

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 801**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2012 PCT/US2012/043701**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12177972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2012 E 12802721 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2723379**

54 Título: **Moléculas de unión anti-alfa sinucleína**

30 Prioridad:

23.06.2011 US 201161500580 P

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

12.02.2019

73 Titular/es:

**BIOGEN INTERNATIONAL NEUROSCIENCE
GMBH (50.0%)
Neuhofstrasse 30
6340 Baar, CH y
UNIVERSITY OF ZÜRICH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WEIHOFEN, ANDREAS;
GRIMM, JAN;
HOCK, CHRISTOPH;
NITSCH, ROGER;
SU, LIHE y
WEINREB, PAUL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 699 801 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

Moléculas de unión anti-alfa sinucleína

5 Antecedentes de la invención

En términos generales la presente invención se refiere a moléculas de unión específicas de α -sinucleína novedosas, en particular a anticuerpos humanos así como fragmentos, derivados y variantes correspondientes que reconocen α -sinucleína y formas agregadas de α -sinucleína, respectivamente. Asimismo, la presente invención se refiere a
10 composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden dichas moléculas de unión, anticuerpos y miméticos correspondientes valiosos tanto como herramientas de diagnóstico para identificar especies tóxicas de α -sinucleína en plasma y LCR y también en estrategias de vacunación pasiva para tratar trastornos relacionados con agregados de α -sinucleína tal como enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras enfermedades sinucleinopáticas.

15 El mal plegamiento de proteínas y la agregación de proteínas son aspectos patológicos de numerosas enfermedades neurodegenerativas. Los agregados de α -sinucleína son componentes muy importantes de los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy asociados con la enfermedad de Parkinson (EP). Al ser una proteína no plegada de forma nativa, la α -sinucleína puede adoptar distintas morfologías agregadas, incluyendo oligómeros,
20 protofibrillas y fibrillas. Los pequeños agregados oligoméricos han demostrado ser particularmente tóxicos.

Los autoanticuerpos de origen natural contra α -sinucleína se han detectado en personas sanas y los niveles alterados en pacientes se asociaron a trastornos neurodegenerativos específicos; véase a modo de revisión el documento Neff y col., *Autoimmun. Rev.* 7 (2008), 501-507. Por ende, los anticuerpos de origen natural en los
25 pacientes que padecen enfermedad de Parkinson, ya sea de forma espontánea o tras la vacunación, en particular en pacientes sanos puede desempeñar una función protectora respecto de la agregación de α -sinucleína; véase, p. ej., Woulfe y col., *Neurology* 58 (2002), 1435-1436y Papachroni y col., *J. Neurochem.* 101 (2007), 749-756. Hasta la fecha, la importancia terapéutica de los autoanticuerpos ha sido difícil de evaluar. Esto se debe, principalmente, a la falta de enfoques experimentales sencillos para su aislamiento y la posterior caracterización *in vitro*.

30 Recientemente, se ha informado de especies oligoméricas de α -sinucleína extracelulares en plasma y LCR (El-Agnaf y col., *FASEB J.* 20 (2006), 419-425) y los estudios de inmunización en modelos de ratón de EP muestran que los anticuerpos monoclonales de ratón extracelulares contra α -sinucleína pueden reducir la acumulación de agregados de α -sinucleína intracelular (Masliah y col., *Neuron*, 46 (2005), 857-868) apoyando la idea de que los anticuerpos
35 que neutralizan los agregados neurotóxicos sin interferir en las funciones beneficiosas de la α -sinucleína monomérica pueden emplearse como una terapéutica útil. No obstante, la respuesta de los anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA) en vista de su origen no humano dificulta la utilidad terapéutica de los anticuerpos de base murina en humanos.

40 Emadi y col. en el documento *J. Mol. Biol.* 368 (2007), 1132-1144, describen el aislamiento de fragmentos monocatenarios de anticuerpos (scFvs) de un banco de anticuerpos de expresión en fagos basado en secuencias humanas contra α -sinucleína, que se unen únicamente a una forma oligomérica de α -sinucleína e inhiben tanto la agregación como la toxicidad de α -sinucleína *in vitro*. Sin embargo, si bien la generación de los scFvs a partir de la expresión en fagos es bastante simple, esta técnica presenta serias desventajas, puesto que los anticuerpos
45 producidos de esta manera presentan el riesgo de que se produzca reactividad cruzada no deseada contra autoantígenos y no poseen las características de los anticuerpos humanos naturales optimizados evolutivamente, producidos por el sistema inmunitario humano. Asimismo, dichos anticuerpos pueden no ser lo suficientemente específicos debido a la reactividad cruzada con otras proteínas y/o con la proteína diana en contexto con el entorno fisiológico normal y la función. En el caso de la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, los anticuerpos que también
50 reaccionan de manera cruzada con derivados fisiológicos de α -sinucleína tienen el potencial de producir efectos secundarios relacionados con las funciones normales de las estructuras fisiológicas diana. En este sentido, se induciría claramente una enfermedad autoinmune no deseada, un riesgo difícilmente calculable también en el diseño conceptual de experimentos de inmunización activa que utilizan estructuras de proteínas que, en forma de variantes, también se presentan fisiológicamente.

55 Más recientemente, Seitz y col. (81. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie Hamburg 10 - 13/09/2008), informaron sobre el aislamiento del autoanticuerpo policlonal anti- α -sinucleína de distintas disoluciones de inmunoglobulina y muestras de donantes de sangre individuales mediante cromatografía de afinidad. No obstante, además del hecho de que este enfoque proporciona simples cantidades limitadas del
60 anticuerpo deseado, los anticuerpos policlonales son solo de uso limitado para la aplicación terapéutica, por ejemplo,

debido a su heterogeneidad y al riesgo de ser contaminados con otras moléculas asociadas a α -sinucleína que presentan efectos secundarios no deseados. Asimismo, el valor diagnóstico de los anticuerpos policlonales es reducido puesto que la variabilidad de la composición de los anticuerpos influenciará la especificidad y reactividad generales. Esto es aún más cierto para anticuerpos contra proteínas sujetas a agregación y deposición debido a mal plegamiento.

En la solicitud internacional publicada recientemente WO 2010/069603 A1 se describen anticuerpos anti- α -sinucleína humana que o bien preferentemente unen anti- α -sinucleína humana en forma agregada y a un epítipo comprendido en el fragmento N-terminal (aal-60) o un monómero anti- α -sinucleína a un epítipo comprendido en el fragmento C-terminal (aa96-140).

Sin embargo, todavía existe la necesidad de superar las limitaciones antes mencionadas y de proporcionar un anticuerpo humano terapéutico y de diagnóstico contra la α -sinucleína.

15 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones tal y como se caracterizan en las reivindicaciones. Una realización proporciona una molécula de unión aislada que se une de manera específica a un epítipo dentro de los aminoácidos 113 a 123 o dentro de los aminoácidos 117 a 123 de α -sinucleína (SEQ ID NO:1). En ciertos aspectos, la molécula de unión se une de manera específica al mismo epítipo de α -sinucleína humana que el anticuerpo monoclonal de referencia NI-202.21D11, o de manera competitiva inhibe la unión del anticuerpo monoclonal de referencia NI-202.21D11 a α -sinucleína humana. Una molécula de unión de la invención es un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Una molécula de unión específica de la invención es el anticuerpo monoclonal humano NI-202.21D11, o un fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo.

La invención también proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a α -sinucleína humana, y que comprende una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera (VL) de inmunoglobulina, donde la VH comprende una secuencia polipeptídica al menos 90 % idéntica, o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:15 o a la SEQ ID NO:20. La invención también proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a α -sinucleína humana, y que comprende una VH y una VL, donde la VL comprende una secuencia polipeptídica al menos 90 % idéntica, o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:22 o a la SEQ ID NO:26. De manera similar, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera específica a α -sinucleína humana, y que comprende una VH y una VL donde la VH y la VL comprenden, respectivamente, secuencias polipeptídicas al menos 90 %, o 100 % idénticas a los polipéptidos de referencia SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22, o SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:26.

En ciertas realizaciones de la invención el anticuerpo aislado o fragmento correspondiente se une preferentemente a un epítipo conformacional no lineal de α -sinucleína humana. En otras realizaciones el anticuerpo aislado o fragmento correspondiente se une preferentemente a α -sinucleína humana en la forma oligomérica o agregada. En realizaciones adicionales el anticuerpo aislado o fragmento correspondiente no se une específicamente a β -sinucleína humana o γ -sinucleína humana, y/o no se une específicamente a α -sinucleína murina.

La invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo o fragmento correspondiente como se describe más arriba, y un vehículo. La composición puede ser una composición terapéutica o de diagnóstico.

La invención también proporciona uno o más polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido o molécula de unión como se describe en el presente documento, y vectores y células huésped para expresar dichas moléculas de unión.

Un objeto específico de la presente invención es proporcionar procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad sinucleinopática tal como, sin carácter restrictivo, enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), y atrofia multisistémica (AM). Los procedimientos comprenden administrar una concentración efectiva de molécula de unión anti- α -sinucleína humana, p. ej., un anticuerpo o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno al sujeto donde el anticuerpo elige como diana a la α -sinucleína.

También constituye un objeto de la invención proporcionar un procedimiento para diagnosticar una enfermedad sinucleinopática en un sujeto, que comprende evaluar el nivel, ubicación, conformación o una combinación de estos

de α -sinucleína en un sujeto que se ha de diagnosticar con un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención y comparar el nivel, ubicación, conformación o combinación de estos de α -sinucleína en el sujeto respecto de uno o más estándares de referencia derivados de una o más muestras de control, donde una diferencia o similitud entre el nivel, ubicación, conformación o combinación de estos de α -sinucleína en el sujeto y el estándar de referencia indica si el sujeto padece una enfermedad sinucleinopática.

Los procedimientos de diagnóstico de la invención pueden ser mediante ensayo *in vitro* de muestras de pacientes, o mediante técnicas de diagnóstico por imagen *in vivo*.

10 Las realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción y de los Ejemplos que se incluyen a continuación.

Breve descripción de los dibujos

15 **Figura 1** Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de la región variable, es decir, cadenas pesada y ligera kappa del anticuerpo humano NI-202.21D11. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y marco (FR) se indican con las CDR subrayadas. Debido a la estrategia de clonación, la secuencia de aminoácidos en el extremo N-terminal de la cadena pesada y la cadena ligera puede contener potencialmente alteraciones inducidas por cebadores en FR1 que, sin embargo, no afectan sustancialmente a la actividad biológica del anticuerpo. Para poder proporcionar un anticuerpo humano de consenso, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del clon original se alinearon y se ajustaron de acuerdo con las secuencias de región variable de línea germinal humana pertinentes en la base de datos; véase, p. ej., Vbase (vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk) alojada por el MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido). Estos aminoácidos, que se considera se desvían potencialmente de la secuencia de línea germinal de consenso y que, por lo tanto, podrían deberse al cebador de PCR, se indican en negrita.

20 **Figura 2** El NI-202.21D11 recombinante humano se une de manera selectiva a α -sinucleína humana por encima de β -, γ -sinucleína y α -sinucleína murina en un ensayo ELISA directo. Las α -, β -, γ -sinucleínas humanas recombinantes y las α -sinucleínas marcadas con His humana y murina recombinantes se revistieron en placas de ELISA en concentraciones iguales (2 μ g/ml). A continuación, las placas se sondearon con NI-202.21D11 humano recombinante, NI-202.12F4 humano y con un anticuerpo de pan-sinucleína. (A) NI-202.21D11 recombinante se une a α -sinucleína de forma selectiva mientras que el anticuerpo de pan-sinucleína se une a las tres proteínas de sinucleína confirmando el mismo revestimiento de las proteínas recombinantes. (B) NI-202.21D11 recombinante es selectivo para α -sinucleína humana vs murina. Por otra parte, NI-202.12F4 se une tanto a α -sinucleína humana como murina en un ensayo ELISA directo.

25 **Figura 3** El NI-202.21D11 recombinante se une preferentemente a α -sinucleína revestida de alta densidad. La α -sinucleína humana recombinante se revistió en placas de ELISA en las concentraciones indicadas y se sondeó con diversas concentraciones de NI-202.21D11 mediante ensayo ELISA directo (\square 20 μ g/ml; \blacktriangle 5 μ g/ml; \blacklozenge 1 μ g/ml; \blacksquare 0,25 μ g/ml; \blacktriangledown 0,1 μ g/ml). La concentración efectiva media máxima (CE50) que indicaba la potencia del anticuerpo se determinó para cada concentración de revestimiento.

30 **Figura 4** El análisis de unión inmunohistoquímico de NI-202.21D11 mostró tinción prominente de patología de α -sinucleína con inclusiones de tipo cuerpo de Lewy y neurita de Lewy en secciones de parafina de (A) ratones transgénicos con sobreexpresión de α -sinucleína humana A53T y (C) de tejido cerebral humano de un paciente con demencia con cuerpos de Lewy. (B) No se observó tinción en tejido de ratón de tipo salvaje (abajo a la derecha) en un anticuerpo secundario únicamente de control. HC=Hipocampo, CTX=Corteza cerebral, TE=Tronco del encéfalo.

35 **Figura 5** El mapeo de epítomos mostró un epítipo de unión en extremo C-terminal dentro de α -sinucleína humana (aa 117-123) para NI-202.21D11. (A) NI-202.21D11 recombinante unido al dominio C-terminal de α -sinucleína humana en un ensayo ELISA directo. Los truncamientos de α -sinucleína se revistieron en placas de ELISA en concentraciones iguales (2 μ g/ml). NI-202.21D11 unido únicamente a α -sinucleína truncada aa 61-140 y 95-140 pero no a los truncamientos aa 1-60, 1-95. (B) El análisis Pepscan mostró la unión de NI-202.21D11 a péptidos solapantes B08 (aa 109-123), B09 (aa 113-127) y B10 (aa 117-131) de α -sinucleína humana sugiriendo que la secuencia mínima requerida para la unión de NI-202.21D11 es PVDPDNE (aa 117-123) dentro de α -sinucleína humana. (C) NI-202.21D11 recombinante mostró unión reducida a α -sinucleína humana D121G/N122S en un ensayo ELISA directo. Las proteínas α -sinucleína de tipo salvaje (wt) y mutada recombinantes se revistieron con concentraciones iguales (2 μ g/ml) sobre placas de ELISA y se analizaron para determinar unión de NI-202.21D11 recombinante.

Descripción detallada de la invención

60

La presente invención se refiere a las realizaciones tal y como se caracterizan en las reivindicaciones.

I. Definiciones

- 5 Las enfermedades sinucleinopáticas o sinucleinopatías son un grupo variado de trastornos neurodegenerativos que comparten una lesión patológica común compuesta por agregados de proteína α -sinucleína insoluble en poblaciones selectivamente vulnerables de neuronas y glía. Estos trastornos incluyen enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), disrofia neuroaxonal juvenil generalizada (enfermedad de Hallervorden-Spatz), fallo autonómico puro (FAP), atrofia multisistémica (AM) y
- 10 neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro tipo-1 (NACH-I). Desde la perspectiva clínica, se caracterizan por una disminución crónica y progresiva de las funciones motoras, cognitivas, conductuales y autonómicas, de acuerdo con la distribución de la lesiones.

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa dependiente de la edad con una etiología

15 desconocida. Se cree que la enfermedad de Parkinson esporádica se produce por una combinación de vulnerabilidad genética y ataques medioambientales. También se cree que la enfermedad de Parkinson (EP), si bien se desencadena por mecanismos dispares, sigue una vía patofisiológica compartida. Un nodo compartido es la implicación de α -sinucleína. La vinculación de esta proteína con la patogénesis de la enfermedad de Parkinson ha sido establecida por la identificación de tanto mutaciones puntuales como triplicado del gen en casos familiares, la

20 ubicación de la α -sinucleína respecto de los cuerpos de Lewy, una de las características patológicas distintivas de la enfermedad de Parkinson, y la correlación de la expresión de α -sinucleína y la patología de la enfermedad en modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson. La evidencia adicional indica que formas particulares de α -sinucleína (p. ej., dopamina mal plegada y unida a α -sinucleína) están implicadas en la enfermedad esporádica.

25 Las sinucleínas son proteínas pequeñas y solubles, expresadas principalmente en tejido neural y en ciertos tumores. La familia incluye tres proteínas conocidas: α -sinucleína, β -sinucleína, y γ -sinucleína. Todas las sinucleínas tienen en común un motivo de unión a lípidos de hélice α altamente conservado con similitud a los dominios de unión a lípidos de clase A2 de las apolipoproteínas intercambiables. Los miembros de la familia de las sinucleínas no se encuentran fuera de los vertebrados, si bien presentan cierta similitud estructural conservada con las proteínas

30 vegetales abundantes durante el desarrollo embrionario tardío. Las proteínas α - y β -sinucleínas se encuentran sobre todo en el tejido cerebral, donde se observan principalmente en extremos presinápticos. La proteína γ -sinucleína se encuentra sobre todo en el sistema nervioso periférico y en la retina, pero su expresión en tumores de pecho es un marcador de progresión tumoral. Las funciones celulares normales no se han determinado para ninguna de las proteínas de sinucleína, si bien algunos datos sugieren un papel en la regulación de la estabilidad y/o recambio de

35 membrana. Las mutaciones en α -sinucleína están asociadas a casos familiares raros de enfermedad de Parkinson de inicio temprano, y la proteína se acumula anormalmente en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, y muchas otras enfermedades neurodegenerativas. Para revisión véase, p. ej., George, *Genome Biol.* 3 (2002), revisiones 3002.1-revisiones 3002.6 publicadas en línea el 20 de diciembre de 2001, donde la Tabla 1 cataloga los miembros singulares de la familia de sinucleínas que aparecen actualmente listados en la base de datos

40 GenBank.

La proteína α -sinucleína se identificó originalmente en cerebros humanos como la proteína precursora del componente no- β -amiloide de (NAC) de las placas de la enfermedad de Alzheimer (EA); véase, p. ej., Ueda y col, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 1282-1286. La α -sinucleína, también denominada la precursora del

45 componente no-A β del amiloide de la EA (NACP), es una proteína de 140 aminoácidos. La α -sinucleína existe en su forma nativa como una hélice aleatoria; sin embargo, los cambios de pH, la aglomeración molecular, el contenido de metales pesados, y los niveles de dopamina afectan la conformación de la proteína. Se cree que los cambios de conformación a restos oligoméricos, protofibrilares, fibrilares y agregados regulan la toxicidad de la proteínas. Cada vez aparece más evidencia que indica que la α -sinucleína unida con dopamina tiene una evolución temporal más

50 rápida hacia la formación de fibrillas respecto de una proteína no unida. Asimismo, la dopamina en el marco de la sobreexpresión de α -sinucleína es tóxica.

En la presente memoria descriptiva, los términos « α -sinucleína», «alfa-sinucleína», «a-sinucleína» y «aSin» se usan de manera intercambiable para referirse específicamente a la forma monomérica nativa de la α -sinucleína. El

55 término « α -sinucleína» también se utiliza para identificar de forma general a otros conforméromos de α -sinucleína, por ejemplo, α -sinucleína unida a quinona-dopamina (DAQ) y oligómeros o agregados de α -sinucleína. El término « α -sinucleína» también se usa para referirse de forma colectiva a todos los tipos y formas de α -sinucleína. La secuencia de

proteína para α -sinucleína humana es

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTA

60 VAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDLGKN EEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (SEQ ID NO: 1).

- La secuencia de aminoácidos de α -sinucleína se puede obtener de la bibliografía y bases de datos pertinentes; véase, p. ej., Ueday *col.*, *ibíd.*; GenBank swissprot: locus SYUA_HUMAN, número de acceso P37840. El componente no-A β del amiloide de la EA (NAC) se deriva de α -sinucleína. NAC, un dominio altamente hidrofóbico dentro de la α -sinucleína, es un péptido compuesto por al menos 28 residuos de aminoácidos (residuos 60-87) y opcionalmente 35 residuos de aminoácidos (residuos 61-95). NAC muestra una tendencia a formar una estructura de β -lámina (Iwai, *y col.*, *Biochemistry*, 34 (1995) 10139-10145). Las secuencias de aminoácidos de NAC se describen en Jensen *y col.*, *Biochem. J.* 310 (1995), 91-94; número de acceso de GenBank S56746 y Ueda *y col.*, *PNAS USA* 90 (1993), 1282-11286.
- 10 La α -sinucleína disgregada o fragmentos correspondientes, incluyendo NAC, significa unidades de péptidos monoméricos. Por lo general, la α -sinucleína disgregada o fragmentos correspondientes son solubles y capaces de autoagregarse para formar oligómeros solubles. Los oligómeros de α -sinucleína y fragmentos correspondientes son generalmente solubles y existen predominantemente como hélices α . La α -sinucleína monomérica se puede preparar *in vitro* disolviendo un péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La disolución resultante se centrifuga para eliminar cualquier material particulado insoluble. La α -sinucleína agregada o fragmentos correspondientes, incluyendo NAC, significa oligómeros de α -sinucleína o fragmentos correspondientes que se han asociado en conjuntos de β -lámina insolubles. La α -sinucleína agregada o fragmentos correspondientes, incluyendo NAC, también significa polímeros fibrilares. Por lo general las fibrillas son insolubles. Algunos anticuerpos se unen ya sea a α -sinucleína soluble o a fragmentos correspondientes o a α -sinucleína agregada o a fragmentos correspondientes. Algunos anticuerpos se unen a oligómeros de α -sinucleína con mayor intensidad que a formas monoméricas o formas fibrilares. Algunos anticuerpos se unen a α -sinucleína tanto soluble como agregada o a fragmentos correspondientes, y a formas opcionalmente oligoméricas también.

Los anticuerpos anti- α -sinucleína humana descritos en el presente documento se unen específicamente a α -sinucleína y epítomos de la misma y a diversas conformaciones de α -sinucleína y epítomos de la misma. Por ejemplo, en la presente se describen anticuerpos que se unen específicamente a α -sinucleína, a α -sinucleína en su forma de monómero nativo, a α -sinucleína de longitud completa y troncada y a agregados de α -sinucleína. Como se usa en el presente documento, la referencia a un anticuerpo que «se une específicamente», «se une selectivamente» o «se une preferentemente» a α -sinucleína se refiere a un anticuerpo que no se une a otras proteínas no relacionadas. En un ejemplo, un anticuerpo de α -sinucleína descrito en el presente documento puede unirse a α -sinucleína o a un epítomo correspondiente y no mostrar ninguna unión por encima de aproximadamente 1,5 veces el valor de base para otras proteínas. Un anticuerpo que «se une específicamente» o «se une selectivamente» a un conformero de α -sinucleína se refiere a un anticuerpo que no se une a todas las conformaciones de α -sinucleína, es decir, no se une a al menos otro conformero de α -sinucleína. Por ejemplo, en la presente invención se describen anticuerpos que pueden distinguir entre formas monoméricas y agregadas de α -sinucleína, α -sinucleína humana y de ratón; α -sinucleína de longitud completa y formas troncadas así como también α -sinucleína humana versus β - y γ -sinucleína. Puesto que los anticuerpos anti- α -sinucleína humana de la presente invención se han aislado de un grupo de sujetos de edad avanzada que no presentaban signos de Parkinsonismo y que mostraban una respuesta inmunitaria específica de α -sinucleína, a los anticuerpos anti- α -sinucleína de la presente invención también se los denomina «autoanticuerpos humanos» para poner énfasis en el hecho de que esos anticuerpos estaban, en efecto, expresados por los sujetos y no se han aislado de, por ejemplo, un banco de expresión en fagos de inmunoglobulina humana, que hasta ahora representaba un procedimiento común para tratar de proporcionar anticuerpos tipo humanos.

45 Cabe destacar que el término «un» o «una» entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se debe entender que «un anticuerpo» representa uno o más anticuerpos. Como tal, los términos «un» (o «una»), «uno o más» y «al menos uno» se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término «polipéptido» pretende incluir un único «polipéptido», así como varios «polipéptidos», y se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) unidos de forma lineal por enlaces de amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término «polipéptido» se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, «proteína», «cadena de aminoácidos» o cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos se incluyen dentro de la definición de «polipéptido», y el término «polipéptido» se puede usar en vez de, o de forma intercambiable con, cualquiera de estos términos.

El término «polipéptido» también pretende hacer referencia a los productos de modificaciones postexpresión del polipéptido, incluyendo, sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos de origen no natural. Un

polipéptido puede derivar de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología de recombinación, pero no es necesariamente traducido a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier forma, incluyendo mediante síntesis química.

- 5 Un polipéptido de la invención puede tener un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tengan necesariamente dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que adoptan una gran cantidad de conformaciones diferentes, se denominan no plegados. Como se usa en el presente documento, el término glucoproteína se refiere a una proteína acoplada al menos a un resto carbohidrato que está unido a la proteína a través de una cadena lateral que contiene oxígeno o nitrógeno de un residuo de aminoácido, *p. ej.*, un residuo de serina o un residuo de asparagina.
- 10
- 15 Por un polipéptido «aislado» o un fragmento, variante o derivado del mismo se refiere a un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel de purificación particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede retirarse de su entorno original o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células huésped se consideran aislados a efectos de la invención, al igual que los polipéptidos naturales o recombinantes que han sido separados, fraccionados, o parcial o sustancialmente purificados por cualquier técnica adecuada.
- 20

También se incluyen como polipéptidos de la presente invención los fragmentos, derivados, análogos o variantes de los polipéptidos anteriores, y cualquier combinación de los mismos. Los términos «fragmento», «variante», «derivado» y «análogo», cuando se refieren a anticuerpos o polipéptidos de anticuerpos de la presente invención, incluyen cualquier polipéptido que retenga al menos algunas de las propiedades de unión al antígeno de la molécula, anticuerpo o polipéptido de unión nativo correspondiente. Los fragmentos de polipéptidos de la presente invención incluyen fragmentos proteolíticos, así como también fragmentos de eliminación, además de fragmentos de anticuerpo específicos descritos en otro punto en el presente documento. Las variantes de anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención incluyen fragmentos como se ha descrito anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ser de origen natural o no natural. Las variantes de origen no natural pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Las variantes de polipéptidos pueden comprender sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras. Los derivados de moléculas de unión específicas de α -sinucleína, *p. ej.*, anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención, son polipéptidos que se han alterado para presentar características adicionales que no se encuentran en el polipéptido nativo. Los ejemplos incluyen proteínas de fusión. Las variantes de polipéptidos también se denominan «análogos de polipéptidos» en el presente documento. Como se usa en el presente documento un «derivado» de una molécula de unión o fragmento de la misma, un anticuerpo o un polipéptido de anticuerpo se refiere a un polipéptido objeto que tiene uno o más residuos químicamente derivados por reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como «derivados» aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo, 4-hidroxiprolina se puede sustituir por prolina, 5-hidroxilisina se puede sustituir por lisina; 3-metilhistidina se puede sustituir por histidina; homoserina se puede sustituir por serina; y ornitina se puede sustituir por lisina.

25

30

35

40

45 El término «polinucleótido» pretende incluir un único ácido nucleico, así como varios ácidos nucleicos, y se refiere a una molécula o constructo de ácido nucleico aislado, *p. ej.*, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace de fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (*p. ej.*, un enlace de amida, como el de los ácidos nucleicos peptídicos (ANP)). El término «ácido nucleico» se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, *p. ej.*, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

50 Por ácido nucleico o polinucleótido «aislado» se refiere a una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido eliminada de su entorno natural. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un anticuerpo contenido en un vector se considera aislado a los efectos de la presente invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento de regulación, tal como un promotor, sitio de unión a ribosomas, o un terminador de la transcripción.

55

60 Como se usa en el presente documento, una «región codificante» es una porción del ácido nucleico que consiste en

- codones traducidos en aminoácidos. Aunque un «codón de terminación» (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, pero cualesquiera secuencias flanqueantes, por ejemplo promotores, sitios de unión a ribosoma, terminadores de transcripción, intrones y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más regiones de codificación de la presente invención pueden estar presentes en un
- 5 constructo de un solo polinucleótido, p. ej., en un vector individual, o en constructos de polinucleótido separados, p. ej., en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, p. ej., un vector individual puede codificar por separado una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, un polinucleótido o un ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes
- 10 heterólogas, ya sea fusionadas o no fusionadas a un ácido nucleico que codifica una molécula de unión, un anticuerpo, o fragmento, variante o derivado correspondiente. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.
- 15 En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido puede incluir un promotor y/u otros elementos de control de transcripción o traducción asociados operativamente con una o más regiones codificantes. Una asociación operativa es cuando una región codificante para un producto génico, p. ej., un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras de tal forma como para poner la expresión del producto génico bajo la influencia o control de
- 20 la secuencia o secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tal como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con la misma) están «asociados de forma operativa» o «unidos de forma operativa» si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de expresión para dirigir la expresión del producto génico o interfiere con la capacidad de la
- 25 plantilla de ADN de transcribirse. Por lo tanto, una región promotora estaría asociada de forma operativa con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de células que dirige la transcripción sustancial del ADN únicamente en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden estar
- 30 asociados de forma operativa con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de células. En el presente documento se describen promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción.

Los expertos en la técnica conocen una diversidad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de transcripción que funcionan en células vertebradas, tales como, sin carácter

35 restrictivo, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, junto con el intrón-A), virus simio 40 (el promotor temprano), y retrovirus (tales como virus Rous sarcoma). Otras regiones de control de transcripción incluyen las derivadas de genes vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovino y β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y

40 potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles por linfoquina (p. ej., promotores inducibles por interferones o interleucinas).

De forma similar, los expertos en la técnica conocen una diversidad de elementos de control de traducción. Estos incluyen, pero sin carácter restrictivo, sitios de unión a ribosoma, codones de iniciación y terminación de traducción,

45 y elementos derivados de picornavirus (particularmente un sitio de entrada a ribosoma interno, o IRES, también llamado secuencia CITE).

En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm).

50

Las regiones de codificación de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar asociadas con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. De acuerdo con la hipótesis de las señales, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se inició la exportación de la cadena de proteínas en crecimiento a lo largo del

55 retículo endoplasmático rugoso. Los expertos en la técnica son conscientes de que los polipéptidos secretados por células vertebradas generalmente tienen un péptido señal fusionado al extremo N-terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido completo o «de longitud completa» para producir un forma secretada o «madura» del polipéptido. En ciertas realizaciones, se usa el péptido señal nativo, p. ej., un péptido señal de cadena pesada o de

60 cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad de dirigir la

secreción del polipéptido que se asocia operativamente con el mismo. Como alternativa, se puede usar un péptido señal heterólogo de mamífero, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede estar sustituida por la secuencia líder de activador del plasminógeno de tejido humano (TPA) o β -glucuronidasa de ratón.

5

A menos que se especifique otra cosa, los términos «trastorno» y «enfermedad» se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Una «molécula de unión» como se utiliza en el contexto de la presente invención se refiere a anticuerpos, y fragmentos del mismo.

Los términos «anticuerpo» e «inmunoglobulina» se utilizan de manera intercambiable en el presente documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de unión α -sinucleína que comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada, y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas vertebrados se comprenden relativamente bien; véase, p. ej., Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988).

Como se analizará en más detalle a continuación, el término «inmunoglobulina» comprende varias clases amplias de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica reconocerán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre las mismas (p. ej., γ 1- γ 4). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la «clase» del anticuerpo como IgG, IgM, IgA IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que otorgan una especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente distinguibles para el experto en la técnica en vista de la presente descripción y, por consiguiente, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulina se encuentran claramente comprendidas dentro del alcance de la presente invención, la siguiente descripción se referirá generalmente a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula estándar de inmunoglobulina comprende dos polipéptidos idénticos de cadena ligera de peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, y dos polipéptidos idénticos de cadena pesada de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están normalmente unidas por enlaces de disulfuro en una configuración de «Y», donde las cadenas ligeras agrupan las cadenas pesadas comenzando en la boca de la «Y» y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligera y pesada están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de «cola» de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces covalentes de disulfuro o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, linfocitos B o células huésped modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos transcurren desde un extremo N-terminal en los extremos bifurcados de la configuración de Y al extremo C-terminal al final de cada cadena.

40

Tanto la cadena ligera como la pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos «constante» y «variable» se usan funcionalmente. En este sentido, se apreciará que los dominios variables de las porciones de cadena ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor Fc, unión al complemento, y similares. Como convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que se alejan más del sitio de unión al antígeno o del extremo amino del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y la porción C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL en realidad comprenden el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

50

Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer selectivamente y unir específicamente epítomos en antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión al antígeno presente al final de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres CDR en cada una de las cadenas VH y VL. Cualquier fragmento de inmunoglobulina o anticuerpo que contenga suficiente estructura como para unirse específicamente a α -sinucleína se denomina en el presente documento de manera intercambiable como «fragmento de unión» o «fragmento inmuno-específico».

55

En anticuerpos de origen natural, un anticuerpo comprende seis regiones hipervariables, a veces denominadas

60

«regiones determinantes de complementariedad» o «CDR», presentes en cada dominio de unión al antígeno, que son secuencias cortas, no contiguas de aminoácidos que se colocan específicamente para formar el dominio de unión al antígeno a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. Las «CDR» están flanqueadas por cuatro regiones «marco» o «FR» relativamente conservadas que muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación de β -lámina y las CDR forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de β -lámina. Por lo tanto, las regiones marco actúan para formar una matriz que proporciona el posicionamiento de las CDR en una orientación correcta mediante interacciones no covalentes intercatenarias. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo cognado. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, pueden ser fácilmente identificados por un experto en la técnica para determinar cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada, debido a que se han definido con precisión; véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., y *col.*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, (1983); y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917.

En el caso en que se utilicen y/o acepten en la técnica dos o más definiciones de un término, la definición del término como se usa en el presente documento pretende incluir todos estos significados, a menos que se indique explícitamente otra cosa. Un ejemplo específico es el uso del término «región determinante de complementariedad» («CDR») para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos encontrados dentro de la región variable de tanto los polipéptidos de cadenas pesadas como ligeras. Esta región particular ha sido descrita por Kabat y *col.*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, donde las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o las variantes del mismo esté comprendida dentro del alcance del término, como se define y se utiliza en el presente documento. Los residuos de aminoácidos adecuados que incluyen las CDR, como se define mediante cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la Tabla 1 como una comparación. Las cantidades exactas de residuos que incluye una CDR en particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de manera rutinaria qué residuos comprenden una región hipervariable o CDR particular del subtipo de anticuerpo IgG humana dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Tabla 1: Definiciones de CDR¹

	Kabat	Chothia
CDR1 de VH	31-35	26-32
CDR2 de VH	50-65	52-58
CDR3 de VH	95-102	95-102
CDR1 de VL	24-34	26-32
CDR2 de VL	50-56	50-52
CDR3 de VL	89-97	91-96

¹La numeración de las definiciones de todas las CDR de la Tabla 1 es de acuerdo con las convenciones de numeración establecidas en Kabat y *col.* (véase a continuación).

Kabat y *col.* también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que se aplica a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar sin ambigüedad este sistema de «numeración de Kabat» a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se utiliza en el presente documento, la «numeración de Kabat» se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat y *col.*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones de residuos de aminoácidos específicas en un anticuerpo o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo de la presente invención son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, fragmentos inmunoespecíficos, variantes o derivados de los

- mismos de la invención incluyen, pero sin carácter restrictivo, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados, murinizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión a epítipo, *por ejemplo*, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fvs enlazados a disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VL o VH, fragmentos
- 5 producidos mediante un banco de expresión de Fab, y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, p. ej., anticuerpos anti-Id a anticuerpos descritos en la presente). Las moléculas ScFv se conocen en la técnica y se describen, p. ej., en la patente de EE. UU. 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.
- 10 En una realización, el anticuerpo de la presente invención no es IgM o un derivado de la misma con una estructura pentavalente. En particular, en aplicaciones específicas de la presente invención, especialmente uso terapéutico, las IgM son menos útiles que las IgG y otros anticuerpos bivalentes o moléculas de unión correspondientes, ya que las IgM, debido a su estructura pentavalente y falta de maduración de afinidad, a menudo muestran reactividades
- 15 cruzadas no específicas y muy baja afinidad.
- En una realización particular, el anticuerpo de la presente invención no es un anticuerpo policlonal, *es decir*, consiste sustancialmente en una especie de anticuerpo particular en vez de ser una mezcla obtenida de una muestra de inmunoglobulina en plasma.
- 20 Los fragmentos de anticuerpo, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la región o regiones variables solas o junto con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a α -sinucleína que también comprenden cualquier combinación de una o más regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos o
- 25 fragmentos inmunoespecíficos de los mismos de la presente invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, conejo, cabra, cobaya, camello, llama, caballo o pollo. En otra realización, la región variable puede tener un origen condíctico (*p. ej.*, de tiburones).
- 30 En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano aislado de un ser humano. Opcionalmente, la región marco del anticuerpo humano se alinea y se adopta de acuerdo con las secuencias de región variable de línea germinal humana pertinentes de la base de datos; véase, *p. ej.*, Vbase (vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk) alojada por el MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido). Por ejemplo, los aminoácidos que se considera se desvían potencialmente de la verdadera secuencia de línea germinal
- 35 podrían deberse a las secuencias de cebadores de PCR incorporadas durante el proceso de clonación. En comparación con anticuerpos de tipo humano generados artificialmente, tales como fragmentos de anticuerpo monocatenarios (scFv) de un banco de anticuerpos de expresión en fagos o ratones xenogénicos, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención se caracteriza por (i) obtenerse usando la respuesta inmunitaria humana en lugar de la de sustitutos de animal, *es decir*, el anticuerpo se ha generado en respuesta a α -sinucleína natural en su conformación pertinente en el cuerpo humano, (ii) haber protegido al individuo o es al menos significativo por la presencia de α -sinucleína, y (iii) dado que el anticuerpo es de origen humano, los riesgos de reactividad cruzada en comparación con autoantígenos se minimizan. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención los términos «anticuerpo monoclonal humano», «autoanticuerpo monoclonal humano», «anticuerpo humano» y similares, se usan para representar una molécula de unión a α -sinucleína que es de origen humano, es
- 40 decir, que se ha aislado de una célula humana tal como un linfocito B o hibridoma del mismo, o el ADNc del que se ha clonado directamente de ARNm de una célula humana, por ejemplo, un linfocito B de memoria humano. Un anticuerpo humano es aún «humano» incluso si las sustituciones de aminoácidos se hacen en el anticuerpo, p. ej., para mejorar las características de unión.
- 45 Los anticuerpos que derivan de bancos de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo en la patente de EE. UU. N.º 5.939.598 por Kucherlapati y *col.*, se denominan anticuerpos de tipo humano para distinguirlos de los anticuerpos verdaderamente humanos de la presente invención.
- 50 Como se usa en el presente documento, el término «anticuerpo murinizado» o «inmunoglobulina murinizada» se refiere a un anticuerpo que comprende una o más CDR de un anticuerpo humano de la presente invención; y una región marco humana que contiene sustituciones y/o eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos que están basadas en una secuencia de anticuerpo de ratón. La inmunoglobulina humana que proporciona las CDR se denomina «parental» o «aceptora», y el anticuerpo de ratón que proporciona los cambios marco se denomina
- 60 «donante». Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, normalmente son

sustancialmente idénticas a regiones constantes de anticuerpo de ratón, es decir, al menos idénticas en aproximadamente el 85-90 %, o aproximadamente el 95 %. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una inmunoglobulina de cadena pesada o ligera humana murinizada de longitud completa contiene una región constante de ratón, CDR humanas y una región marco sustancialmente humana que tiene la cantidad de sustituciones de aminoácidos «murinizantes». Normalmente, un «anticuerpo murinizado» es un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable murinizada y/o una cadena pesada variable murinizada. Por ejemplo, un anticuerpo murinizado no incluiría un anticuerpo quimérico típico, p. ej., debido a que la región variable entera de un anticuerpo quimérico no es de ratón. Un anticuerpo modificado que se ha «murinizado» mediante el proceso de «murinización» se une al mismo antígeno que el anticuerpo parental que proporciona las CDR y es normalmente menos inmunógeno en ratones, en comparación con el anticuerpo parental.

Como se usa en el presente documento, el término «porción de cadena pesada» incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de: dominio CH1, un dominio bisagra (p. ej., región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede comprender una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, y un dominio CH3 o una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede carecer de al menos una porción de un dominio CH2 (p. ej., todo o parte de un dominio CH2). Como se ha expuesto anteriormente, un experto en la técnica entenderá que estos dominios (p. ej., las porciones de cadena pesada) se pueden modificar de tal forma que varíen en la secuencia de aminoácidos con respecto a la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

En determinados anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos descritos en el presente documento, las porciones de cadena pesada de una cadena de polipéptidos de un multímero son idénticas a las de una segunda cadena de polipéptidos del multímero. Como alternativa, los monómeros que contienen porciones de cadena pesada de la invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión diana diferente, formando, por ejemplo, un diacuerpo o anticuerpo biespecífico.

En otra realización, los anticuerpos o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos descritos en el presente documento están compuestos por una cadena de polipéptidos sencilla tal como scFv y deben expresarse de modo intracelular (intracuerpos) para potenciales aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas *in vivo*.

Las porciones de cadena pesada de un polipéptido de unión para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente se pueden derivar de distintas moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG4.

Como se usa en el presente documento, el término «porción de cadena ligera» incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. En una realización, la porción de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio V_L o CL.

Se considera que el tamaño mínimo de un epítipo de péptido o polipéptido para un anticuerpo debe ser de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítopos de péptido o polipéptido pueden contener, por ejemplo, al menos siete, al menos nueve, o entre al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. Dado que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos, y en algunos casos, pueden incluso no estar en la misma cadena de péptidos. En la presente invención, un epítipo de péptido o polipéptido reconocido por anticuerpos de la presente invención contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de α -sinucleína. Como se utiliza en la presente, cuando se dice que un anticuerpo se une «dentro» de determinado intervalo de aminoácidos, p. ej., se une a un epítipo «dentro de los

aminoácidos 4 a 15 de α -sinucleína» quiere decir que el epítipo abarca el intervalo completo de determinados aminoácidos o es más pequeño. Dicho de otro modo, para un epítipo «dentro de los aminoácidos 4 a 15 de α -sinucleína», el epítipo puede incluir la cadena de péptidos de 12 aminoácidos entera de 4 a 15 pero también puede ser más pequeño, p. ej., aminoácidos 4 a 12, aminoácidos 4 a 10 o aminoácidos 4 a 8. El experto en la técnica también reconocerá que los aminoácidos fuera del intervalo determinado pueden contribuir a conseguir una mejor afinidad de unión o un mayor reconocimiento de un epítipo conformacional, pero no son necesarios para la unión.

Por «unir específicamente» o «reconocer específicamente», usados de manera intercambiable en el presente documento, se entiende generalmente que una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo, se une a un epítipo a través de su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica algo de complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. De acuerdo con esta definición, se dice que un anticuerpo se «une específicamente» a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión al antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio, no relacionado. El término «especificidad» se usa en el presente documento para calificar la afinidad relativa mediante la cual determinado anticuerpo se une a determinado epítipo. Se puede considerar, por ejemplo, que el anticuerpo «A» tiene una mayor especificidad para un epítipo dado que el anticuerpo «B», o se puede decir que el anticuerpo «A» se une al epítipo «C» con una mayor especificidad que la que tiene para el epítipo «D» relacionado.

Siempre que esté presente, la expresión «características de unión inmunológicas» u otras características de unión de un anticuerpo con un antígeno, en todas sus formas gramaticales, se refiere a la especificidad, afinidad, reactividad cruzada y otras características de unión de un anticuerpo.

«Unir preferentemente» significa que la molécula de unión, p. ej., un anticuerpo se une específicamente a un epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo relacionado, similar, homólogo o análogo. Por lo tanto, un anticuerpo que «se une preferentemente» a un epítipo dado tendría más probabilidades de unirse a ese epítipo que a un epítipo relacionado, incluso cuando dicho anticuerpo pueda tener una reacción cruzada con el epítipo relacionado.

A modo de ejemplo no limitante, una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo, se une a un primer epítipo preferentemente si se une a dicho primer epítipo con una constante de disociación (K_D) que es menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo.

En otro ejemplo no limitante, una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una tasa de disociación ($k(\text{off})$) que es menor que la $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo.

En algunas realizaciones, una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado descrito en la presente se puede unir a una α -sinucleína o a un fragmento o variante correspondiente con una tasa de disociación ($k(\text{off})$) inferior o igual a $5 \times 10^{-2} \text{seg}^{-1}$, 10^{-2}seg^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{seg}^{-1}$ o 10^{-3}seg^{-1} . En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención se puede unir a α -sinucleína o a un fragmento o variante correspondiente con una tasa de disociación ($k(\text{off})$) inferior o igual a $5 \times 10^{-4} \text{seg}^{-1}$, 10^{-4}seg^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{seg}^{-1}$, o 10^{-5}seg^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{seg}^{-1}$, 10^{-6}seg^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{seg}^{-1}$ o 10^{-7}seg^{-1} .

En algunas realizaciones, una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado descrito en la presente se puede unir a α -sinucleína o a un fragmento o variante correspondiente con una tasa de asociación ($k(\text{on})$) mayor o igual a $10^3 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$, $10^4 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$. En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención se puede unir a α -sinucleína o a un fragmento o variante correspondiente con una tasa de asociación ($k(\text{on})$) mayor o igual a $10^5 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$, $10^6 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$, o $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ o $10^7 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$.

Se dice que una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo, inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferentemente a ese epítipo al punto que bloquea, en cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia con el epítipo. La inhibición competitiva se puede determinar mediante cualquier

procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competición. A modo de ejemplo, un anticuerpo puede inhibir de forma competitiva la unión del anticuerpo de referencia con un epítipo dado en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 % o al menos un 50 %.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término «afinidad» se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un epítipo individual con la CDR de una molécula de unión, p. ej., una molécula de inmunoglobulina; véase, p. ej., Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988) en las páginas 27-28. Como se usa en el presente documento, el término «avidez» se refiere a la estabilidad general del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la fuerza de combinación funcional de una mezcla
10 de inmunoglobulina con el antígeno; véase, p. ej., Harlow en las páginas 29-34. La avidez se refiere tanto a la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopos específicos, así como también a las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo de alta repetición, tal como un polímero, sería de alta avidez. La afinidad o avidez de un anticuerpo para un antígeno se puede determinar de manera experimental
15 utilizando cualquier procedimiento apropiado; véase, por ejemplo, Berzofsky y col., "Antibody-Antigen Interactions" In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press Nueva York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company Nueva York, N Y (1992), y procedimientos descritos en la presente. Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno incluyen ELISA, RIA y resonancia de plasmón superficial. La afinidad calculada de una interacción de anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes
20 condiciones, p. ej., concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno, por ejemplo, K_D , CI_{50} , se pueden hacer con disoluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

Las moléculas de unión, p. ej., anticuerpos o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno correspondientes de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Como se usa en el presente documento, el término «reactividad cruzada» se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medición de la relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Por lo tanto, un anticuerpo tiene reactividad cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo con reactividad cruzada generalmente contiene muchas de las
30 características estructurales de complementariedad del epítipo inductor, y en algunos casos, puede ajustarse realmente mejor que el original.

Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen cierto grado de reactividad cruzada, en el sentido de que se unen a epítopos relacionados, pero no idénticos, p. ej., epítopos con una identidad con un epítipo de referencia de al menos 95 %, al menos 90 %, al menos 85 %, al menos 80 %, al menos 75 %, al menos 70 %, al menos 65 %, al menos 60 %, al menos 55 %, y al menos 50 % (calculada utilizando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en la presente). En algunas realizaciones, se puede decir que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no se une a epítopos con una identidad con un epítipo de referencia de menos de 95 %, menos de 90 %, menos de 85 %, menos de 80 %, menos de 75 %, menos de 70 %, menos de 65 %, menos de 60 %, menos de 55 %, y menos
40 de 50 % (calculada utilizando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en la presente). Un anticuerpo puede considerarse «altamente específico» para determinado epítipo si no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítipo.

Las moléculas de unión, p. ej., anticuerpos o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno correspondientes de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a α -sinucleína. Las afinidades de unión incluyen aquellas con una constante de disociación o K_D menor de $5 \times 10^{-2}M$, $10^{-2}M$, $5 \times 10^{-3}M$, $10^{-3}M$, $5 \times 10^{-4}M$, $10^{-4}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $10^{-5}M$, $5 \times 10^{-6}M$, $10^{-6}M$, $5 \times 10^{-7}M$, $10^{-7}M$, $5 \times 10^{-8}M$, $10^{-8}M$, $5 \times 10^{-9}M$, $10^{-9}M$, $5 \times 10^{-10}M$, $10^{-10}M$, $5 \times 10^{-11}M$, $10^{-11}M$, $5 \times 10^{-12}M$, $10^{-12}M$, $5 \times 10^{-13}M$, $10^{-13}M$, $5 \times 10^{-14}M$, $10^{-14}M$, $5 \times 10^{-15}M$, o $10^{-15}M$.
50

Como se indica previamente, se conocen bien las estructuras de subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término «dominio VH» incluye el dominio variable de extremo amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término «dominio CH1» incluye el primer (extremo más amino) dominio de región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y es extremo amino a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.
55

Como se usa en el presente documento, el término «dominio CH2» incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, p. ej., desde aproximadamente el residuo 244 al residuo 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y residuos 231-
60

340, sistema de numeración de la UE; véase Kabat EA y *col. op. cit.*) El dominio CH2 es único en el sentido de que no está íntimamente emparejado con otro dominio. En cambio, dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas por N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta. También existen muchos antecedentes que demuestran que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 al extremo C-terminal de la molécula IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

Como se usa en el presente documento, el término «región bisagra» incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo así que las dos regiones de unión al antígeno del extremo N-terminal se muevan independientemente. Las regiones bisagra pueden subdividirse en tres dominios distintos; dominios bisagra superior, medio e inferior; véase Roux y *col.*, J. Immunol. 161 (1998), 4083.

Como se usa en el presente documento, el término «enlace disulfuro» incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas IgG de origen natural, las regiones CH1 y CL se unen por un enlace de disulfuro y las dos cadenas pesadas se unen por dos enlaces de disulfuro en las posiciones correspondientes a 239 y 242 utilizando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración de la UE).

Como se usan en el presente documento, los términos «unido», «fusionado» o «fusión» se usan de manera intercambiable. Estos términos se refieren a la unión de dos elementos o componentes adicionales, por cualquier medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una «fusión dentro del marco» se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abierta (ORF, por su sigla en inglés) de polinucleótido para formar un ORF más largo y continuo, de manera que se mantenga el marco de lectura traduccional correcto de los ORF originales. Por lo tanto, una proteína de fusión recombinante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (cuyos segmentos no se unen normalmente de esta forma en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace de este modo continuo a través de los segmentos fusionados, los segmentos se pueden separar física o espacialmente, por ejemplo, mediante una secuencia de enlace dentro del marco. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las CDR de una región variable de inmunoglobulina pueden fusionarse, dentro del marco, pero estar separados por un polinucleótido que codifica al menos una región marco de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, siempre que las CDR «fusionadas» se cotraduzcan como parte de un polipéptido continuo.

El término «expresión», como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso por el cual un gen produce una sustancia bioquímica, por ejemplo, un ARN o polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula incluyendo, sin limitación, inactivación génica, así como también expresión transitoria y expresión estable. Incluye, sin limitación, la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN de horquilla corto (ARNhc), ARN de interferencia pequeño (ARNip) o cualquier otro producto de ARN, y la traducción de dicho ARNm en uno o más polipéptidos. Si el producto final deseado es una sustancia bioquímica, la expresión incluye la creación de esa sustancia bioquímica y de cualquier precursor. La expresión de un gen produce un «producto génico». Como se usa en el presente documento, un producto génico puede ser un ácido nucleico, *p. ej.*, un ARN mensajero producido por la transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce de una transcripción. Los productos génicos descritos en el presente documento incluyen, además, ácidos nucleicos con modificaciones posteriores a la transcripción, *p. ej.*, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones posteriores a la traducción, *p. ej.*, metilación, glucosilación, adición de lípidos, asociación con otras subunidades de proteína, escisión proteolítica y similares.

Como se usa en el presente documento, el término «muestra» se refiere a cualquier material biológico obtenido de un sujeto o paciente. En un aspecto, una muestra puede comprender sangre, líquido cefalorraquídeo («LCR»), u orina. En otros aspectos, una muestra puede comprender sangre entera, plasma, linfocitos B enriquecidos de muestras de sangre, y células cultivadas (*p. ej.*, linfocitos B de un sujeto). Una muestra puede también incluir una biopsia o muestra tisular que incluye tejido neural. En aun otros aspectos, una muestra puede comprender células enteras y/o un lisado de las células. Las muestras de sangre se pueden tomar mediante procedimientos conocidos en la técnica. En un aspecto, el sedimento puede volver a ponerse en suspensión agitándose vorticialmente a 4 °C en 200 µl de tampón (Tris 20 mM, pH 7,5, Nonidy col 0,5 %, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, NaCl 0,1 M, inhibidor de proteasa IX Sigma, e inhibidores de fosfatasa IX Sigma 1 y 2). La suspensión puede mantenerse en hielo durante 20 minutos con agitación vorticial intermitente. Después de centrifugar a 15.000 x g durante 5 minutos a aproximadamente 4 °C, las alícuotas de sobrenadante pueden almacenarse a aproximadamente -70 °C.

Como se usa en el presente documento, los términos «tratar» o «tratamiento» se refieren tanto a tratamiento

terapéutico como a medidas preventivas y profilácticas, donde el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio fisiológico o trastorno no deseado, tal como el desarrollo del Parkinsonismo. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin carácter restrictivo, alivio de síntomas, reducción del alcance de la enfermedad, estabilización del estado de la enfermedad (*es decir*, que no empeora), demora o ralentización del avance de la enfermedad,

5 mejora o mitigación de la patología, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. «Tratamiento» también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en caso de no recibir tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o el trastorno, así como aquellos propensos a padecer la afección o el trastorno o aquellos donde se quiere evitar la manifestación de la afección o trastorno.

10

«Sujeto», «individuo», «animal», «paciente» o «mamífero» se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, *p. ej.*, un paciente humano, para el cual se desea el diagnóstico, el pronóstico, la prevención o la terapia.

15 II. Anticuerpos

15

En general, la presente invención se refiere a anticuerpos anti- α -sinucleína humana y a fragmentos de unión al antígeno de los mismos de acuerdo con la caracterización en las reivindicaciones, que pueden demostrar las características de unión inmunológica y/o propiedades biológicas como las descritas para los anticuerpos ilustrados en los Ejemplos. De acuerdo con la presente invención los anticuerpos monoclonales humanos específicos para α -sinucleína se clonaron de un conjunto de sujetos de edad avanzada.

20

En el transcurso de los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención, los intentos iniciales no lograron clonar anticuerpos específicos de α -sinucleína pero casi siempre dieron como resultado clones de falso positivo. La investigación adicional de estos clones indicó que producían anticuerpos que reconocían proteínas de *E. coli*.

25

Para resolver este problema, los anticuerpos en medios acondicionados de cultivos de linfocitos B de memoria humanos se cribaron en paralelo para determinar unión a monómero de alfa sinucleína de longitud completa revestido y ausencia de unión a proteínas de *E. coli* y albúmina de suero bovino (BSA). En particular, el medio acondicionado de linfocitos B se preabsorbió con proteínas de *E. coli* antes de someter el medio a un ensayo ELISA para cribado de anticuerpos humanos de unión a α -sinucleína.

30

Los intentos iniciales de aislamiento de anticuerpos específicos se centraron en grupos de sujetos humanos con elevada actividad de unión en plasma a α -sinucleína, lo que sugiere niveles elevados de plasma de anticuerpos α -sinucleína circulantes. Estos intentos no consiguieron producir linfocitos B de memoria humanos específicos de α -sinucleína y los anticuerpos descritos en la presente invención se aislaron de grupos de sujetos con baja reactividad

35

en plasma a α -sinucleína. Gracias a esta medida, pudieron aislarse diversos anticuerpos. Los anticuerpos seleccionados se analizaron adicionalmente para determinar la clase y subclase de cadena ligera. Los mensajes de anticuerpos pertinentes seleccionados de cultivos de linfocitos B de memoria se transcriben entonces por RT-PCR, se clonan y se combinan

40

en vectores de expresión para la producción recombinante; véase la publicación del PCT N.º WO 2010/069603 A1. Los anticuerpos anti- α -sinucleína humana ejemplares NI-202.12F4, NI-202.3G12, y NI-202.3D8 se describen en la publicación del PCT N.º WO 2010/069603 A1.

En la presente se describe el anticuerpo monoclonal humano NI-202.21D11. Se determinó la expresión recombinante de NI-202.21D11 en HEK293 o células CHO y la posterior caracterización de su especificidad de

45

unión para α -sinucleína humana (Fig. 2A-B). Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere al anticuerpo anti- α -sinucleína monoclonal humano aislado NI-202.21D11 y a fragmentos, derivados y variantes de unión al antígeno del mismo. La presente invención también se dirige a una molécula de unión tal como un anticuerpo, o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo, donde el anticuerpo comprende una

50

VH con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:20, y una VL con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:26, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de la misma. En una realización, el anticuerpo NI-202.21D11, así como variantes, fragmentos o derivados del mismo se caracterizan como de unión específica a α -sinucleína humana en comparación con β -sinucleína humana y γ -sinucleína humana, y con α -sinucleína humana en comparación con α -sinucleína murina. NI-202.21D11 preferentemente se une a α -sinucleína en la forma oligomérica o agregada.

55

En una realización, la presente invención se dirige a un anticuerpo anti- α -sinucleína, o a un fragmento, variante o derivados de unión al antígeno del mismo, donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo de α -sinucleína que el anticuerpo de referencia NI-202.21D11. Como se ilustra en los Ejemplos, el anticuerpo NI-

60

202.21D11 se une a truncamientos de α -sinucleína que contienen la región ácida en el extremo C-terminal

(aminoácidos 96-140) en un ensayo ELISA directo, p. ej., dentro de los aminoácidos 113 a 123 de la SEQ ID NO:1, y específicamente se une a un epítipo dentro de los aminoácidos PVDPDNE (aminoácidos 117-123 de la SEQ ID NO:1).

5 El anticuerpo NI-202.21D11 preferentemente se une a agregados de α -sinucleína o fibrillas sobre la forma monomérica de α -sinucleína como se muestra en el Ejemplo 2. Asimismo, el anticuerpo NI-202.21D11 se une a formas patológicas de α -sinucleína en el cerebro, p. ej., agregados patológicos de α -sinucleína como se ejemplifica mediante tinción inmunohistoquímica descrita en el Ejemplo 3. Por ende, la presente invención proporciona un nuevo anticuerpo anti- α -sinucleína humano útil para fines terapéuticos y de diagnóstico.

10

La presente invención proporciona moléculas de unión, p. ej., anticuerpos y fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos, que comprenden al menos seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una región variable VH y VL de NI-202.21D11 que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas en la Fig. 1. Las secuencias de nucleótidos correspondientes que codifican las regiones variables identificadas anteriormente se exponen en el listado de secuencias adjunto. El conjunto de CDR de las secuencias de aminoácidos anteriores de la región VH y/o VL como se representa en la Fig. 1 también se indica en el listado de secuencias adjunto. Sin embargo, como se analiza a continuación, el experto en la técnica es consciente del hecho de que pueden usarse CDR adicionalmente o como alternativa, que difieren en su secuencia de aminoácidos de las expuestas en la Fig. 1 por uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos. La VH del NI-202.21D11 se representa mediante la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:15 y la secuencia de ADN SEQ ID NO:19, y su forma corregida de acuerdo con la LG se representa como la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:20 y la secuencia de ADN SEQ ID NO:21. La VL del NI-202.21D11 se representa mediante la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:22 y la secuencia de ADN SEQ ID NO:28, y su forma corregida de acuerdo con la LG se representa como la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:26 y la secuencia de ADN SEQ ID NO:27. Las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada de VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 están representadas por las SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, y SEQ ID NO:18, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera de VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 están representadas por las SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, y SEQ ID NO:25, respectivamente.

30 En una realización, una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo de la presente invención es uno cualquiera de los anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de la región VH y/o VL como se representa en la Fig. 1. De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención es una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo que compite por la unión a α -sinucleína con un anticuerpo que tiene una región VH y/o VL como se representa en la Fig. 1. Esos anticuerpos pueden ser humanos también, en particular para aplicaciones terapéuticas. Como alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo murino, murinizado y murino-humano quimérico, que son particularmente útiles para procedimientos de diagnóstico y estudios en animales.

Como se ha mencionado anteriormente, debido a su generación tras una respuesta inmunitaria humana, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención reconocerá epítopos que son de importancia fisiológica particular y que pueden no ser accesibles o menos inmunógenos en el caso de procesos de inmunización para la generación de, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón y en cribado *in vitro* de bancos de expresión en fagos, respectivamente. En consecuencia, un epítipo de un anticuerpo anti- α -sinucleína humano de la presente invención puede ser único. Por lo tanto, la presente invención también se extiende, por lo general, a anticuerpos anti- α -sinucleína y moléculas de unión a α -sinucleína que compiten con el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención para unión específica a α -sinucleína. La presente invención se dirige más específicamente a una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo o un fragmento, variante o derivados de unión al antígeno del mismo, donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo de α -sinucleína que el anticuerpo de referencia NI-202.21D11.

50

La competencia entre anticuerpos se puede determinar, por ejemplo, mediante un ensayo donde la inmunoglobulina que se está analizando inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como α -sinucleína. Se conocen varios tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición sándwich; véase Stahlí y col., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; EIA de biotina-avidina directo de fase sólida; véase Kirkland y col., *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 y Cheung y col., *Virology* 176 (1990), 546-552; ensayo etiquetado directo de fase sólida, ensayo de tipo sándwich etiquetado directo de fase sólida; véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA etiquetado directo de fase sólida usando la etiqueta I¹²⁵; véase Morel y col., *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 y Moldenhauer y col., *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Normalmente, tal ensayo implica el uso de α -sinucleína purificada o agregados de la

- misma unidos a una superficie sólida o células portadoras de cualquiera de estos, una inmunoglobulina de ensayo no etiquetada y una inmunoglobulina de referencia etiquetada, *es decir*, un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. La inhibición competitiva se mide mediante la determinación de la cantidad de etiqueta unida a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Normalmente, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Un ensayo de unión competitiva se puede llevar a cabo en las condiciones que se describen para el ensayo ELISA en los Ejemplos adjuntos. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competición (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente lo suficientemente cercano al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que tenga lugar el impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo de competición está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos el 50 % o el 75 %. Por lo tanto, la presente invención además está dirigida a una molécula de unión, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento, variante o derivados de unión al antígeno del mismo, donde el anticuerpo inhibe de manera competitiva el anticuerpo de referencia NI-202.22G11 para que no se una a α -sinucleína.
- 15 También se describe una molécula de unión aislada, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a α -sinucleína humana, que comprende una secuencia de aminoácidos de región variable (VH) de cadena pesada de inmunoglobulina al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:20.
- 20 También se describe una molécula de unión aislada, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a α -sinucleína humana, que comprende una secuencia de aminoácidos de VH idéntica o idéntica a excepción de uno, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos a las SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:20.
- 25 También se describe una molécula de unión aislada, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a α -sinucleína humana, que comprende una secuencia de aminoácidos de región variable (VL) de cadena ligera de inmunoglobulina al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:26.
- 30 Algunas realizaciones describen una molécula de unión aislada, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a α -sinucleína humana, que comprende una secuencia de aminoácidos de VL idéntica o idéntica a excepción de uno, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos a las SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:26.
- 35 En otras realizaciones, un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a α -sinucleína humana comprende, está compuesto esencialmente por, o está compuesto por secuencias de aminoácidos de VH y VL al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idénticas a: (a) SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:22, respectivamente, (b) SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:26, respectivamente, (c) SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22, respectivamente, (d) SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:26, respectivamente.
- 40 Una inmunoglobulina o su ADNc codificante se puede modificar adicionalmente. Por lo tanto, en una realización adicional el procedimiento de la presente invención comprende una cualquiera de la etapa o etapas de producir un anticuerpo quimérico, anticuerpo murinizado, anticuerpo monocatenario, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo etiquetado o un análogo de cualquiera de estos. Los procedimientos correspondientes son conocidos para los expertos en la técnica y se describen, *p. ej.*, en Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Cuando los derivados de dichos anticuerpos se obtienen mediante la técnica de expresión en fagos, se puede usar la resonancia de plasmón superficial, como se emplea en el sistema BIAcore, para aumentar la eficacia de los anticuerpos en fagos que se unen al mismo epítipo que el de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO89/09622. Los procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados se describen en, *p. ej.*, la solicitud europea EP-A1 0 239 400 y en la solicitud internacional WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos a utilizar de acuerdo con la presente invención son los anticuerpos denominados xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos de tipo humano en ratones, se describe en, *p. ej.*, las solicitudes internacionales WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 y WO 96/33735. Como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en una diversidad de formas además de anticuerpos completos; incluyendo, *p. ej.*, Fv, Fab y F(ab)₂, así como en cadenas sencillas; tales como scFvs; véase, *p. ej.*, la solicitud internacional WO88/09344.
- 60 Los anticuerpos de la presente invención o su cadena o cadenas de inmunoglobulina correspondientes se pueden

modificar adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando una o más eliminaciones, inserciones, sustituciones, adiciones y/o recombinaciones de aminoácidos, y/o cualesquiera otras modificaciones conocidas en la técnica en solitario o combinadas. Los procedimientos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son muy conocidos para el experto en la técnica; véase, *p. ej.*, Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constitutivos, incluyendo modificaciones de cadena lateral, modificaciones de esqueleto, y modificaciones en el extremo N y C-terminal, incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación, y la unión de restos carbohidrato o lípido, cofactores, y similares. Asimismo, la presente invención incluye la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo amino fusionado a la molécula heteróloga, tal como un ligando inmunoestimulador en el extremo carboxilo; véase, *p. ej.*, la solicitud internacional, WO00/30680 para los detalles técnicos correspondientes.

15 Por lo tanto, la presente invención se refiere a cualquier molécula de unión, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que, tal y como se caracteriza en las reivindicaciones, está orientado hacia los anticuerpos anti- α -sinucleína humanos de la presente invención y presentan las propiedades mencionadas, es decir, que reconocen específicamente α -sinucleína. Dichos anticuerpos y moléculas de unión se pueden someter a ensayo para determinar su especificidad y afinidad de unión mediante ELISA y Western Blot e inmunohistoquímica, como se describe en el presente documento, véanse, *p. ej.*, los Ejemplos. Asimismo, los resultados preliminares de experimentos posteriores realizados de acuerdo con la presente invención mostraron que el anticuerpo anti- α -sinucleína humano de la presente invención, en particular el anticuerpo NI-202.21D11, reconoce cuerpos de inclusión de α -sinucleína presentes en secciones del cerebro humano de pacientes que padecieron demencia con 20 cuerpos de Lewy (DCL) o enfermedad de Parkinson (EP). Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el anticuerpo humano o fragmento, derivado o variante de unión del mismo reconoce α -sinucleína en secciones de cerebro humano con DCL o EP (véase, *p. ej.*, Fig. 4c).

Los linfocitos B inmortalizados o linfocitos B de memoria se pueden usar como una fuente de loci de cadena pesada y cadena ligera reorganizados para expresión posterior y/o la manipulación genética. Los genes de anticuerpo reorganizados se pueden transcribir de maneja inversa a partir de ARNm apropiados para producir ADNc. Si se desea, la región constante de cadena pesada se puede intercambiar por la de un isotipo diferente o se puede eliminar en su totalidad. Las secuencias de nucleótidos se pueden modificar para eliminar motivos no deseados (tales como sitios de *splicing* o sitios de restricción), y el uso de codones se puede optimizar para la célula en la cual se ha de expresar el anticuerpo o fragmento del mismo. Asimismo, se pueden formar una o más mutaciones que alteran aminoácidos en las regiones variables, *p. ej.*, para aumentar la afinidad o mejorar la estabilidad. Las regiones variables se pueden unir para codificar regiones Fv monocatenarias. Se pueden unir múltiples regiones Fv para conferir capacidad de unión a más de una diana o se pueden emplear combinaciones de cadena pesada y ligera quiméricas. Una vez que se encuentra disponible el material genético, el diseño de análogos como se ha descrito anteriormente que conserven ambos su capacidad para unirse a la diana deseada es sencillo. Los procedimientos para clonar las regiones variables del anticuerpo y la generación de anticuerpos recombinantes son conocidos para el experto en la técnica y se describen, *p. ej.*, en Gilliland *y col.*, *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke *y col.*, *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

45 Una vez que se obtiene el material genético apropiado, y si se desea, se modifica para codificar un análogo, las secuencias codificantes, incluidas las que codifican, en un mínimo, las regiones variables de cadena pesada y ligera, se pueden insertar en sistemas de expresión contenidos en vectores que se pueden transfectar en células huésped recombinantes estándar. Se pueden utilizar varias de dichas células huésped para un procesamiento eficaz. Las líneas celulares de mamífero típicas útiles para este fin incluyen, sin limitación, células CHO, células HEK 293 o 50 células NSO.

La producción del anticuerpo o análogo se asume entonces mediante el cultivo del huésped recombinante modificado en condiciones de cultivo apropiadas para el crecimiento de las células huésped y la expresión de las secuencias codificantes. Después, se recuperan los anticuerpos mediante su aislamiento del cultivo. Los sistemas de expresión se pueden diseñar para incluir péptidos señal de manera que los anticuerpos resultantes se segreguen en el medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

De acuerdo con lo antedicho, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica el anticuerpo o regiones variables de cadena pesada o cadena ligera o variantes correspondientes, de una cadena de 60 inmunoglobulina de los anticuerpos anti- α -sinucleína descritos anteriormente.

El experto en la técnica sabe que la afinidad de unión se puede potenciar haciendo sustituciones de aminoácidos dentro de las CDR o dentro de los bucles hipervariables (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) que se solapan parcialmente con las CDR como se define por Kabat; véase, p. ej., Riechmann, y col, Nature 332 (1988), 323-327. Las moléculas de unión, p. ej., anticuerpos o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención, como las conocen los expertos en la técnica, pueden comprender una región constante que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante del anticuerpo puede activar el sistema de complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de patógenos celulares. La activación del complemento estimula también la respuesta inflamatoria y puede estar implicada también en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a receptores en diversas células mediante la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Existen varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc sobre las superficies celulares desencadena una cantidad de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la inmersión y destrucción de partículas recubiertas por anticuerpos, depuración de complejos inmunes, lisis de células diana recubiertas por anticuerpos mediante células asesinas (denominado citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, o ADCC, por su sigla en inglés), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia de placenta y control de producción de inmunoglobulina.

Por consiguiente, ciertas realizaciones de la presente invención incluyen un anticuerpo, o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo, donde al menos una fracción de uno o más dominios de regiones constantes se ha eliminado o alterado de otro modo para proporcionar las características bioquímicas deseadas, tales como funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerizar de forma no covalente, la capacidad aumentada de ubicar en el sitio de agregación y deposición de α -sinucleína, una semivida sérica reducida, o una semivida sérica aumentada en comparación con un anticuerpo sin alteración completo de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento son anticuerpos con dominios eliminados que comprenden una cadena de polipéptidos similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se eliminará todo o parte del dominio CH2. En otras realizaciones, ciertos anticuerpos para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento tienen una región constante, p. ej., una región constante de cadena pesada de IgG, que se altera para eliminar glucosilación, denominados en otras partes de la presente anticuerpos «agluco-silados» o «agly». Dichos anticuerpos «agly» se pueden preparar enzimáticamente, así como modificando el uno o más sitios de glucosilación de consenso en la región constante. Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que los anticuerpos «agly» pueden tener un perfil de seguridad y estabilidad mejorado *in vivo*. Los procedimientos para producir anticuerpos agluco-silados, que tienen la función efectora deseada se encuentran, por ejemplo, en la solicitud internacional WO2005/018572.

En ciertos anticuerpos o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos descritos en el presente documento, la porción Fc se puede mutar para disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor Fc del anticuerpo modificado circulante, aumentando así la localización de α -sinucleína. En otros casos, las modificaciones de región constante conformes a la presente invención moderan la unión al complemento y, por lo tanto, reducen la semivida sérica y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Aun otras modificaciones de la región constante se pueden usar para modificar enlaces de disulfuro o restos oligosacáridos que permiten la localización potenciada gracias al aumento de la especificidad del antígeno o a la flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tales como localización de α -sinucleína, biodistribución y semivida sérica, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación indebida.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos descritos en el presente documento, la porción Fc se puede mutar o intercambiar por secuencias de proteína alternativas para aumentar la absorción celular de anticuerpos a modo de ejemplo potenciando la endocitosis mediada por receptores de anticuerpos a través de los receptores Fc γ , LRP, o receptores Thy1 o mediante «Tecnología del superanticuerpo», que se dice permite que los anticuerpos se trasladen a células vivas sin dañarlas (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Por ejemplo, la generación de proteínas de fusión de la región de unión al anticuerpo y los ligandos de proteínas cognados de los receptores de superficie celular o anticuerpos bi o multispecíficos con

una secuencia específica que se une a α -sinucleína, así como un receptor de superficie celular, se puede modificar usando técnicas conocidas en la técnica.

En determinados anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos descritos en el presente documento, la porción Fc se puede mutar o intercambiar por las secuencias de proteína alternativas o el anticuerpo se puede modificar químicamente para aumentar su penetración de barrera hematoencefálica.

Las formas modificadas de anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención se pueden realizar a partir de anticuerpos precursores o parentales completos usando técnicas conocidas en la técnica. Las técnicas ejemplares se analizan en más detalle en el presente documento. Los anticuerpos, o fragmentos, variantes, derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención se pueden realizar o fabricar usando técnicas que se conocen en la técnica. En ciertas realizaciones, las moléculas de anticuerpo o fragmentos de las mismas se «producen de forma recombinante», es decir, se producen usando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas ejemplares para realizar moléculas de anticuerpo o fragmentos de las mismas se analizan en más detalle en otras partes del presente documento.

Los anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención también incluyen derivados que se modifican, *p. ej.*, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de tal forma que la unión covalente no evite que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo cognado. Por ejemplo, pero sin carácter restrictivo, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado, *p. ej.*, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Se pueden realizar cualquiera de una cantidad de modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención no provocarán una respuesta inmunitaria perjudicial en el animal a tratar, *p. ej.*, en un ser humano. En ciertas realizaciones, las moléculas de unión, *p. ej.*, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención, se derivan de un paciente, *p. ej.*, un paciente humano, y se usan posteriormente en las mismas especies de las que se derivan, *p. ej.*, humanos, aliviando o minimizando la aparición de respuestas inmunitarias perjudiciales.

La desinmunización se puede utilizar también para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término «desinmunización» incluye la alteración de un anticuerpo para modificar epítipos de linfocitos T; véanse, *p. ej.*, las solicitudes internacionales WO98/52976 y WO00/34317. Por ejemplo, se analizan las secuencias VH y VL del anticuerpo de partida y un «mapa» del epítipo de linfocitos T humanos de cada región V que muestra la ubicación de los epítipos en relación con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Se analizan los epítipos de linfocitos T individuales del mapa de epítipos de linfocitos T para identificar las sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña un intervalo de secuencias de VH y VL alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en un intervalo de polipéptidos de unión, *p. ej.*, anticuerpos específicos de α -sinucleína o fragmentos inmuno-específicos de los mismos para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en la presente, que a continuación se analizan para determinar su función. Normalmente, se generan y se ensayan entre 12 y 24 variantes de anticuerpos. Posteriormente, se clonan genes completos de cadena pesada y ligera que comprenden regiones modificadas V y humanas C en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpos completos. Después, los anticuerpos se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes, y de expresión en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridomas, incluyendo las conocidas en la técnica y descritas, por ejemplo, en Harlow y *col.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling y *col.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). El término «anticuerpo monoclonal», como se usa en el presente documento, no se limita a los anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridomas. El término «anticuerpo monoclonal» se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fagos, y no al procedimiento mediante el cual se produce. Por lo tanto, el término «anticuerpo monoclonal» no se limita a los anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridomas. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de

la presente invención se derivan de linfocitos B humanos que se han inmortalizado a través de transformación con virus Epstein-Barr, como se describe en el presente documento.

En el proceso de hibridomas bien conocido (Kohler y col., Nature 256 (1975), 495), los linfocitos de vida relativamente corta o mortales de un mamífero, p. ej., linfocitos B derivados de un sujeto humano como se describe en el presente documento, se fusionan con una línea celular de tumor inmortal (p. ej., una línea celular de mieloma), produciendo de este modo células híbridas o «hibridomas» que son tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo codificado genéticamente del linfocito B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas sencillas por selección, dilución y recrecimiento con cada cepa individual que comprende genes específicos para la formación de un anticuerpo individual. Producen anticuerpos que son homogéneos contra un antígeno deseado y, con referencia a su parentesco genético puro, se denominan «monoclonales».

Las células de hibridomas preparadas de esta manera se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que puede contener una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Los expertos en la técnica apreciarán que los reactivos, las líneas celulares y los medios para la formación, selección y el crecimiento de hibridomas están disponibles comercialmente a partir de una cantidad de fuentes y se establecen protocolos estándar. Generalmente, el medio de cultivo donde están creciendo las células de hibridomas se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno deseado. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridomas se determina por ensayos *in vitro*, tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) como se describe en el presente documento. Después de que se identifican las células de hibridomas que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitantes y cultivar mediante los procedimientos estándar; véase, p. ej., Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pág. 59-103 (1986). Adicionalmente se apreciará que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína A, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En otra realización, los linfocitos se pueden seleccionar por micromanipulación y los genes variables se aíslan. Por ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica se pueden aislar a partir de un mamífero inmunizado o naturalmente inmune, p. ej., un ser humano, y cultivar durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos se pueden cribar para las IgG específicas que cumplan con los criterios de cribado. Las células de pocillos positivos se pueden aislar. Los linfocitos B productores de Ig individuales se pueden aislar por FACS o identificándolos en un ensayo de placa hemolítica mediada por complemento. Los linfocitos B que producen Ig se pueden micromanipular en un tubo y los genes VH y VL se pueden amplificar utilizando, p. ej., RT-PCR. Los genes VH y VL pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpos y transfectarse en células (p. ej., células eucariotas o procariotas) para su expresión.

Como alternativa, las líneas celulares que producen anticuerpos pueden seleccionarse y cultivarse utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la práctica. Dichas técnicas se describen en una diversidad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. A este respecto, las técnicas adecuadas para su uso en la invención como se describe a continuación se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan y col., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York (1991).

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ se pueden producir de forma recombinante o mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas, tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Dichos fragmentos son suficientes para su uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que implican acoplar las porciones inmunoespecíficas de inmunoglobulinas a reactivos de detección tales como radioisótopos.

Los anticuerpos completamente humanos, como se describen en el presente documento, se desean particularmente para tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos de la presente invención se aíslan, p. ej., de sujetos humanos de edad avanzada quienes dada su edad, se sospecha que corren el riesgo de desarrollar un trastorno, p. ej., enfermedad de Parkinson, o de un paciente con el trastorno pero con un transcurso de la enfermedad inusualmente estable. Sin embargo, aunque es prudente esperar que los sujetos de edad avanzada, sanos y sin síntomas, respectivamente, hayan desarrollado anticuerpos anti- α -sinucleína protectores más regularmente que los sujetos más jóvenes, estos últimos se pueden usar como fuente para obtener un anticuerpo

humano de la presente invención. Esto es particularmente cierto para los pacientes más jóvenes que tienen predisposición para desarrollar una forma familiar de una enfermedad sinucleinopática, pero que permanecen sin síntomas dado que su sistema inmunitario y respuesta inmunitaria funcionan más eficientemente que en los adultos mayores.

5

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinante como se describe en el presente documento.

10 En una realización, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una región constante sintética donde uno o más dominios se eliminan parcial o completamente («anticuerpos con dominios eliminados»). En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán constructos con dominios eliminados o variantes donde el dominio CH2 entero se ha eliminado (constructos Δ CH2). Para otras realizaciones, un péptido conector corto puede sustituir el dominio eliminado para
15 proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento a la región variable. Los constructos con dominios eliminados pueden derivarse usando un vector que codifica un dominio constante humano de IgG₁, véanse, *p. ej.*, las solicitudes internacionales WO02/060955 y WO02/096948A2. Este vector está modificado para eliminar el dominio CH2 y para proporcionar un vector sintético que exprese una región constante de IgG₁ con dominio eliminado.

20 En ciertas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la presente invención son minicuerpos. Los minicuerpos se pueden realizar utilizando procedimientos descritos en la técnica, véanse, *p. ej.*, la patente de EE. UU. N.º 5.837.821 o la solicitud internacional WO 94/09817.

En una realización, un anticuerpo, o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo de la invención
25 comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene eliminación o sustitución de algunos o incluso un único aminoácido siempre y cuando permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente como para reducir sustancialmente la unión de Fc y aumentar de este modo la ubicación de α -sinucleína. De manera similar, se pueden eliminar uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (*p. ej.*, unión al complemento).
30 Dichas eliminaciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar características seleccionadas del anticuerpo (semivida sérica) mientras dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante objeto. Además, como se ha mencionado anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que mejoran el perfil del constructo resultante. En este sentido, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada
35 por un sitio de unión conservado (*p. ej.*, unión de Fc) mientras se mantienen de manera sustancial la configuración y el perfil inmunógeno del anticuerpo modificado. Incluso otras realizaciones comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar las características deseables, tales como la función efectora, o proporcionar más unión de citotoxinas o carbohidratos. En dichas realizaciones, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

40

La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden, están compuestos esencialmente por, o están compuestos por variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (*p. ej.*, las regiones VH y/o las regiones VL) descritas en el presente documento, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen de manera inmunoespecífica a α -sinucleína. Las técnicas estándar conocidas para los expertos en la técnica se pueden
45 utilizar para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, incluyendo, sin carácter restrictivo, mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR, las cuales dan como resultado sustituciones de aminoácidos. Las variantes (incluyendo derivados) pueden codificar menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de
50 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto de la región VH de referencia. Una «sustitución de aminoácido conservadora» es aquella donde el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares han sido definidas en la técnica. Estas
55 familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*p. ej.*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*p. ej.*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (*p. ej.*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (*p. ej.*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (*p. ej.*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*p. ej.*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, se
60 pueden introducir mutaciones de forma aleatoria a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante, tal

como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes se pueden cribar para determinar actividad biológica con el fin de identificar mutantes que retienen actividad (*p. ej.*, la capacidad de unirse a α -sinucleína).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones únicamente en regiones de marco de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones sin sentido silenciosas o neutras, *p. ej.*, no tienen efecto o tienen poco efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno, de hecho algunas de estas mutaciones no alteran la secuencia de aminoácidos en absoluto. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones, o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Las regiones codificantes optimizadas por codones que codifican anticuerpos de la presente invención se describen en otras partes del presente documento.

Como alternativa, las mutaciones sin sentido no neutras pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Es probable que la ubicación de la mayoría de las mutaciones sin sentido silenciosas y neutras sea en las regiones marco, mientras que es probable que la ubicación de la mayoría de las mutaciones sin sentido no neutras sea en CDR, si bien esto no constituye un requisito absoluto. Un experto en la técnica sería capaz de diseñar y analizar moléculas mutantes con propiedades deseadas tal como actividad de unión al antígeno sin alteración, o alteración en la actividad de unión (*p. ej.*, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma rutinaria y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (*p. ej.*, capacidad de unirse inmunoespecíficamente a al menos un epítipo de α -sinucleína) se puede determinar usando técnicas descritas en el presente documento o mediante técnicas de modificación rutinaria conocidas en la técnica.

20

III. Polinucleótidos que codifican anticuerpos

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo puede estar compuesto por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo puede estar compuesto por ADN monocatenario o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más normalmente, bicatenarios, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo, puede estar compuesto por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo también puede contener una o más bases modificadas o esqueletos de ADN o ARN modificados para determinar la estabilidad o por otras razones. Las bases «modificadas» incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se puede hacer una diversidad de modificaciones a ADN y ARN; por lo tanto, «polinucleótido» incluye formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

Un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido que proviene de una inmunoglobulina (*p. ej.*, una porción de cadena pesada o una porción de cadena ligera de inmunoglobulina) se puede crear introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de tal forma que una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos se introduzcan en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas estándar, tales como la mutagénesis dirigida a sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales.

45

Como es bien sabido, el ARN se puede aislar de los linfocitos B originales, células de hibridomas o de otras células transformadas por técnicas estándar, tales como extracción de isotiocianato de guanidinio y precipitación seguida de centrifugación o cromatografía. Cuando sea deseable, el ARNm se puede aislar del ARN total mediante técnicas estándar tal como cromatografía en oligo dT celulosa. Las técnicas adecuadas son conocidas en la técnica. En una realización, se pueden hacer ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, ya sea simultáneamente o por separado, utilizando transcriptasa inversa y ADN polimerasa de acuerdo con procedimientos muy conocidos. El análisis por PCR se puede iniciar por cebadores de región constante de consenso o por cebadores más específicos basados en el ADN de cadena pesada y ligera y las secuencias de aminoácidos publicados. Como se ha analizado anteriormente, el análisis por PCR también se puede usar para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de anticuerpos. En este caso es posible cribar los bancos mediante cebadores de consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de región constante humanas.

El ADN, normalmente ADN plasmídico, se puede aislar de las células usando técnicas conocidas en la técnica, se puede mapear por restricción y secuenciarse de acuerdo con técnicas estándar, bien conocidas, expuestas en detalle, *p. ej.*, en las referencias anteriores con respecto a las técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN

60

puede ser sintético de acuerdo con la presente invención en cualquier punto durante el proceso de aislamiento o el análisis posterior.

5 Una realización proporciona un polinucleótido aislado que comprende, está compuesto esencialmente por, o está compuesto por un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a las SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:20.

Otra realización proporciona un polinucleótido aislado que comprende, está compuesto esencialmente por, o está compuesto por un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de VH idéntica a, o idéntica a
10 excepción de una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos respecto de las SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:20.

En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, está compuesto esencialmente por, o está compuesto por un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (VH)
15 de inmunoglobulina en la cual las regiones VH-CDR1, VH-CDR2, y VH-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos VH-CDR1, VH-CDR2, y VH-CDR3 representados por las SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, y SEQ ID NO:18, respectivamente, como se muestra en la Fig. 1.

Una realización adicional proporciona una molécula de unión aislada, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al
20 antígeno que comprende la VH codificada por el polinucleótido que se une específica o preferentemente a α -sinucleína humana.

Otra realización proporciona un polinucleótido aislado que comprende, está compuesto esencialmente por, o está compuesto por un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera
25 (VL) de inmunoglobulina al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a las SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:26.

Una realización adicional proporciona un polinucleótido aislado que comprende, está compuesto esencialmente por, o está compuesto por un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de VL idéntica a, o idéntica a
30 excepción de una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos respecto de las SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:26.

En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, está compuesto esencialmente por, o está compuesto por un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera (VL)
35 de inmunoglobulina en la cual las regiones VL-CDR1, VL-CDR2, y VL-CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos VH-CDR1, VH-CDR2, y VH-CDR3 representados por las SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, y SEQ ID NO:18, respectivamente, como se muestra en la Fig. 1.

Una realización adicional proporciona una molécula de unión aislada, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al
40 antígeno que comprende la VL codificada por el polinucleótido que se une específica o preferentemente a α -sinucleína humana.

Como es sabido en la técnica, «identidad de secuencia» entre dos polipéptidos o dos polinucleótidos se determina por la comparación de la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de un polipéptido o polinucleótido con la secuencia de un segundo polipéptido o polinucleótido. De acuerdo con lo que se explica en el presente documento,
45 que un polipéptido particular sea al menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntico a otro polipéptido se puede determinar utilizando procedimientos y programas/software informáticos conocidos en la técnica tales como, sin carácter restrictivo, el programa BESTFIT (Paquete de análisis de secuencias Wisconsin, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in
50 Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95 % idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se ajustan, por supuesto, de tal forma que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia polipeptídica de referencia y que se permitan los huecos en la homología de hasta 5 % del
55 número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

En una realización de la presente invención, el polinucleótido comprende, está compuesto esencialmente por o está compuesto por un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos de la VH expresada en la SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO:21, o la VL expresada en la SEQ ID NO:27 o SEQ ID NO:28. En este sentido, el
60 experto en la técnica comprenderá fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de

la cadena ligera y/o pesada pueden codificar el dominio variable de ambas cadenas de inmunoglobulina o solo de una.

La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en otras partes del presente documento. Adicionalmente, los polinucleótidos que codifican los polinucleótidos de fusión, fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en el presente documento, también se contemplan en la invención.

Los polinucleótidos se pueden producir o fabricar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados, *p. ej.*, como se describe en Kutmeier y *col.*, *BioTechniques* 17 (1994), 242, que brevemente implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la reasociación y ligación de esos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo se puede generar de ácido nucleico a partir de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero la secuencia de la molécula del anticuerpo es conocida, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede sintetizarse químicamente u obtenerse a partir de una fuente adecuada (*p. ej.*, un banco de ADNc de anticuerpo, o un banco de ADNc generado a partir de, o ácido nucleico, tal como ARN poliA⁺, aislado de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo específico de α -sinucleína, tales como células de hibridomas seleccionadas para expresar un anticuerpo) por amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridarse en los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia génica particular para identificar, *p. ej.*, un clon de ADNc a partir de un banco de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR se pueden clonar a continuación en vectores de clonación replicables utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos o la correspondiente secuencia de aminoácidos del anticuerpo, o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo, su secuencia de nucleótidos se puede manipular utilizando procedimientos conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, *p. ej.*, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y *col.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) y Ausubel y *col.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), para generar anticuerpos que tienen diferentes secuencias de aminoácidos, por ejemplo, para crear sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos.

IV. Expresión de polipéptidos de anticuerpo

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos se insertan normalmente en un vector de expresión para la introducción en células huésped que se pueden usar para producir la cantidad deseada de anticuerpo. La expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo del mismo, *p. ej.*, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula diana se describe en el presente documento. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o porción del mismo (*p. ej.*, que contiene el dominio variable de cadena pesada o ligera) de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo se puede producir por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, los procedimientos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica la secuencia de nucleótidos se describen en el presente documento. Se pueden utilizar procedimientos que son muy conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por lo tanto, la invención proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unidos operativamente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, *p. ej.*, las solicitudes internacionales WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente de EE. UU. N.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en uno de estos vectores para la expresión de toda la cadena pesada o ligera.

60

El término «vector» o «vector de expresión» se usa en el presente documento para hacer referencia a vectores usados de acuerdo con la presente invención como un vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula huésped. Como saben los expertos en la técnica, dichos vectores se pueden seleccionar fácilmente a partir del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción adecuados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas. A los efectos de esta invención, se pueden emplear numerosos sistemas de vector de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se derivan de virus animales, tales como virus de papiloma bovino, virus de poliovirus, adenovirus, virus vacuna, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión a ribosomas internos. Adicionalmente, las células que tienen el ADN integrado en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un huésped auxotrófico, resistencia a biocidas (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados, tales como cobre. El gen marcador seleccionable puede estar unido directamente a las secuencias de ADN que se han de expresar, o introducirse en la misma célula por cotransformación. También se pueden añadir elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, secuencias de *splicing*, así como promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación.

En ciertas realizaciones, los genes de región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de región constante de cadena pesada y ligera (p. ej., humanos) como se ha explicado anteriormente. En una realización, esto se realiza usando un vector de expresión patentado de Biogen IDEC, Inc., denominado NEOSPLA, descrito en la patente de EE. UU. N.º 6.159.730. Este vector contiene el promotor/potenciador de citomegalovirus, el promotor principal de beta globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, exón 1 y exón 2 de fosfotransferasa de neomicina, el gen dihidrofolato reductasa y la secuencia líder. Se ha descubierto que este vector produce un nivel muy alto de expresión de anticuerpos tras la incorporación de genes de región variable y constante, la transfección en células CHO, seguida de la selección en medio que contiene G418 y la amplificación de metotrexato. Por supuesto, en la presente invención se puede usar cualquier vector de expresión que sea capaz de provocar expresión en células eucariotas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero sin limitación, los plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, y pZeoSV2 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA), y el plásmido pCI (disponible en Promega, Madison, WI). En general, el cribado de grandes cantidades de células transformadas para aquellas que expresan niveles adecuadamente elevados si las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina es un experimento de rutina que se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante sistemas robóticos. Los sistemas de vector también se explican en las patentes de EE. UU. N.º 5.736.137 y 5.658.570. Este sistema proporciona altos niveles de expresión, p. ej., >30 pg/célula/día. Otros sistemas de vector ejemplares se describen, p. ej., en la patente de EE. UU. N.º 6.413.777.

En otras realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención se pueden expresar usando constructos policistrónicos tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2003-0157641 A1. En estos sistemas de expresión, los productos génicos múltiples de interés tales como las cadenas pesada y ligera de anticuerpos se pueden producir a partir de un constructo policistrónico sencillo. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos. Las secuencias IRES compatibles se describen en la patente de EE. UU. N.º 6.193.980. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos sistemas de expresión se pueden usar para producir eficazmente el intervalo completo de anticuerpos descritos en la presente solicitud.

Más generalmente, una vez que se ha preparado el vector o secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo, el vector de expresión se puede introducir en una célula huésped apropiada. La introducción del plásmido en la célula huésped se puede lograr por diversas técnicas ya conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, pero sin limitación, transfección, incluyendo lipotransfección usando, p. ej., Fugene o lipofectamina, fusión protoplásmica, precipitación de fosfato de calcio, fusión celular con ADN con envoltura, microinyección e infección con virus intacto. Normalmente, la introducción de plásmidos en el huésped es mediante un procedimiento de co-precipitación de fosfato de calcio estándar. Las células huésped que alojan el constructo de expresión se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se analizan para síntesis de proteína de cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo ejemplares incluyen ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o análisis de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas posteriormente se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para uso en

los procedimientos descritos en el presente documento. Por lo tanto, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, unido operativamente a un promotor heterólogo. Para la expresión de anticuerpos bicatenarios, los vectores que codifican las cadenas tanto pesada como ligera se pueden insertar en una célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

La célula huésped se puede cotransfectar con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, se puede usar un único vector que codifique polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera se coloca ventajosamente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica; véase Proudfoot, *Nature* 322 (1986), 52; Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 2197. Las secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Como se usa en el presente documento, «células huésped» se refiere a células que alojan vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procesos para el aislamiento de anticuerpos de huéspedes recombinantes, los términos «célula» y «cultivo celular» se usan de manera intercambiable para denominar la fuente de anticuerpo a menos que se especifique claramente otra cosa. En otras palabras, la recuperación de polipéptidos de las «células» puede significar a partir de células enteras centrifugadas, o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

Se puede utilizar una diversidad de sistemas de vectores de expresión de huésped para expresar moléculas de anticuerpo para uso en los procedimientos descritos en el presente documento. Dichos sistemas de expresión de huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés se pueden producir y posteriormente purificar, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos adecuadas, expresan una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estas incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (*p. ej.*, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cósmido que contiene secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (*p. ej.*, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas celulares de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (*p. ej.*, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (*p. ej.*, virus de mosaico de la coliflor, CaMV; virus de mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (*p. ej.*, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; o sistemas celulares de mamíferos (*p. ej.*, células COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3) que alojan constructos de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (*p. ej.*, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (*p. ej.*, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7,5K del virus vacuna). Las células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o células eucariotas, especialmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante completa, se utilizan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento del promotor génico temprano intermedio principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para los anticuerpos; véase, *p. ej.*, Foecking y *col.*, *Gene* 45 (1986), 101; Cockett y *col.*, *Bio/Technology* 8 (1990), 2.

La línea celular huésped usada para la expresión de proteína es a menudo de origen mamífero; los expertos en la técnica tienen la capacidad de determinar líneas celulares huésped particulares que son más adecuadas para el producto génico deseado a expresar en el mismo. Las líneas celulares huésped incluyen, pero sin limitación, CHO (ovario de hámster chino), DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CV1 (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CV1 con antígeno SV40 T), VERY, BHK (riñón de hámster bebé), MDCK, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Las líneas celulares huésped normalmente se encuentran disponibles en servicios comerciales, la Colección Estadounidense de Cultivos de Tejidos o en la bibliografía publicada.

Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (*p. ej.*, glucosilación) y procesamiento (*p. ej.*, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraducciona

la modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, se pueden usar células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, la glucosilación, y la fosforilación del producto génico.

5

Para una producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se utiliza una expresión estable. Por ejemplo, se pueden modificar por ingeniería genética líneas celulares que expresan de forma estable la molécula del anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (*p. ej.*, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, se deja que células modificadas por ingeniería genética crezcan durante, *p. ej.*, entre 1 y 2 días en un medio enriquecido, y a continuación se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y que crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este procedimiento se puede utilizar de forma ventajosa para modificar líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo de manera estable.

Se pueden usar varios sistemas de selección, que incluyen, pero sin limitación, la timidina cinasa del virus herpes simple (Wigler *y col.*, *Cell* 11 (1977), 223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48 (1992), 202), y pueden emplearse genes de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *y col.*, *Cell* 22 (1980), 817) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, la resistencia anti-metabolito se puede usar como la base de selección de los siguientes genes: dhfr que otorga resistencia al metotrexato (Wigler *y col.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 357; O'Hare *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 1527); gpt, que otorga resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 2072); neo, que otorga resistencia al aminoglucósido G-418 Goldspiel *y col.*, *Clinical Pharmacy* 12 (1993), 488-505; Wu *y Wu*, *Biotherapy* 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 (1993), 573-596; Mulligan, *Science* 260 (1993), 926-932; y Morgan *y Anderson*, *Ann. Rev. Biochem.* 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *y col.*, *Gene* 30 (1984), 147. Los procedimientos comúnmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar se describen en Ausubel *y col.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieglner, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli *y col.* (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *y col.*, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden aumentar por amplificación de vectores, para una revisión, véase Bebbington *y Hentschel*, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Academic Press, Nueva York, Vol. 3. (1987). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa un anticuerpo es amplificable, el incremento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de célula huésped hará que aumente el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada al gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo; véase Crouse *y col.*, *Mol. Cell. Biol.* 3 (1983), 257.

La producción *in vitro* permite que el aumento de grandes cantidades proporcione los polipéptidos deseados. En la técnica se conocen técnicas de cultivo de células de mamíferos en condiciones de cultivo de tejidos, y estas incluyen el cultivo de suspensiones homogéneas, *p. ej.*, en un reactor aerotransportado o en un reactor de agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, *p. ej.*, en fibras huecas, microcápsulas, en microperlas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si es necesario y/o deseable, las disoluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante procedimientos de cromatografía habituales, por ejemplo, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en DEAE-celulosa o cromatografía de inmunoafinidad, *p. ej.*, después de biosíntesis preferente de un polipéptido de región bisagra sintético o antes o después de la etapa de cromatografía HIC descrita en el presente documento.

Los genes que codifican anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención también se pueden expresar en células no de mamíferos tales como células de bacterias, insectos, levaduras o vegetales. Las bacterias que absorben fácilmente los ácidos nucleicos incluyen miembros de enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tal como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará además que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos normalmente se vuelven parte de los cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos se deben aislar, purificar y después ensamblar en moléculas funcionales. Cuando se deseen formas tetravalentes de anticuerpos, las subunidades se autoensamblarán en anticuerpos tetravalentes, véase, *p. ej.*, la solicitud internacional WO02/096948.

En los sistemas bacterianos, varios vectores de expresión se pueden seleccionar ventajosamente dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se debe producir una gran cantidad de tal proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, se pueden usar vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., EMBO J. 2 (1983), 1791), donde la secuencia codificante de anticuerpo se puede ligar individualmente dentro del vector en el marco con la región codificante lacZ de manera que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de microesferas de glutatión agarosa seguida de una elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión por la trombina o la proteasa factor Xa de manera que el producto génico diana clonado se pueda liberar del resto de GST.

Además de los procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadería común, es la más comúnmente usada entre microorganismos eucariotas, si bien hay varias otras cepas comúnmente disponibles, p. ej., *Pichia pastoris*. Para la expresión en *Saccharomyces*, comúnmente se usa el YRp7 plasmídico, por ejemplo, (Stinchcomb y col., Nature 282 (1979), 39; Kingsman y col., Gene 7 (1979), 141; Tschemper y col., Gene 10 (1980), 157). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecimiento en triptófano, por ejemplo, ATCC N.º 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). La presencia de la lesión trp1 como una característica del genoma de célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insecto, el virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se usa normalmente como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y se puede situar bajo control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado de manera recombinante, los anticuerpos enteros, sus dímeros, cadenas pesada y ligera individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo, por ejemplo, por cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad a un antígeno específico después de la Proteína A, y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, p. ej., precipitación de sulfato de amonio, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas; véase, p. ej., Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Como alternativa, se describe un procedimiento para aumentar la afinidad de anticuerpos de la invención en la publicación de patente de EE. UU. 2002-0123057 A1.

V. Proteínas de fusión y conjugados

En algunas realizaciones, el polipéptido de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos normalmente no asociados con un anticuerpo. Las modificaciones ejemplares se describen con mayor detalle a continuación. Por ejemplo, en algunas realizaciones un fragmento de anticuerpo fv monocatenario de la invención puede comprender una secuencia enlazadora flexible, o se puede modificar para añadir un resto funcional (p. ej., PEG, un fármaco, una toxina o una etiqueta tal como fluorescente, radioactiva, enzima, magnética nuclear, metal pesado y similares).

En ciertas realizaciones, un polipéptido de anticuerpo de la invención comprende, está compuesto esencialmente por o está compuesto por una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas quiméricas que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a α -sinucleína de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión diana, y al menos una porción heteróloga, es decir, una porción con la cual no está naturalmente enlazado en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se juntan en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína pero están situadas en una nueva disposición en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión se pueden crear, por ejemplo, mediante síntesis química, o mediante la creación y traducción de un polinucleótido donde se codifican las regiones del péptido en la relación deseada.

60

El término «heterólogo» como se aplica a un polinucleótido o a un polipéptido significa que el polinucleótido o polipéptido se deriva de una entidad distinta de la del resto de la entidad con la que se compara. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, un «polipéptido heterólogo» que se ha de fusionar con un anticuerpo o un fragmento, variante o análogo de unión al antígeno del mismo se deriva de un polipéptido diferente de inmunoglobulina de la misma especie, o de un polipéptido de inmunoglobulina o diferente de inmunoglobulina de una especie diferente.

Como se analiza con mayor detalle en otras partes del presente documento, los anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención pueden fusionarse adicionalmente de forma recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo N o C-terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden fusionar de manera recombinante o conjugar con moléculas útiles como etiquetas en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas; véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624; patente de EE. UU. N.º 5.314.995; y la solicitud de patente europea EP 0 396 387.

Los anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por gen. Los anticuerpos se pueden modificar mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Dichas modificaciones se describen bien en textos básicos y en monografías más detalladas, así como también en extensa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden tener lugar en cualquier lugar del anticuerpo, incluyendo el esqueleto del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo, o en restos tales como carbohidratos. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en igual grado o distintos grados en diversos sitios de un anticuerpo dado. Además, un anticuerpo dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos se pueden ramificar, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y a continuación pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y ramificados y cíclicos pueden producirse en procesos naturales postraducionales o se pueden producir mediante procedimientos sintéticos. Las modificaciones pueden incluir acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfotidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace de disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación; véase, p. ej., *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York 2ª Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, pág. 1-12 (1983); Seiffter y col., *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan y col., *Ann. NY Acad. Sci.* 663 (1992), 48-62).

La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, o un fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo, y un polipéptido heterólogo. En una realización, la proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una región VH de un anticuerpo de la invención, y la secuencia de aminoácidos de al menos una región VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos, derivados o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptidos heterólogos. En algunas realizaciones, las regiones VH y VL de la proteína de fusión corresponden a un único anticuerpo fuente (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente a α -sinucleína. Incluso en otra realización, una proteína de fusión para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las tres CDR de VH de un anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de las tres CDR de VL de un anticuerpo, o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptidos heterólogos. En ciertas realizaciones, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las CDR-VH o CDR-VL corresponden a un único anticuerpo fuente (o fragmento scFv o Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también se incluyen en la invención.

Las proteínas de fusión ejemplares indicadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de linfocitos T (Gascoigne y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon y col., *Nature* 337 (1989), 525-531; Traunecker y col., *Nature* 339 (1989), 68-70; Zettmeissl y col., *DNA Cell Biol. USA* 9 (1990), 347-353; yByrn y col., *Nature* 344 (1990), 667-670); L-selectina (receptor de alojamiento) (Watson y col., *J. Cell. Biol.* 110 (1990), 2221-2229; yWatson y col., *Nature* 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo y col., *Cell* 61 (1990), 1303-1313); CD28 y B7 (Linsley y col., *J. Exp. Med.* 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley y col., *J. Exp. Med.* 174 (1991), 561-569); CD22

(Stamenkovic *y col.*, Cell 66 (1991), 1133-1144); receptor TNF (Ashkenazi *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer *y col.*, Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886; y Peppel *y col.*, J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991); y receptor IgE a (Ridgway y Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Resumen N.º 1.448) .

- 5 Como se explica en otras partes del presente documento, los anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención se pueden fusionar con polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para uso en inmunoensayos utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, PEG se puede conjugar con los anticuerpos de la invención para aumentar su semivida *in vivo*; véase, p. ej., Leong *y col.*, Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; 10 oWeir *y col.*, Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

Además, los anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención se pueden fusionar con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En ciertas realizaciones particulares, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina (HIS), tal 15 como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otras, muchas de las cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas de péptidos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, la etiqueta «HA», que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson *y col.*, Cell 37 20 (1984), 767) y la etiqueta «indicador».

Las proteínas de fusión se pueden preparar utilizando procedimientos que son muy conocidos en la técnica; véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.116.964 y 5.225.538. El sitio preciso donde se realiza la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar las características de unión o secreción de la proteína de fusión. El ADN 25 que codifica la proteína de fusión se transfecta después a una célula huésped para expresión.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en forma no conjugada o se pueden conjugar con al menos una de una diversidad de moléculas, *p. ej.*, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de dianas, o para diagnóstico por imagen o terapia del paciente. Los anticuerpos, o fragmentos, variantes, 30 o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención se pueden etiquetar o conjugar antes o después de la purificación, cuando se realiza la purificación. En particular, los anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención se pueden conjugar con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

35 Los conjugados que son inmunotoxinas que incluyen anticuerpos convencionales se han descrito ampliamente en la técnica. Las toxinas se pueden acoplar a los anticuerpos mediante técnicas de acoplamiento convencionales o se pueden producir inmunotoxinas que contienen porciones de toxina de proteínas como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar de manera correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Es ilustrativo de dichas inmunotoxinas lo descrito por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 y 40 porFanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

Los expertos en la técnica apreciarán que los conjugados también se pueden ensamblar usando una diversidad de técnicas dependiendo del agente seleccionado a conjugar. Por ejemplo, los conjugados con biotina se preparan, *p. ej.*, haciendo reaccionar un polipéptido de unión a α -sinucleína con un éster de biotina activado tal como el éster de 45 biotina N-hidroxisuccinimida. De manera similar, los conjugados con un marcador fluorescente se pueden preparar en presencia de un agente de acoplamiento, *p. ej.*, los enumerados en el presente documento, o mediante la reacción con un isotiocianato, tal como isotiocianato de fluoresceína. Los conjugados de los anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención se preparan de manera análoga.

50 La presente invención comprende además anticuerpos, o fragmentos, variantes o derivados de unión al antígeno de los mismos de la invención conjugados con un agente terapéutico o de diagnóstico. Los anticuerpos se pueden usar como diagnóstico para, por ejemplo, demostrar la presencia de una enfermedad neurológica, para indicar el riesgo de contraer una enfermedad neurológica, para controlar el desarrollo o evolución de una enfermedad neurológica, es 55 *decir*, una sinucleinopatía como parte de un procedimiento de pruebas clínicas para, *p. ej.*, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento y/o prevención dado. La detección se puede facilitar mediante el acoplamiento del anticuerpo, o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones 60 usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones de metales paramagnéticos no radioactivos; véase, *p.*

- ej., la patente de EE. UU. N.º 4.741.900 para iones de metales que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminescentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .
- 5
- 10 Un anticuerpo, o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo también se puede etiquetar de manera detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo etiquetado quimioluminiscente se determina entonces mediante la detección de la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcado quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de
- 15 oxalato.

Una de las maneras donde un anticuerpo, o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo se puede etiquetar de manera detectable es mediante el enlace del mismo a una enzima y el uso del producto enlazado en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller y col., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Ratón, Fla., (1980); Ishikawa, E. y col., (eds.), *Enzyme Immunoassay*, Kigaku Shoin, Tokio (1981). La enzima, que se une al anticuerpo reaccionará con un sustrato adecuado, tal como un sustrato cromogénico, de tal manera que produzca un resto químico que se puede detectar, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos

20

25 o visuales. Las enzimas que se pueden usar para etiquetar de manera detectable el anticuerpo incluyen, pero sin limitación, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, levadura alcohol deshidrogenasa, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. De manera adicional, la detección se puede llevar a

30

35 cabo mediante procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también se puede lograr mediante comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados de manera similar.

La detección también se puede lograr usando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, etiquetando de manera radioactiva el anticuerpo o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo, es posible detectar el anticuerpo mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, (marzo, 1986)). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios que incluyen, pero sin limitación, un contador gamma, un contador de centelleo o autoradiografía.

40

Un anticuerpo, o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo también se puede etiquetar de manera detectable usando metales emisores de fluorescencia tales como ^{152}Eu u otros de la serie lantánida. Estos metales se pueden unir al anticuerpo usando grupos quelantes de metales tales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

45

Las técnicas para conjugar diversos restos a un anticuerpo, o fragmento, variante o derivado de unión al antígeno del mismo se conocen bien, véase, p. ej., Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col. (eds.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson y col. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pág. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y col. (eds.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. (eds.), Academic Press pág. 303-16 (1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62 (1982), 119-158.

50

55

Como se menciona, en ciertas realizaciones, se puede conjugar un resto que potencia la estabilidad o eficacia de una molécula de unión, p. ej., un polipéptido de unión, p. ej., un anticuerpo o fragmento inmuno-específico del mismo. Por ejemplo, en una realización, PEG se puede conjugar con las moléculas de unión de la invención para aumentar su semivida *in vivo*. Leong y col., *Cytokine* 16 (2001), 106; *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54 (2002), 531; o Weir y col.,

60

Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

VI. Composiciones y procedimientos de uso

- 5 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden la molécula de unión a α -sinucleína antes mencionada, *p. ej.*, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención o derivado o variante del mismo, o el polinucleótido, vector o célula de la invención. La composición de la presente invención puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Asimismo, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes adicionales tales como interleucinas o
- 10 interferones dependiendo del uso buscado de la composición farmacéutica. Por ejemplo, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson el agente adicional se puede seleccionar de entre el grupo compuesto por moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti- α -sinucleína, y combinaciones correspondientes. Por lo tanto, en una realización la presente invención se refiere al uso de la molécula de unión a α -sinucleína, *p. ej.*, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención o de una molécula de unión que tiene
- 15 sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de los mismos, el polinucleótido, el vector o la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una enfermedad sinucleinopática o una respuesta a un tratamiento de una enfermedad sinucleinopática en un sujeto o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad sinucleinopática.
- 20 Por lo tanto, en una realización la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar un trastorno neurológico caracterizado por la acumulación anormal y/o deposición de α -sinucleína en el cerebro y el sistema nervioso central, respectivamente, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto que la necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión anti- α -sinucleína, anticuerpo, polinucleótido, vector o
- 25 célula de la presente invención. En ciertas realizaciones se administra NI-202.21D11 o un fragmento, variante o derivado del mismo. El término «trastorno neurológico» incluye, sin carácter restrictivo, enfermedades sinucleinopáticas tales como enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), y atrofia multisistémica (AM). A menos que se especifique otra cosa, los términos neurodegenerativo, neurológico o neuropsiquiátrico se usan de manera intercambiable en el presente documento.
- 30 Una ventaja particular del enfoque terapéutico de la presente invención reside en que los anticuerpos de la presente invención se derivan de linfocitos B o linfocitos B de memoria de sujetos humanos de edad avanzada sin signos de Parkinsonismo y, por lo tanto, son, con cierta probabilidad, capaces de prevenir una enfermedad sinucleinopática clínicamente manifiesta, o de disminuir el riesgo de la aparición de la enfermedad clínicamente manifiesta, o de
- 35 retrasar el inicio o evolución de la enfermedad clínicamente manifiesta. Normalmente, los anticuerpos de la presente invención también han pasado por maduración somática con éxito, *es decir*, la optimización con respecto a la selectividad y eficacia en la unión de alta afinidad a la molécula de α -sinucleína diana por medio de la variación somática de las regiones variables del anticuerpo.
- 40 El hecho de saber que dichas células *in vivo*, *p. ej.*, en un ser humano, no se han activado por medio de proteínas relacionadas u otras proteínas fisiológicas o estructuras celulares en términos de una reacción alérgica o autoinmunitaria es también de gran importancia médica ya que implica una posibilidad considerablemente aumentada de pasar las fases de pruebas clínicas satisfactoriamente. Por así decirlo, ya se han demostrado la eficiencia, aceptabilidad y tolerabilidad antes del desarrollo preclínico y clínico del anticuerpo profiláctico o
- 45 terapéutico en al menos un sujeto humano. Por lo tanto, se puede esperar que los anticuerpos anti- α -sinucleína humanos de la presente invención, tanto su eficiencia específica de la estructura diana como agente terapéutico como su probabilidad disminuida de efectos secundarios aumenten significativamente su probabilidad clínica de éxito.
- 50 La presente invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico y de diagnóstico, respectivamente, que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes descritos anteriormente, *p. ej.*, un anticuerpo anti- α -sinucleína, fragmento, variante o derivado de unión del mismo, polinucleótido, vector o célula de la presente invención. Dicho recipiente o recipientes puede venir acompañado por un aviso prescrito por un organismo gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho
- 55 aviso la aprobación por el organismo de la fabricación, el uso o la venta para administración en seres humanos. Además, o como alternativa, el kit comprende reactivos y/o instrucciones para su uso en ensayos de diagnóstico adecuados. La composición, *p. ej.*, el kit de la presente invención es por supuesto particularmente apropiada para evaluación de riesgos, diagnóstico, prevención y tratamiento de un trastorno que está acompañado por la presencia de α -sinucleína, y en particular aplicable para el tratamiento de enfermedad de Parkinson (EP), demencia con
- 60 cuerpos de Lewy (DCL) y atrofia multisistémica (AM).

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular de acuerdo con procedimientos muy conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) por the University of Sciences en Filadelfia, ISBN 0-683-306472. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos apropiados son muy conocidos en la técnica e incluyen disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de agua/aceite, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas se pueden efectuar de diferentes maneras, *p. ej.*, por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal, tópica o intradérmica o por administración espinal o cerebral. Las formulaciones en aerosol tales como formulaciones nasales de pulverización incluyen disoluciones acuosas purificadas u otras disoluciones del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Dichas formulaciones se pueden ajustar a un pH y estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales. Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio con un vehículo adecuado.

Además, si bien la presente invención incluye el procedimiento estándar actual (aunque afortunadamente no frecuente) de realizar un pequeño orificio en el cráneo para administrar un fármaco de la presente invención, en un aspecto, la molécula de unión, en especial el anticuerpo o fármaco basado en el anticuerpo de la presente invención, puede atravesar la barrera hematoencefálica, lo que permite la administración intravenosa u oral.

El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado y los factores clínicos. Como se conoce bien en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, edad, el compuesto particular a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, estado de salud general y otros fármacos administrados simultáneamente. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, disolución láctica de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También puede haber conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, sustancias antimicrobianas, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes adicionales, tales como dopamina o fármacos psicofarmacológicos, dependiendo del uso buscado de la composición farmacéutica.

Además, una composición farmacéutica se puede formular como una vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo anti- α -sinucleína o fragmento, derivado o variante de unión del mismo para inmunización pasiva. Como se menciona en la sección de antecedentes, se ha informado de especies oligoméricas de α -sinucleína extracelulares en plasma y LCR (E1-Agnaf y *col.*, FASEB J. 20 (2006), 419-425) y los estudios de inmunización pasiva en modelos de ratón de enfermedad de Parkinson muestran que los anticuerpos monoclonales de ratón extracelulares contra α -sinucleína pueden reducir la acumulación de agregados de α -sinucleína intracelular (Masliah y *col.*, Neuron, 46 (2005), 857-868). En consecuencia, es prudente esperar que los anticuerpos anti- α -sinucleína humanos y moléculas de unión a α -sinucleína equivalentes de la presente invención son particularmente útiles como vacuna para la prevención o mejora de enfermedades sinucleinopáticas tales como EP, DCL y AM.

En una realización, es beneficioso usar Fab recombinante (rFab) y fragmentos monocatenarios (scFv) del anticuerpo de la presente invención, que podrían penetrar más fácilmente una membrana celular. Por ejemplo, Robert y *col.*, Protein Eng. Des. Sel. (2008) oct. 16; S1741-0134, publicado antes en línea, describen el uso de Fab recombinante quimérico (rFab) y fragmentos monocatenarios (scFv) del anticuerpo monoclonal WO-2 que reconoce un epítipo en la región N-terminal de A β . Los fragmentos modificados podían (i) impedir la fibrilización de tipo amiloide, (ii) desagregar las fibrillas A β 1-42 preformadas, e (iii) inhibir la neurotoxicidad mediada por el oligómero A β 1-42 *in vitro* de manera tan eficiente como la molécula IgG entera. Las ventajas percibidas de usar formatos de anticuerpos Fab y scFv modificados pequeños que carecen de la función efectora incluyen un paso más eficiente a través de la barrera hematoencefálica y minimizar el riesgo de desencadenar reacciones inflamatorias secundarias. Además, aparte de que los anticuerpos de dominio único y scFv conservan la especificidad de unión de los anticuerpos de longitud completa, pueden expresarse como genes individuales e intracelularmente en células de mamíferos como intracuerpos, con el potencial alterar el plegamiento, y producir interacciones, modificaciones o ubicación subcelular

de sus dianas; véase para revisión, *p. ej.*, Miller y Messer, *Molecular Therapy* 12 (2005), 394-401.

En un enfoque diferente Muller y *col.*, *Expert Opin. Biol. Ther.* (2005), 237-241, describen una plataforma tecnológica, conocida como «Tecnología del superanticuerpo», que se dice que permite que los anticuerpos se trasladen a células vivas sin dañarse. Dichos anticuerpos que penetran en las células abren nuevas ventanas terapéuticas y de diagnóstico. El término «TransMabs» ha sido acuñado para estos anticuerpos.

Una realización adicional incluye la coadministración o administración secuencial de otros agentes neuroprotectores útiles para tratar una enfermedad sinucleinopática. En una realización, el agente adicional está comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos de agentes neuroprotectores que se pueden usar para tratar un sujeto incluyen, pero sin limitación, un inhibidor de acetilcolinesterasa, un antagonista del receptor glutamatérgico, inhibidores de cinasa, inhibidores de HDAC, agentes antiinflamatorios, sodio de divalproex o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de agentes neuroprotectores que se pueden usar simultáneamente con la composición farmacéutica de la presente invención se describen en la técnica, véase, *p. ej.*, la solicitud internacional WO2007/011907. En una realización, el agente adicional es dopamina o un agonista del receptor de dopamina.

En una realización adicional de la presente invención las moléculas de unión a α -sinucleína, en particular anticuerpos de la presente invención, también se pueden coadministrar o administrar antes o después de una terapia de trasplante con trasplantes neurales o terapia de células madre útiles para tratar una enfermedad sinucleinopática. Dichos enfoques con trasplantes de neuronas mesencefálicas embrionarias se han llevado a cabo en pacientes con enfermedad de Parkinson con el objetivo de reemplazar las neuronas que se pierden en la enfermedad y restablecer la neurotransmisión dopaminérgica en el cuerpo estriado. Al cabo de 11-16 años del postrasplante, se descubrió que las neuronas injertadas contenían cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy. Esta propagación de patología de α -sinucleína desde el huésped hasta los tejidos injertados se puede prevenir con la coadministración de moléculas de unión a α -sinucleína, en particular de anticuerpos de la presente invención.

Una dosis o cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a una cantidad del principio activo suficiente para mejorar los síntomas o la afección. La eficacia y toxicidad terapéutica de dichos compuestos se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, *p. ej.*, DE_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población) y DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación DL_{50}/DE_{50} . En ciertas realizaciones, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente para restaurar o mantener el comportamiento normal y/o propiedades cognitivas en caso de EP, DCL u otras enfermedades sinucleinopáticas.

De lo antedicho resulta evidente que la presente invención engloba cualquier uso de una molécula de unión a α -sinucleína que comprende al menos una CDR de NI-202.21D11 o fragmentos, variantes o derivados del mismo, en particular, para diagnosticar y/o tratar una enfermedad sinucleinopática como se menciona más arriba. La molécula de unión puede ser un anticuerpo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo. Además, la presente invención describe anticuerpos antidiotípicos de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados descritos en el presente documento. Estos son anticuerpos u otras moléculas de unión que se unen a la única secuencia peptídica antigénica ubicada en una región variable de un anticuerpo próxima al sitio de unión al antígeno y son útiles, *p. ej.*, para detectar anticuerpos anti- α -sinucleína en la muestra de un sujeto.

En otra realización la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende una cualquiera de las moléculas de unión a α -sinucleína descritas anteriormente, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, polinucleótidos, vectores o células de la invención y medios opcionalmente apropiados para detección tales como reactivos utilizados convencionalmente en procedimientos de diagnóstico basados en la respuesta inmunitaria o ácido nucleico. Los anticuerpos de la invención son, por ejemplo, adecuados para su uso en inmunoensayos donde se pueden utilizar en fase líquida o unidos a un vehículo de fase sólida. Los ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto. Los ejemplos de dichos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo tipo sándwich (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y el ensayo de Western blot. Los antígenos y anticuerpos de la invención se pueden unir a diferentes vehículos y usarse para aislar células específicamente unidas a los mismos. Los ejemplos de vehículos conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Existen varias etiquetas y procedimientos de etiquetado conocidos diferentes para los expertos en la técnica. Los ejemplos de los tipos de etiquetas que se pueden usar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos

fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes; véanse también las realizaciones analizadas anteriormente en el presente documento.

- Mediante una realización adicional, las moléculas de unión a α -sinucleína, en particular, los anticuerpos de la presente invención se utilizan en un procedimiento para el diagnóstico de un trastorno en un individuo obteniendo una muestra de fluido corporal del individuo analizado que puede ser una muestra de sangre, una muestra de linfa o una muestra de cualquier otro fluido corporal y poniendo en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo de la presente invención en condiciones que permitan la formación de complejos anticuerpo-antígeno. A continuación se determina el nivel de dichos complejos mediante procedimientos conocidos en la técnica, un nivel significativamente superior que el que se forma en una muestra de control que indica la enfermedad en el individuo analizado. De la misma manera, también se puede usar el antígeno específico unido por los anticuerpos de la invención. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de unión, *p. ej.*, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención.
- En este contexto, la presente invención también se refiere a medios específicamente diseñados para este fin. Por ejemplo, se puede usar una matriz basada en anticuerpos, que esté, por ejemplo, cargada con anticuerpos o moléculas de unión al antígeno equivalentes de la presente invención que reconocen específicamente α -sinucleína. El diseño de inmunoensayos de micromatrices se resume en Kusnezow *y col.*, *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a micromatrices cargadas con moléculas de unión a α -sinucleína identificadas de acuerdo con la presente invención.

En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una enfermedad sinucleinopática en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- (a) evaluar el nivel, ubicación, conformación o una combinación de estos de α -sinucleína en un sujeto que ha de ser diagnosticado con el anticuerpo o fragmento del mismo de uno cualquiera de la invención y
- (b) comparar el nivel, ubicación, conformación o combinación de estos de α -sinucleína en el sujeto con uno o más estándares de referencia derivados de una o más muestras de control,

donde una diferencia o similitud entre el nivel, ubicación, conformación o combinación de estos de α -sinucleína en el sujeto y el estándar de referencia indica si el sujeto padece una enfermedad sinucleinopática.

El sujeto que ha de ser diagnosticado puede ser asintomático o preclínico para la enfermedad. El estándar de referencia puede ser de un paciente con una enfermedad sinucleinopática, por ejemplo, EP, DCL o AM, donde una similitud entre el nivel, ubicación, conformación o combinación de estos de α -sinucleína en el sujeto que ha de ser diagnosticado y el estándar de referencia indica que el sujeto que ha de ser diagnosticado padece una enfermedad sinucleinopática. Como alternativa, o adicionalmente un estándar de referencia se deriva de un sujeto que no padece una enfermedad sinucleinopática. En ciertas realizaciones, el sujeto que ha de ser diagnosticado y el estándar o estándares de referencia tienen la misma edad. El análisis se puede llevar a cabo *in vivo* o mediante una muestra aislada del sujeto que ha de ser diagnosticado, *p. ej.*, cualquier fluido corporal que se sospeche contiene α -sinucleína, por ejemplo, una muestra de sangre, LCR u orina.

El nivel, ubicación y/o conformación de α -sinucleína se puede evaluar mediante cualquier procedimiento apropiado en la técnica que comprende, *p. ej.*, analizar α -sinucleína mediante una o más técnicas escogidas de Western blot, inmunoprecipitación, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), electroforesis en gel bidimensional, espectroscopía de masas (MS), tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF), tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser de superficie (SELDI-TOF), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC), cromatografía líquida multidimensional (LC) seguida de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), y densitometría láser. El diagnóstico por imagen *in vivo* de α -sinucleína puede comprender tomografía de emisión de fotones (PET), tomografía de emisión de fotón único (SPECT), infrarrojo cercano (NIR) imágenes ópticas o imagen por resonancia magnética (MRI).

Los procedimientos para diagnosticar una enfermedad sinucleinopática tal como EP, DCL o AM, monitorizar el avance de una enfermedad sinucleinopática, y monitorizar una enfermedad sinucleinopática que utiliza anticuerpos y medios relacionados que se pueden adaptar de acuerdo con la presente invención también se describen en la solicitud internacional WO2007/011907. De manera similar, los procedimientos de detección basados en anticuerpos para α -sinucleína se describen en las solicitudes internacionales WO99/50300, WO2005/047860, WO2007/021255 y WO2008/103472. Estos procedimientos se pueden aplicar como se describe pero con un anticuerpo específico de α -sinucleína, fragmento, derivado o variante de unión de la presente invención.

60

Estas y otras realizaciones se describen y están incluidas en la descripción y los ejemplos de la presente invención. Se puede conseguir bibliografía adicional sobre cualquiera de los materiales, procedimientos, usos y compuestos que han de utilizarse de acuerdo con la presente invención en bibliotecas públicas y bases de datos, utilizando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública «Medline», que aloja el Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos y/o la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos en los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos. Las bases de datos y direcciones web adicionales, tales como las del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), que forma parte del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) son conocidas por los expertos en la técnica y también se pueden obtener usando motores de búsqueda de Internet. En Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364, se ofrece una descripción general de información de patentes en biotecnología y un estudio de fuentes pertinentes de información sobre patentes útil para la búsqueda retrospectiva y para conciencia actual.

En términos generales, la descripción anterior describe la presente invención. A menos que se indique otra cosa, un término como se usa en el presente documento da la definición tal y como la proporciona el diccionario Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpresso en 2003, ISBN 0 19 850673 2. Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta memoria descriptiva.

Los ejemplos que se incluyen a continuación aclararán aun más lo arriba explicado, y se proporcionan en el presente documento únicamente con fines ilustrativos.

20 EJEMPLOS

Los ejemplos que se incluyen a continuación ilustran adicionalmente la invención. Los siguientes experimentos de los Ejemplos se ilustran y se describen con respecto a los anticuerpos NI-202.21D11 y NI-202.12F4 (en el Ejemplo 1) clonados, es decir, que contienen mutaciones inducidas por cebadores en los extremos N-terminal propiamente dichos de las regiones variables de Ig de marco 1 y sin ajustarse a las secuencias de la línea germinal (GL) de cadenas pesadas y ligeras variables humanas; véase Figura 1. Estos anticuerpos se expresaron como moléculas IgG1 humanas.

30 Materiales y procedimientos

En la bibliografía citada se pueden encontrar descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los que se emplean en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, la identificación de linfocitos B específicos de α -sinucleína y la clonación molecular de anticuerpos de α -sinucleína que muestran especificidad de interés así como su expresión recombinante y caracterización funcional se ha llevado a cabo o se puede llevar a cabo como se describe en los Ejemplos y la sección de Procedimientos complementarios de la solicitud internacional PCT/EP2008/000053 publicada como WO2008/081008 y del documento PCT/EP2009/009186 publicado como WO2010/069603.

40 Purificación de antígeno

Se obtuvo His- α -sinucleína mediante expresión recombinante en *Escherichia coli* y posterior purificación utilizando precipitación inducida por calor, y cromatografía de afinidad a níquel, de intercambio aniónico y de exclusión por tamaño.

Por ejemplo, un constructo de ADN que comprende α -sinucleína codificante de ADNc bajo el control del promotor de T7 se utilizó para transformar una cepa de *Escherichia coli* apropiada tal como BL21(DE3) y se indujo la expresión de 200 ml de cultivo celular mediante la adición de isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1mM. Las células se cultivaron después de 4 horas de inducción a 37 °C y a continuación se volvieron a poner en suspensión en 20 ml de Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 8, seguido de sonicación. Después de 15 minutos de ebullición, se recogió el sobrenadante resistente al calor centrifugando a 17.000 g. De manera similar, se recogió el sobrenadante resistente al calor centrifugado a 17.000 g de falso *Escherichia coli*. Después de que el sobrenadante resistente al calor centrifugado a 17.000 g (20 ml) de *Escherichia coli* que expresa α -sinucleína marcada con His se ajustó a Tris 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, pH 8, se cargó en una columna de HisTrap HP 1ml (GE Life Science) y se eluyó HIS- α -sinucleína con un gradiente de imidazol 30-500 mM. Las fracciones que contenían HIS- α -sinucleína se agruparon y a continuación se diluyeron 1:10 con Tris 50 mM pH 8. Las fracciones agrupadas diluidas se aplicaron a una columna HiTrap Q HP 1ml (GE Life Science) y las proteínas unidas se eluyeron en un gradiente de NaCl 30-1.000 mM. Para terminar, los eluatos que contenían HIS- α -sinucleína se purificaron adicionalmente utilizando filtración en gel de alto rendimiento (Superdex 200 10/300 GL). Este procedimiento de purificación produce HIS- α -sinucleína con un grado de pureza de alrededor de 99 % de acuerdo con la estimación mediante tinción con

Coomassie y SDS-PAGE. La concentración de proteína purificada se determinó utilizando un ensayo de BCA (Pierce).

Cribado de anticuerpo de α -sinucleína

5 Microplacas de 96 pocillos en mitad del área (Corning) se revistieron con HIS- α -sinucleína purificada o α -sinucleína (Péptido R) a una concentración estándar de 2 μ g/ml en tampón de revestimiento (PBS pH 9,6) durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron en PBS-T pH 7,6 y los sitios de unión no específicos se bloquearon durante 1 hora a TA con PBS-T que contenía BSA al 2 % (Sigma, Buchs, Suiza). El medio acondicionado de linfocitos B se preabsorbió 10 durante 1 hora a TA con 10 % de proteínas de *E. coli* resistentes al calor en BSA al 1 %. Esta etapa de preabsorción se había desarrollado después de que en varios intentos previos de cribado ELISA no fue posible identificar anticuerpos específicos de α -sinucleína humana. Por lo tanto, afortunadamente resultó que la preabsorción de la placa de ELISA con proteínas de *E. coli* resistentes al calor excluye el cribado para resultados de falso positivo tales como anticuerpos pegajosos y anticuerpos dirigidos contra contaminaciones por proteínas de *E. coli* probablemente 15 presentes en muestras de α -sinucleína recombinante purificada. A continuación, el medio preabsorbido se transfirió desde placas de cultivo de linfocitos B de memoria a placas de ELISA y se incubó durante 2 horas a TA. Las placas de ELISA se lavaron con PBS-T y después se incubaron con anticuerpos policlonales de IgG (específicos del fragmento Fcy) anti-humanos de burro conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de lavar con PBS-T, la unión de anticuerpos humanos se determinó por medición de la actividad de HRP en un ensayo 20 colorimétrico estándar.

Clonación molecular de anticuerpos de α -sinucleína

Se obtuvieron muestras que contenían linfocitos B de memoria de voluntarios mayores de 60 años. Todo los 25 voluntarios tenían en común que no presentaban ningún signo de Parkinsonismo. Los linfocitos B vivos de cultivos de linfocitos B de memoria seleccionados se recogieron y se preparó ARNm. A continuación se obtuvieron secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina utilizando cebadores específicos de Ig-marco 1 para todas las familias de cadena pesada y ligera variables humanas como cebadores 5' en combinación con cebadores específicos para todos los segmentos J humanos (cadena pesada y ligera kappa) y segmentos C (cadena ligera 30 lambda) como cebadores 3' (Marks *y col.*, Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard *y col.*, J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

La identificación del clon de anticuerpo con la especificidad deseada se realizó por medio del nuevo cribado en ELISA tras la expresión recombinante de anticuerpos completos. La expresión recombinante de anticuerpos IgG2a 35 quiméricos o anticuerpos IgG1 humanos completos se logró tras la inserción de las secuencias de cadena pesada y ligera variables «en el marco de lectura adecuado» en vectores de expresión que complementaban la secuencia de región variable con una secuencia que codificaba un péptido líder en el extremo 5' y en el extremo 3' con una secuencia que codificaba el uno o más dominios constantes apropiados. A estos efectos, los cebadores contenían sitios de restricción diseñados para facilitar la clonación de las secuencias de cadena pesada y ligera variables en 40 vectores de expresión de anticuerpos. Las inmunoglobulinas de cadena pesada se expresaron insertando el producto RT-PCR de cadena pesada de inmunoglobulina en marco en un vector de expresión de cadena pesada que llevaba un péptido señal y los dominios constantes de inmunoglobulina gama 1 humana o inmunoglobulina gama 2a de ratón. La inmunoglobulina de cadena ligera kappa se expresó insertando el producto RT-PCR de cadena ligera kappa de NI-202.21D11 en marco en un vector de expresión de cadena ligera que proporcionaba un 45 péptido señal y el dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera kappa humana.

Los anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales se obtuvieron tras la cotransfección en células HEK293 o CHO (o cualquier otra línea celular receptora apropiada de origen humano o de ratón) de un vector de expresión de cadena pesada de Ig y un vector de expresión de cadena ligera de Ig kappa o lambda. El anticuerpo monoclonal 50 humano recombinante se purificó posteriormente a partir del medio acondicionado usando purificación de columna de proteína A estándar.

Anticuerpos

55 El anticuerpo de pan sinucleína Syn211 (Sigma) se utilizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. El anticuerpo de α -sinucleína humana recombinante NI-202.21D11 es un anticuerpo de la presente invención y NI202.12F4 se describe en la publicación internacional WO 2010/069603 A1; véase más arriba. Se expresaron en células HEK293 o CHO y a continuación se utilizaron directamente medios acondicionados en aplicaciones posteriores a menos que se especificara lo contrario.

60

Ensayo ELISA directo

Los antígenos se revistieron en la concentración indicada en PBS pH 9,6 en microplacas de 96 pocillos en mitad del área (Corning) durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron en PBS-T pH 7,6 y se bloquearon sitios de unión no
 5 específicos durante 1 hora a TA con PBS-T que contenía BSA al 2 % (Sigma). A continuación, las sondas (anticuerpos primarios) se transfirieron a pocillos y se incubaron durante 2 horas a TA. Después del lavado en PBS-T pH 7,6, los pocillos se incubaron con anticuerpos secundarios anti-humanos policlonales conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (para anticuerpos recombinantes humanos), anticonejo (para anticuerpo de pan sinucleína) o antirrátón (para LB509 o Syn211) durante 1 hora a TA. Después de un lavado riguroso en PBS-T, la unión de las
 10 sondas se determinó por medición de la actividad de HRP en un ensayo clorimétrico estándar utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbifenil-4,4'-diamina (Sigma) como sustrato cromogénico.

Escaneo de péptidos para mapeo de epítomos

15 La secuencia entera de α -sinucleína humana se sintetizó como péptidos solapantes, con longitudes de 15 aminoácidos (aa) y un solapamiento de 11 aa, acoplados mediante un enlazador flexible a membrana de celulosa (JPT, Berlín, Alemania). Una membrana que comprende un total de 33 péptidos se aclaró en metanol y a continuación se bloqueó con Rotiblock (Roth, Karlsruhe, Alemania). La membrana se incubó con anticuerpos indicados diluidos en disolución bloqueante y a continuación con anticuerpo secundario etiquetado con peroxidasa
 20 de rábano picante (HRP) durante 1 hora. Entre las incubaciones, la membrana se lavó 3 veces con PBS-T durante 5 minutos. A continuación, la membrana se desarrolló utilizando ECL más reactivos de detección de Western Blotting (GE Healthcare).

Ejemplo 1: El anticuerpo de α -sinucleína derivado de seres humanos NI-202.21D11 es selectivo para α -sinucleína humana

α -, β - y γ -sinucleína son proteínas altamente homólogas que están predominantemente expresadas en el sistema nervioso, músculo esquelético y corazón. La α -sinucleína está estrechamente ligada a un amplio espectro de enfermedades del SNC mientras que la β -sinucleína puede ser una proteína neuroprotectora. Por lo tanto, la
 30 invención proporciona anticuerpos terapéuticos contra variantes de α -sinucleína patológica que no tienen reacción cruzada con β - y γ -sinucleína. Para apoyar el potencial uso terapéutico de NI-202.21D11, el anticuerpo se analizó para determinar unión a α -, β - y γ -sinucleína en un ensayo ELISA directo. Las α -, β - y γ -sinucleínas recombinantes se revistieron en placas de ELISA en concentraciones iguales y a continuación o bien se incubaron con NI-202.21D11 recombinante o con un anticuerpo de pan sinucleína de control. El anticuerpo de pan-sinucleína detecta
 35 las tres proteínas de sinucleína pero NI-202.21D11 muestra unión selectiva para α -sinucleína (Fig. 2a).

La α -sinucleína humana y de ratón son proteínas altamente conservadas. Para sondear si el NI-202.21D11 recombinante preferentemente se unía a α -sinucleína humana vs murina, se revistieron α -sinucleína humana o murina recombinantes marcadas con His en placas de ELISA en concentraciones iguales y a continuación se
 40 analizaron para determinar unión a NI-202.21D11 y NI-202.12F4 (Fig 2b). NI-202.21D11 detecta únicamente α -sinucleína humana mientras que NI-202.12F4 detecta tanto α -sinucleína humana como murina en este ensayo ELISA directo (véase la publicación del PCT N.º WO 2010/069603 A1). En conjunto, estos datos demuestran que NI-202.21D11 es altamente selectivo para α -sinucleína humana.

Ejemplo 2: NI-202.21D11 muestra unión preferente a α -sinucleína humana en concentraciones de revestimiento elevadas señalando un epítomo conformacional

La concentración efectiva media máxima (CE50) que indica la potencia de NI-202.21D11 se determinó para concentraciones de revestimiento bajas y elevadas de α -sinucleína recombinante utilizando un ensayo ELISA directo
 50 de α -sinucleína. Se observó alta afinidad de unión de NI-202.21D11 recombinante con una CE50 de \square 200 pM para concentraciones de revestimiento elevadas de proteína α -sinucleína (20 μ g/ml). Con concentraciones más bajas de α -sinucleína, se observó una disminución marcada de afinidad (Fig. 3). Estas características muestran un fuerte contraste respecto del anticuerpo disponible en el mercado syn211 que también detecta un epítomo en el dominio C-terminal de α -sinucleína. Este dato sugiere que NI-202.21D11 prefiere un epítomo que está formado o expuesto en
 55 condiciones de alta densidad como las que se dan en especies de α -sinucleína de alto peso molecular.

Ejemplo 3: NI-202.21D11 recombinante se une a especies de α -sinucleína patológica en el cerebro.

La unión de NI-202.21D11 a α -sinucleína humana se caracterizó adicionalmente mediante tinción
 60 inmunohistoquímica de secciones del cerebro de ratones transgénicos con α -sinucleína y de un paciente con una

sinucleinopatía neuropatológicamente confirmada (demencia con cuerpos de Lewy). NI-202.21D11 mostró tinción prominente de cuerpo de Lewy y neurita de Lewy como inclusiones en secciones de parafina tratadas con proteinasa K de tejido cerebral de ratones transgénicos que sobreexpresaban α -sinucleína humana A53T (Fig. 4a). No se detectó tinción de NI202-21D11 en secciones del cerebro de ratones de tipo salvaje apoyando el hecho de que NI-202.21D11 es específico para α -sinucleína humana (Fig. 4b). NI-202.21D11 también detectó α -sinucleína patológica en tejido cerebral humano de un paciente con demencia con cuerpos de Lewy (Fig. 4c). Estos resultados muestran que el anticuerpo derivado de seres humanos NI-202.21D11 detecta α -sinucleína patológica en el cerebro.

Ejemplo 4: Mapeo del epítipo del anticuerpo específico de α -sinucleína derivada de seres humanos NI-202.21D11 a un epítipo dentro del dominio de extremo C-terminal de α -sinucleína humana.

La α -sinucleína es una proteína no plegada de manera nativa de 140 aminoácidos (aa) de longitud que está compuesta por tres dominios. Estos son la región de repetición anfipática N-terminal (aa 1-60), la región central (aa 61-95) y la región ácida C-terminal (aa 96-140). (A) Para una comprensión inicial del dominio de unión de NI-202.21D11, se analizaron truncamientos de α -sinucleína recombinante para determinar unión de NI-202.21D11 en un ensayo ELISA directo. Los truncamientos de α -sinucleína recombinante de los residuos 1-60, 1-95, 61-140 y 96-140 se revistieron en placas de ELISA y a continuación se incubaron con NI-202.21D11 recombinante. La unión de NI-202.21D11 solo se observó a truncamientos de α -sinucleína 61-140 y 96-140 demostrando que NI-202.21D11 se une al dominio ácido C-terminal de α -sinucleína (Fig. 5a).

Para comprender la secuencia de reconocimiento de NI-202.21D11 con mayor detalle, NI-202.21D11 se analizó para determinar la unión a péptidos 15-mero lineales solapantes que cubren la secuencia de aminoácidos de α -sinucleína humana completa. Los péptidos adyacentes compartían un solapamiento de 11 residuos y se descubrieron péptidos en extremo C-terminal en una membrana de apoyo de celulosa. NI-202.21D11 se unió a tres péptidos solapantes, a saber, residuos 109-123 (B08), 113-127 (B09) y 117-131 (B10) de α -sinucleína humana (Fig. 5b). Este resultado sugiere que la secuencia de reconocimiento mínima dentro del extremo C-terminal de α -sinucleína requerida para unión de NI-202.21D11 es PVDPDNE (117-123). En particular, NI-202.21D11 se unió al péptido B10 ligeramente menos que a los péptidos B08 y B09. Por lo tanto, los residuos 113-117 dentro de α -sinucleína pueden influenciar en la unión de NI-202.21D11.

Casi no se observó unión de NI-202.21D11 a α -sinucleína de ratón en un ensayo ELISA directo (Fig. 2B). El alineamiento de secuencias de la secuencia de epítipo determinado de NI-202.21D11 (PVDPDNE) con la secuencia murina correspondiente (PVDPGSE) sugiere que D121 y N122 son aminoácidos clave para selectividad de NI-202.21D11 para α -sinucleína humana vs murina. Para confirmar el papel clave de D121/N122, se produjo α -sinucleína humana mutada recombinante D121G/N122S y se analizó para determinar unión de NI202.21D11 en un ensayo ELISA directo. Como se muestra en la Figura 5c, NI-202.21D11 casi no mostró unión a α -sinucleína humana D121G/N122S en comparación con α -sinucleína humana de tipo salvaje (wt). Un anticuerpo de pan-sinucleína de control se utilizó como control de normalización para revestimiento parejo de proteínas de sinucleína.

Estos resultados muestran que NI-202.21D11 es un anticuerpo de α -sinucleína derivado de seres humanos que detecta un epítipo en el extremo C-terminal (residuos 117-123) dentro de α -sinucleína humana y que los aminoácidos D121/N122 contribuyen a selectividad de α -sinucleína humana vs murina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biogen Idec International Neuroscience GmbH
University of Zurich
WEIHOFEN, Andreas
GRIMM, Jan
50 HOCK, Christoph
NITSCH, Roger
SU, Lihe
WEINREB, Paul
<120> MOLÉCULAS DE UNIÓN ANTI-ALFA SINUCLEÍNA
55 <130> 2159.353PC01
<140> Todavía no asignado
<141> Con la presente
<150> 61/500,580
<151> 23/06/2011
60 <160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<220>

<223> alfa-sinucleína

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

10

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

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

<210> 2

15

<211> 140

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> alfa-sinucleína

20

<400> 2

ES 2 699 801 T3

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 Thr 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 Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
 85 90 95

Lys Asp Gln Met Gly Lys Gly Glu Glu Gly Tyr Pro Gln Glu Gly Ile
 100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Gly Ser Glu Ala Tyr Glu Met Pro
 115 120 125

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

<210> 3
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> beta-sinucleína
 <400> 3

5

10

ES 2 699 801 T3

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

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

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

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

His Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala
 65 70 75 80

Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu
 85 90 95

Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met
 100 105 110

Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln
 115 120 125

Glu Tyr Glu Pro Glu Ala
 130

<210> 4
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> gamma-sinucleína
 <400> 4

5

10

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

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

Thr Lys Glu Gly Val Met Tyr Val Gly Ala Lys Thr Lys Glu Asn Val
 35 40 45

Val Gln Ser Val Thr Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Asn
 50 55 60

ES 2 699 801 T3

Ala Val Ser Glu Ala Val Val Ser Ser Val Asn Thr Val Ala Thr Lys
65 70 75 80

Thr Val Glu Glu Ala Glu Asn Ile Ala Val Thr Ser Gly Val Val Arg
85 90 95

Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Glu Ala Ser
100 105 110

Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp
115 120 125

<210> 5

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> NI-202.12F4-VHA1b (secuencia de cadena pesada variable VHA1b)

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> CDR1

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(68)

<223> CDR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (101)..(102)

20 <223> CDR3

<400> 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Phe Glu Lys Ala
20 25 30

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

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

Pro Val Glu Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Met
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Ser Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

25 Ser

ES 2 699 801 T3

5 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.12F4-VHA1b CDR1
 <400> 6

10 Lys Ala Trp Met Ser
 1 5

15 <210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.12F4-VHA1b CDR2
 <400> 7

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

20 Val Glu Gly

25 <210> 8
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.12F4-VHAb CDR3
 <400> 8

30 Ala His
 1

35 <210> 9
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.12F4-VHA1b-GL (alineada con la secuencia de línea germinal)
 <400> 9

ES 2 699 801 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Phe Glu Lys Ala
 20 25 30

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

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

Pro Val Glu Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Met
65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Ser Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

5 <210> 10
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.12F4-VLa1
10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(33)
 <223> CDR1
 <220>
15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(55)
 <223> CDR2
 <220>
20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (88)..(98)
 <223> CDR3
 <400> 10

ES 2 699 801 T3

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

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.12F4-VLa1 CDR1
 <400> 11

Ser Gly Glu Ala Leu Pro Met Gln Phe Ala His
 1 5 10

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.12F4-VLa1 CDR2
 <400> 12

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.12F4-VLa1 CDR3
 <400> 13

Gln Ser Pro Asp Ser Thr Asn Thr Tyr Glu Val
 1 5 10

<210> 14
 <211> 108
 <212> PRT

ES 2 699 801 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.12F4-VLa1-GL (alineada con la secuencia de línea germinal)
 <400> 14

5

```

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Met Gln Phe Ala
20          25          30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Val Ile Val Val Tyr
35          40          45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50          55          60

Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu
65          70          75          80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Pro Asp Ser Thr Asn Thr Tyr
85          90          95

Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100          105
  
```

10 <210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.21D11-VH
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(35)
 <223> CDR1
 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(66)
 <223> CDR2
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(113)
 <223> CDR3
 <400> 15

ES 2 699 801 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Lys Arg Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ile Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Glu Asp His Ala Gly Ser Gly Ser Tyr Leu Ser Met Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.21D11-VH CDR1
 <400> 16
 Asn Tyr Ala Met His
 1 5
 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.21D11-VH CDR2
 <400> 17

Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Lys Arg Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Asp

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.21D11-VH CDR3
 <400> 18

ES 2 699 801 T3

Glu Glu Asp His Ala Gly Ser Gly Ser Tyr Leu Ser Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.21D11-VH
 <400> 19

5

10

gaggtgcagc tggtaggagtc tggggctgag gtgaagaagc cgggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaact aactatgcta tgcattgggt gcccaggcc 120
 cccggacaaa ggcttgagtg gatgggatgg atcaacgctg gcaatggtaa gagaaaatat 180
 tcacagaagt tccaggacag agtcaccatt aacagggaca catccgcgag cacaatctac 240
 atggagctga gcagcctggg atctgaagac acggctgtat attactgtgc gagagaggag 300
 gatcacgctg gttcggggag ttacctcagt atggacgtct ggggccaagg aacctggtc 360
 accgtctcct cg 372

<210> 20
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.21D11-VH-GL (corregida de acuerdo con la secuencia de línea germinal)
 <400> 20

15

20

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

ES 2 699 801 T3

<210> 21
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> NI-202.21D11-VH-GL
 <400> 21

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ccggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcact aactatgcta tgcattgggt gcgccaggcc 120
 cccggacaaa ggcttgagtg gatgggatgg atcaacgctg gcaatggtaa gagaaaatat 180
 tcacagaagt tccaggacag agtcaccatt aacagggaca catccgagag cacaatctac 240
 atggagctga gcagcctggg atctgaagac acggctgtat attactgtgc gagagaggag 300
 gatcacgctg gttcggggag ttacctcagt atggacgtct ggggccaagg aagcacggtc 360
 accgtctcct cg 372

10 <210> 22
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> NI-202.21D11-VK
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(40)
 20 <223> CDR1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (56)..(63)
 <223> CDR2
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (95)..(103)
 <223> CDR3
 30 <400> 22

ES 2 699 801 T3

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.21D11-VK CDR1
 <400> 23

5

10

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

Ala

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.21D11-VK CDR2
 <400> 24

15

20

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.21D11-VK CDR3
 <400> 25

25

30

ES 2 699 801 T3

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5

5 <210> 26
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> NI-202.21D11-VK-GL (corregida de acuerdo con la secuencia de línea germinal)
 <400> 26

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

Lys

15 <210> 27
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> NI-202.21D11-VK-GL
 <400> 27

gatattgtga tgactcagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gaatgttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggtagaccgc agaaaccagg acatcctcct aagttgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcaccagct tgcagactga agatgtggcg gtctattact gtcagcagta ttatagtagt 300
 cctctcactt tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaa 339

25 <210> 28
 <211> 339
 <212> ADN

ES 2 699 801 T3

<213> Artificial
<220>
<223> NI-202.21D11-VK
<400> 28

5

```
gatgttgtga tgactcagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gaatgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtagcagc agaaaccagg acatcctcct aagttgctca ttactgggc atctaccgg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcaccagct tgcagactga agatgtggcg gtctattact gtcagcagta ttatagtagt      300
cctctcactt tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaa      339
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a α -sinucleína (SEQ ID NO:1), donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende
- 5 (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende regiones determinantes de complementariedad de VH (CDR) 1, 2 y 3, que comprende
- (i) una región CDR1 que es idéntica a la SEQ ID NO:16;
- (ii) una región CDR2 que es idéntica a la SEQ ID NO:17; y
- 10 (iii) una región CDR3 que es idéntica a la SEQ ID NO:18; y
- (b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR de VL 1, 2 y 3, que comprende
- (i) una región CDR1 que es idéntica a la SEQ ID NO:23;
- (ii) una región CDR2 que es idéntica a la SEQ ID NO:24; y
- (iii) una región CDR3 que es idéntica a la SEQ ID NO:25.
- 15 2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, que comprende
- (a) secuencia de VH SEQ ID NO:15 y secuencia de VL SEQ ID NO:22; o
- (b) secuencia de VH SEQ ID NO:20 y secuencia de VL SEQ ID NO:26.
3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2, que es
- 20 (i) humanizado; quimérico o completamente humano;
- (ii) un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)₂, un fragmento Fv monocatenario, o un anticuerpo monocatenario; y/o
- (iii) que además comprende un polipéptido heterólogo fusionado con el mismo.
- 25 4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se conjuga con un agente seleccionado de entre el grupo compuesto por un agente terapéutico, un profármaco, un péptido, una proteína, una enzima, un virus, un lípido, un modificador de la respuesta biológica, un agente farmacéutico, y polietilenglicol (PEG).
- 30 5. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Un polinucleótido aislado o polinucleótidos que comprenden un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35 7. Un vector o vectores que comprenden el polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 6.
8. Una célula huésped que comprende
- (i) el polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 6 o el vector o vectores de la reivindicación 7; o
- 40 (ii) al menos un primer y segundo vector, donde el primer y segundo vectores no son idénticos, donde el primer vector comprende el polinucleótido de la reivindicación 6 que codifica la VH, y donde dicho segundo vector comprende el polinucleótido de la reivindicación 6 que codifica la VL del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 45 9. Un procedimiento para producir un anticuerpo anti- α -sinucleína humana o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 8 y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo del cultivo celular.
10. Un anticuerpo anti- α -sinucleína humana o fragmento de unión al antígeno del mismo, producido
- 50 mediante el procedimiento de la reivindicación 9.
11. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o 10, la composición farmacéutica de la reivindicación 5, el polinucleótido de la reivindicación 6, el vector de la reivindicación 7, o la célula huésped de la reivindicación 8 para uso en el tratamiento o prevención de una
- 55 enfermedad sinucleinopática de un sujeto.
12. Un procedimiento *in vitro* para diagnosticar una enfermedad sinucleinopática en un sujeto, que comprende:
- (a) evaluar el nivel, ubicación, conformación o una combinación de estos de α -sinucleína en un sujeto que
- 60 ha de ser diagnosticado con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de

las reivindicaciones 1 a 4, o 10 y

(b) comparar el nivel, ubicación, conformación o combinación de estos de α -sinucleína en el sujeto con uno o más estándares de referencia derivados de una o más muestras de control,

5 donde una diferencia o similitud entre el nivel, ubicación, conformación o combinación de estos de α -sinucleína en el sujeto y el estándar de referencia indica si el sujeto padece una enfermedad sinucleinopática.

13. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o el procedimiento de la reivindicación 12, donde la enfermedad sinucleinopática es enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), atrofia multisistémica (AM), o una combinación de estas y/o donde el
10 sujeto es un mamífero, preferentemente donde el mamífero es un ser humano.

14. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o 10 para uso en un procedimiento para diagnosticar una enfermedad sinucleinopática en un sujeto, que comprende:

15 (a) evaluar el nivel, ubicación, conformación o una combinación de estos de α -sinucleína en un sujeto que ha de ser diagnosticado con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o 10 y

(b) comparar el nivel, ubicación, conformación o combinación de estos de α -sinucleína en el sujeto con uno o más estándares de referencia derivados de una o más muestras de control,

20 donde una diferencia o similitud entre el nivel, ubicación, conformación o combinación de estos de α -sinucleína en el sujeto y el estándar de referencia indica si el sujeto padece una enfermedad sinucleinopática, preferentemente donde la enfermedad sinucleinopática es enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), atrofia multisistémica (AM), o una combinación de estas y/o donde el sujeto es un mamífero, preferentemente donde el mamífero es un ser humano.

25 15. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 14, donde el nivel, ubicación, conformación o combinación de estos de α -sinucleína en el sujeto se mide por diagnóstico por imagen *in vivo*, preferentemente donde dicho diagnóstico por imagen *in vivo* comprende tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía por emisión de fotón único (SPECT), infrarrojo cercano (NIR), imágenes ópticas o imagen por
30 resonancia magnética (MRI).

Fig. 1

NI-202.21D11-VH (secuencia de cadena pesada variable VH; SEQ ID NO:15)
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGKRYKYSQKFD
 FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTINRDTSASTIYMELSSLGSEDTAVYYCAREDHAGSGSYLSMDVWGQGLTVTVSS

NI-202.21D11-VH-GL (secuencia de cadena pesada variable VH, corregida según la secuencia de línea germinal; SEQ ID NO:20)
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGKRYKYSQKFD
 FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTINRDTSASTIYMELSSLGSEDTAVYYCAREDHAGSGSYLSMDVWGQGSITVTVSS

NI-202.21D11-VK (secuencia de cadena ligera variable VK; SEQ ID NO:22)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLYSSNNKNYLAWYQQKPGHPPKLLIYWASTRESGVPDFR
 -----CDR3-----JK-----
 SGSGSGTDFLTITSLQTEDVAVYYCQQYSSPLTFGGGKVEIK

NI-202.21D11-VK-GL (secuencia de cadena ligera variable VK, corregida según la secuencia de línea germinal; SEQ ID NO:26)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLYSSNNKNYLAWYQQKPGHPPKLLIYWASTRESGVPDFR
 -----CDR3-----JK-----
 SGSGSGTDFLTITSLQTEDVAVYYCQQYSSPLTFGGGKVEIK

Fig. 2

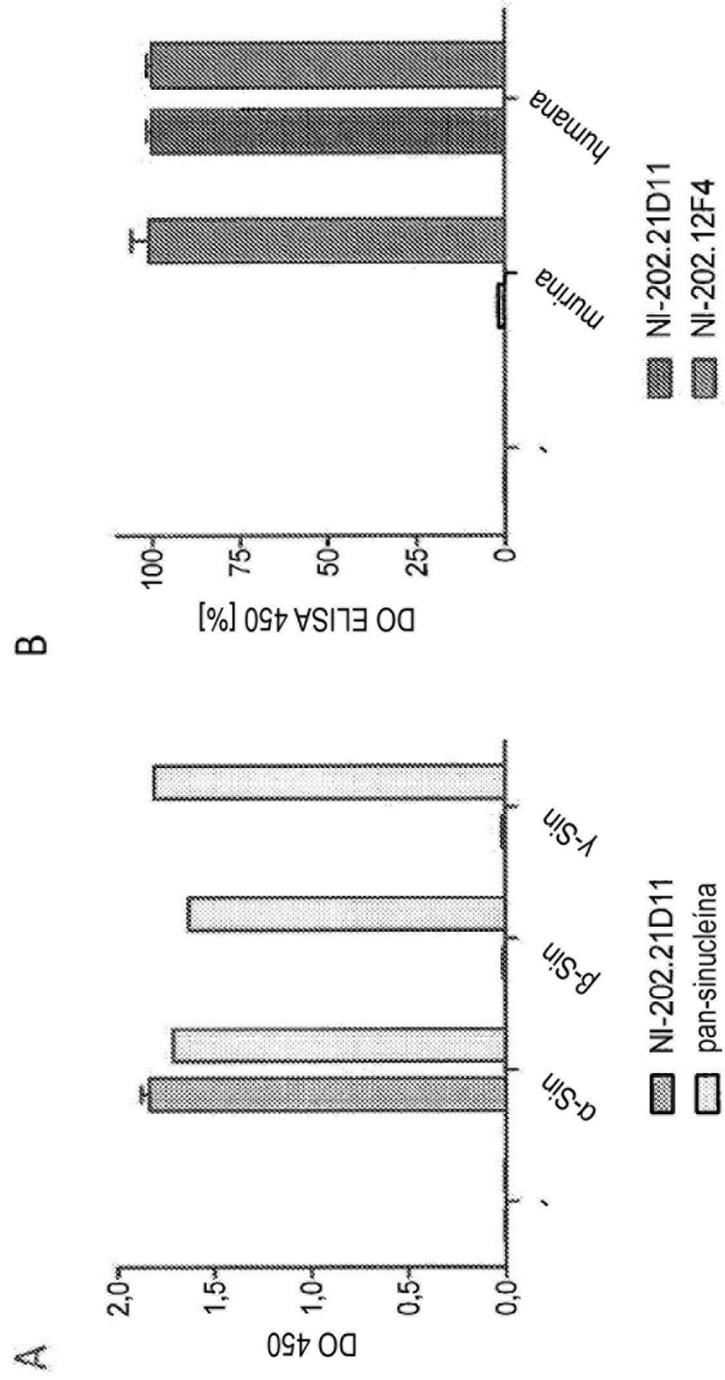


Fig. 3

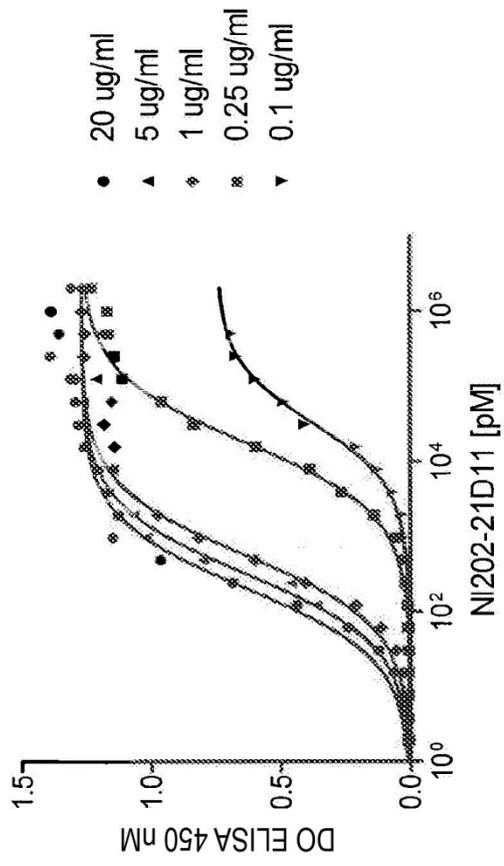


Fig. 4

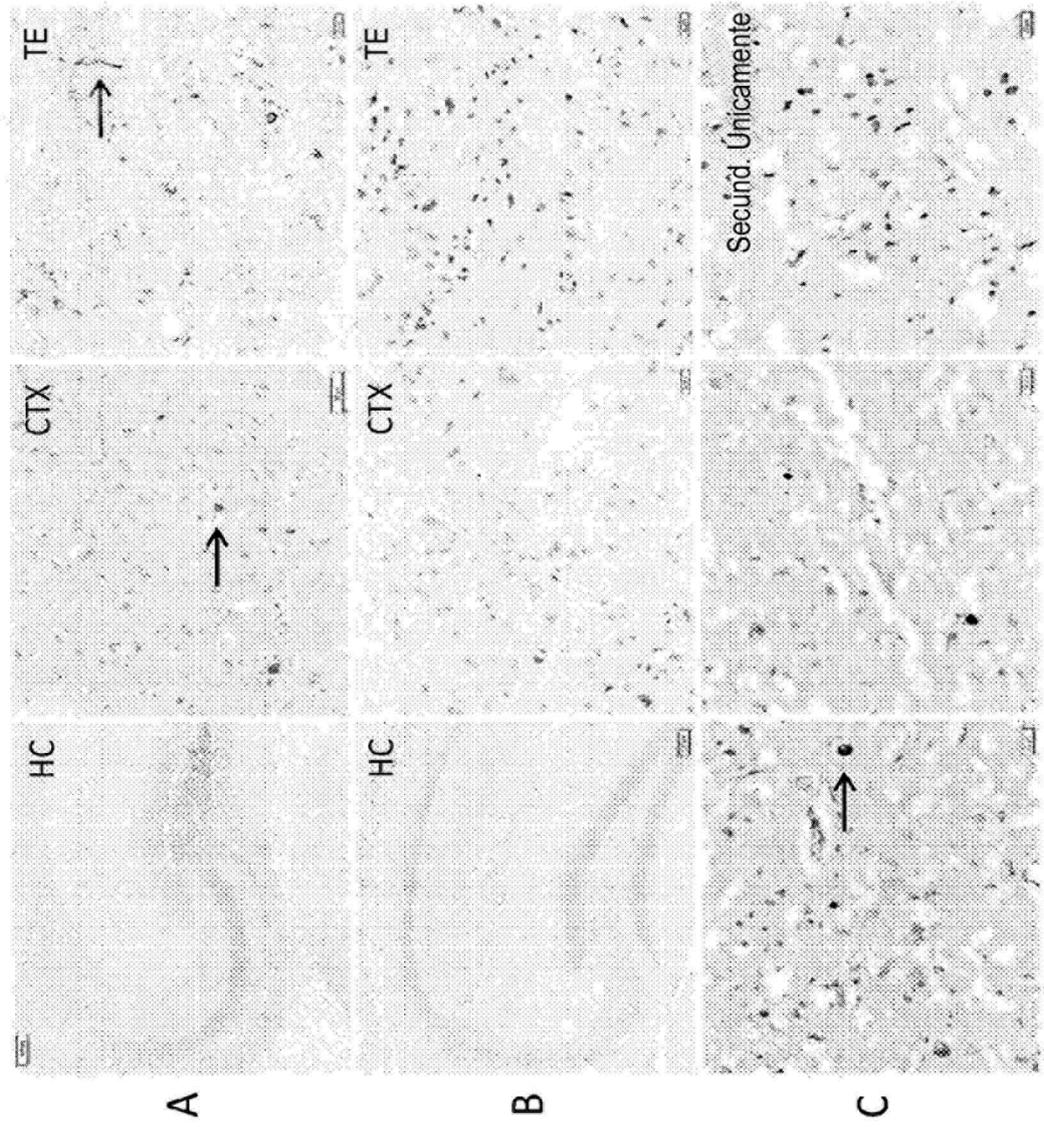


Fig. 5

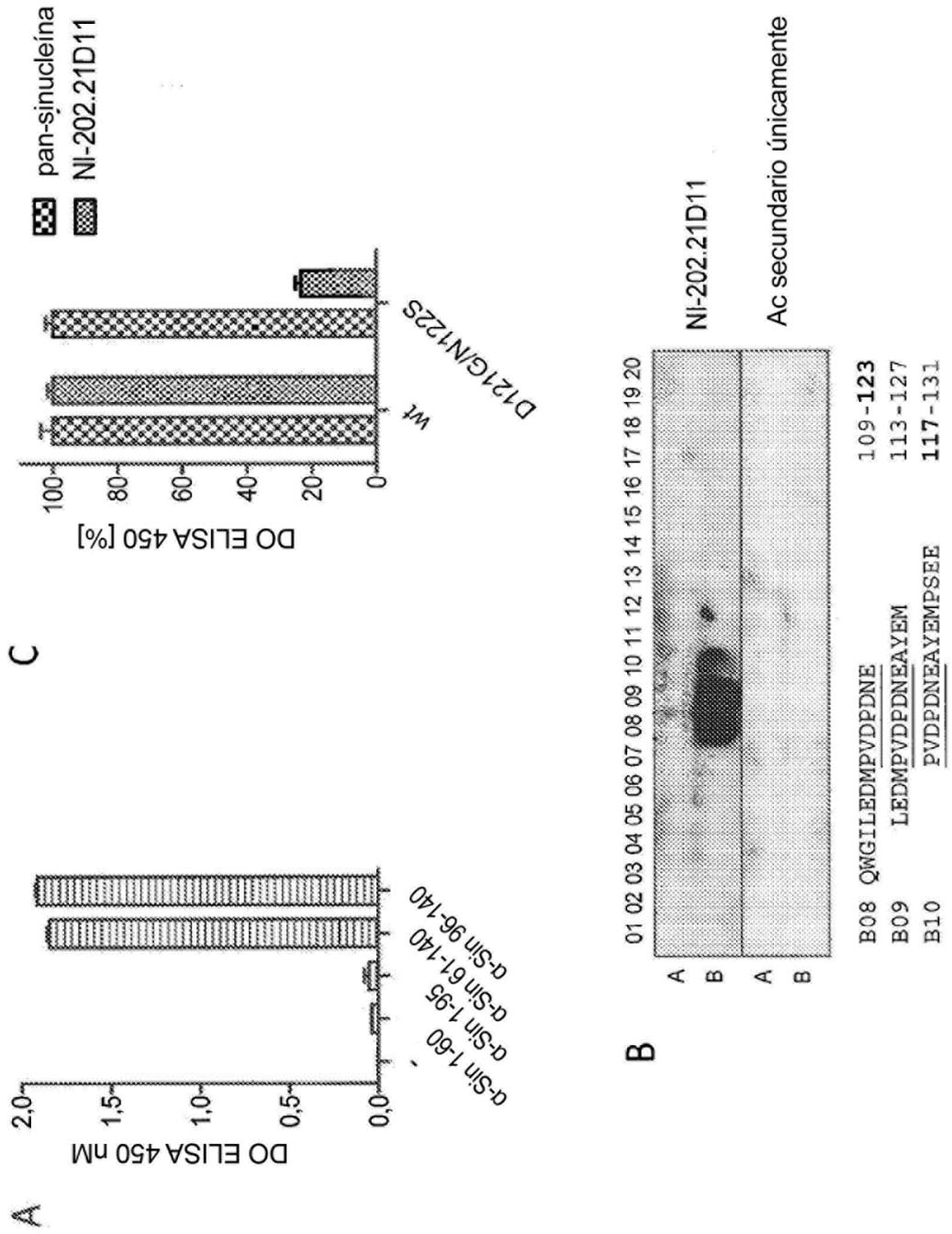


Fig. 6

