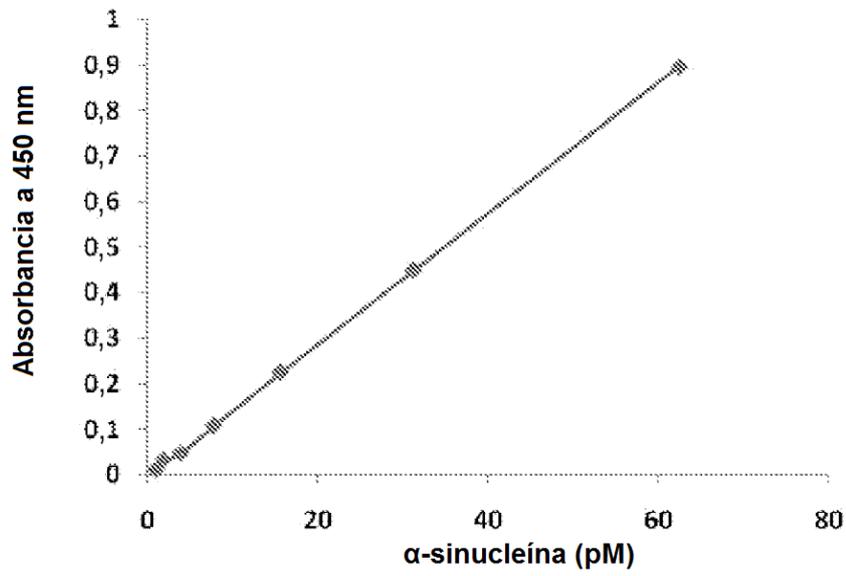


FIG. 4B

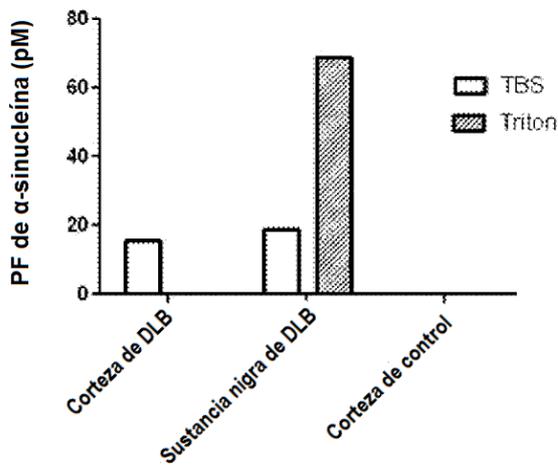


FIG. 5A

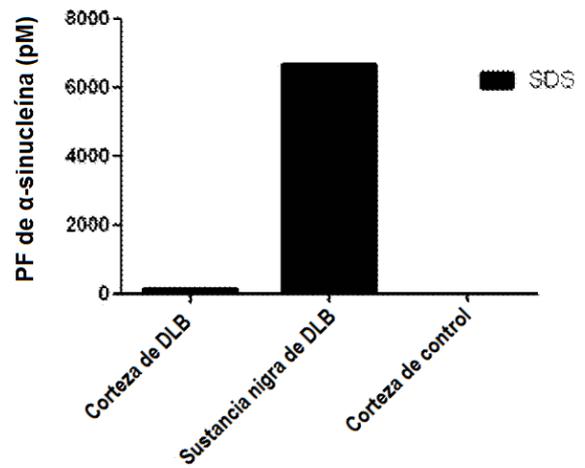


FIG. 5B

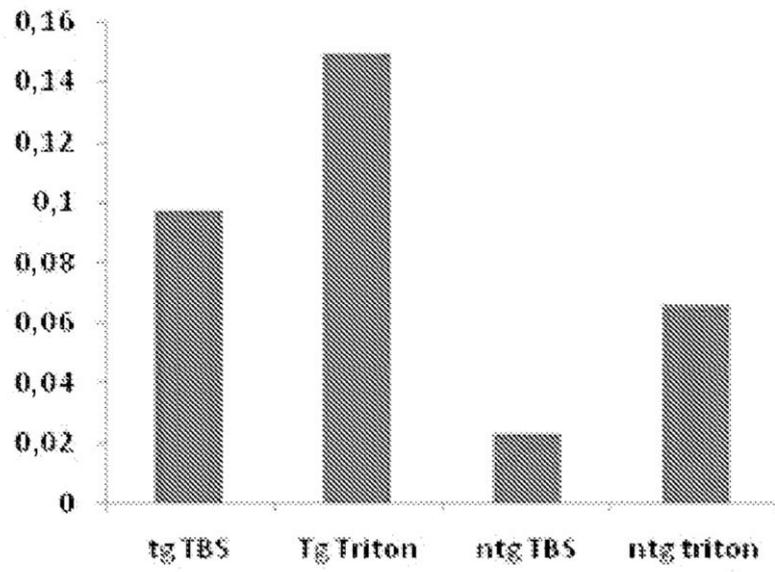


FIG. 6

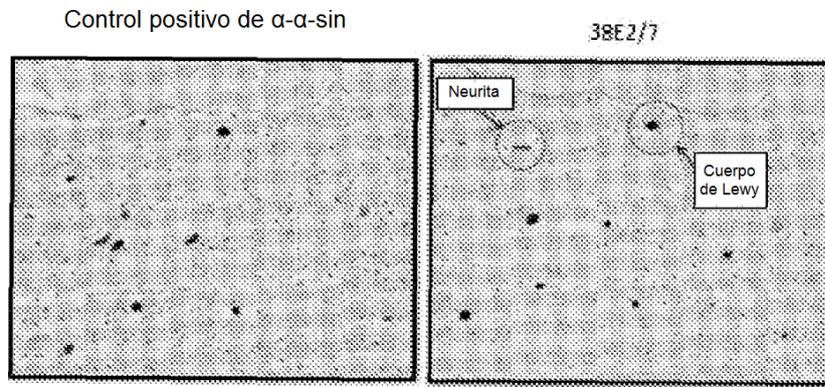


FIG. 7A

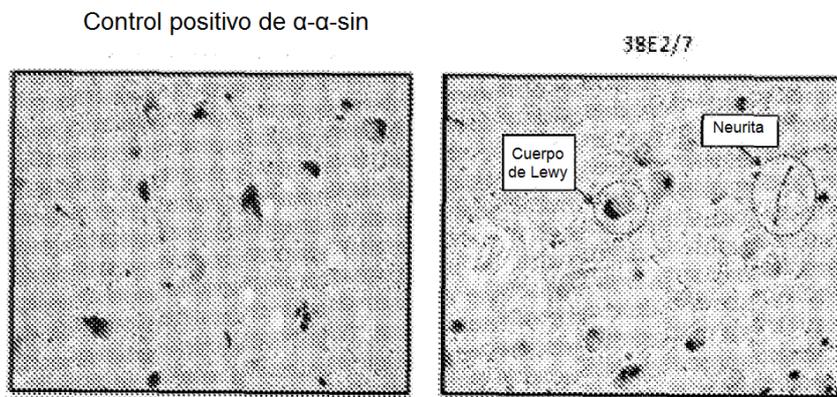


FIG. 7B

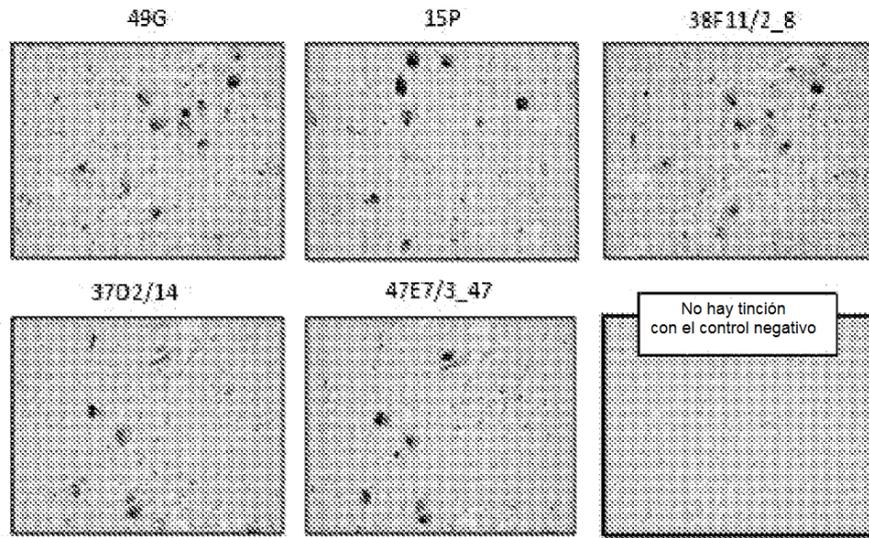


FIG. 7C

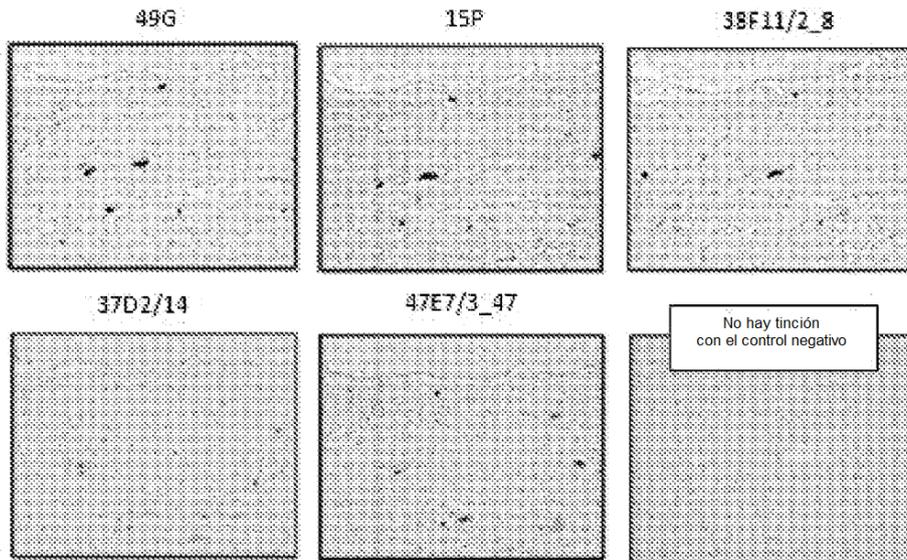


FIG. 7D

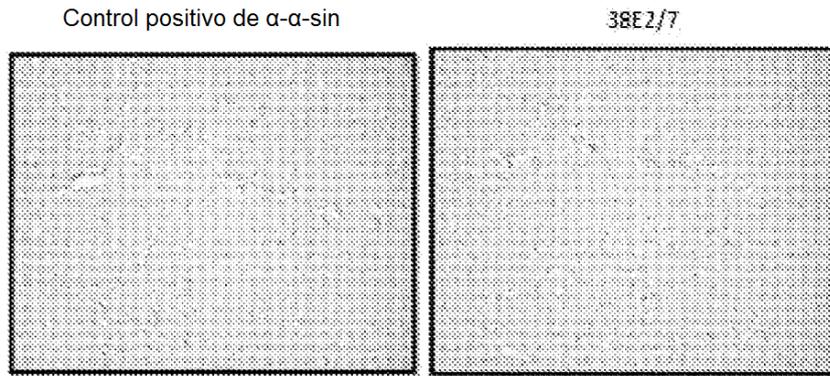


FIG. 7E

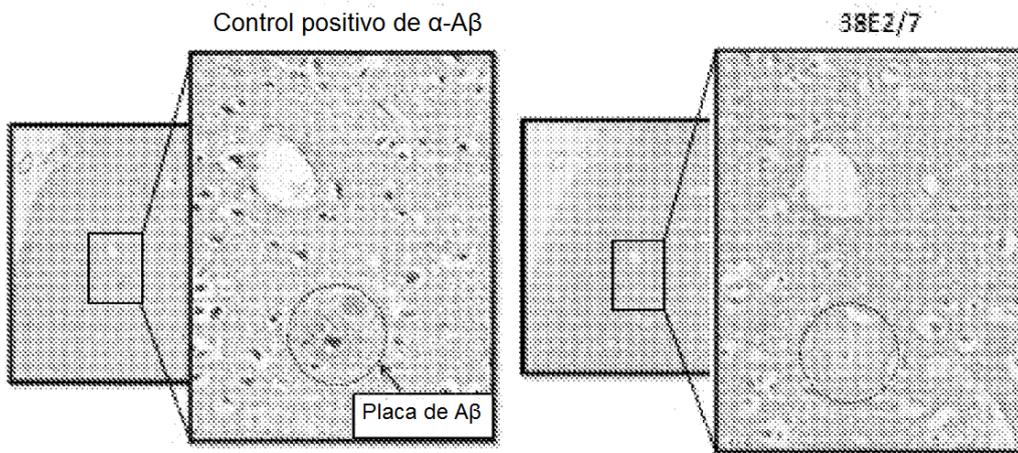


FIG. 7F

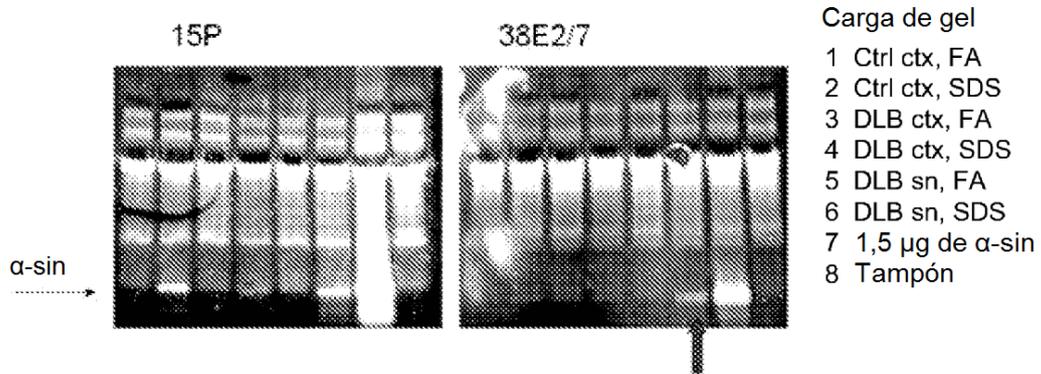


FIG. 8A

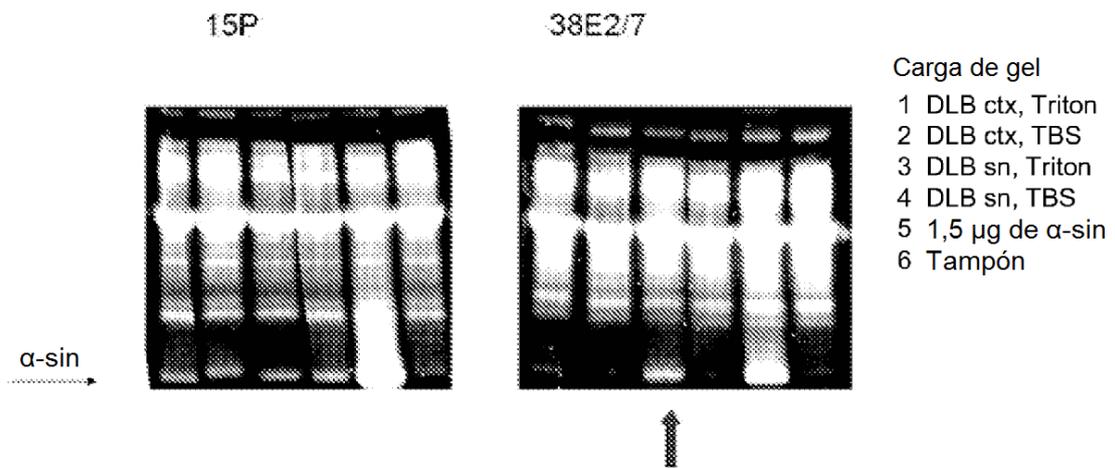


FIG. 8B

FIG. 9A

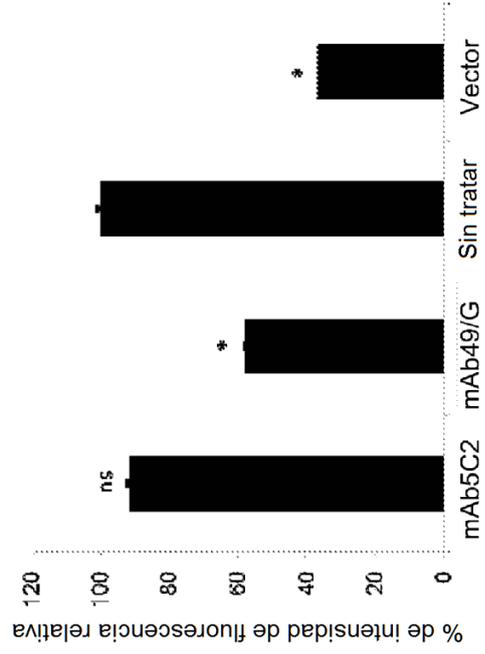
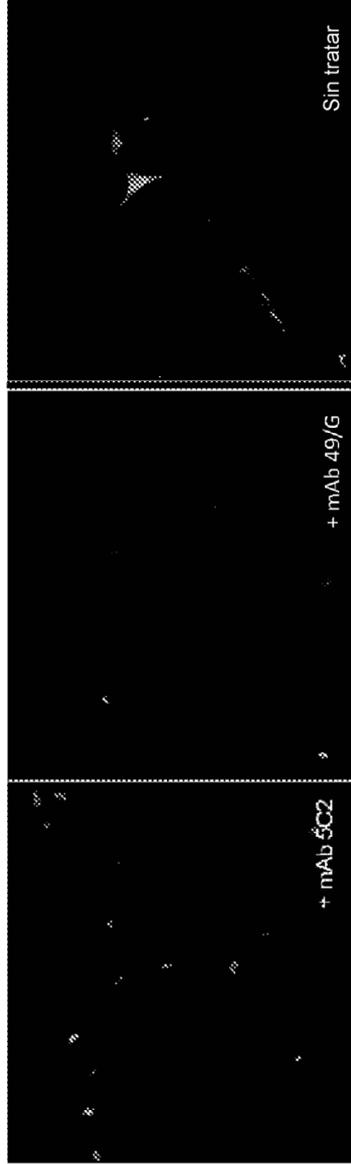


FIG. 9B