

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 586**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2005 PCT/US2005/028166**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2006 WO06020581**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2005 E 05783732 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 1793855**

54 Título: **Prevención y tratamiento de enfermedades sinucleinopática y amiloidogénica**

30 Prioridad:

09.08.2004 US 915214
19.07.2005 US 185907

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2019

73 Titular/es:

PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (50.0%)
Adelphi Plaza, Upper George's Street
Dun Laoghaire Co., IE y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHENK, DALE, B.;
MASLIAH, ELIEZER;
BUTTINI, MANUEL, J.;
CHILCOTE, TAMIE, J.;
ROCKENSTEIN, EDWARD y
GAMES, KATE, DORA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 705 586 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

Prevención y tratamiento de enfermedades sinucleinopática y amiloidogénica

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0001]** La patología cerebral de alfa-sinucleína (alfaSN) es una característica notoria de varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), la atrofia de sistemas múltiples (MSA), y neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral tipo 1 (NBIA-1). Las manifestaciones comunes a todas estas enfermedades, denominadas sinucleinopatías, son inclusiones insolubles de proteínas en las neuronas y la glía, que están compuestas principalmente por alfaSN.

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

25 **[0003]** Los trastornos con LB continúan siendo una causa común de trastornos del movimiento y deterioro cognitivo en el envejecimiento de la población (Galasko et al., *Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias*. *Arch. Neurol.* (1994) 51:888- 95). Aunque su incidencia continúa aumentando, creando un grave problema de salud pública, hasta la fecha, estos trastornos no son curables ni prevenibles, y la comprensión de las causas y la patogénesis de la EP es fundamental para el desarrollo de nuevos tratamientos (Tanner et al., *Epidemiology of Parkinson and Syndromes Akinetic Syndromes*, *Curr. Opin. Neurol.* (2000) 13: 427-30). La causa de la EP es controvertida y se ha propuesto que múltiples factores desempeñan un papel, incluyendo varias neurotoxinas y factores de susceptibilidad genética.

35 **[0004]** En los últimos años, ha surgido una nueva esperanza para la comprensión de la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Específicamente, varios estudios han demostrado que la proteína sináptica alfa-SN desempeña un papel central en la patogénesis de la EP, ya que: (1) esta proteína se acumula en LB (Spillantini et al., *Nature* (1997) 388: 839-40; Takeda et al., *AM.J. Pathol.* (1998) 152: 367-72; Wakabayashi et al., *Neurosci. Lett.* (1997) 239: 45-8), (2) mutaciones en el gen alfa-SN co-segregan con formas familiares raras de parkinsonismo (Kruger et al., *Nature Gen.* (1998) 18:106-8; Polymeropoulos MH, et al., *Science* (1997) 276: 2045-7) y, (3) su sobreexpresión en ratones transgénicos (Masliah et al., *Science* (2000) 287:1265-9) y *Drosophila* (Feany et al., *Nature* (2000) 404: 394-8) imitan varios aspectos patológicos de la EP. Por lo tanto, el hecho de que la acumulación de alfa-SN en el cerebro se asocie con alteraciones morfológicas y neurológicas similares en especies tan diversas como los humanos, los ratones y las moscas sugiere que esta molécula contribuye al desarrollo de la EP.

45 **[0005]** Un fragmento de alfa-SN, previamente determinado para ser un constituyente de las placas amiloides EA, se denominó el componente de amiloide no beta (no-A β) de amiloide EA (NAC) (Iwai A., *Biochim. Biophys. Acta* (2000) 1502: 95-109); Masliah y otros, *AM. J. Pathol* (1996) 148: 201-10; Ueda y otros, *Proc. Natl Acad Sci. EE.UU.* (1993) 90:11282-6). Aunque no se conoce la función precisa de la NAC, puede tener un papel crítico en los eventos sinápticos, como la plasticidad neural durante el desarrollo, y el aprendizaje y la degeneración de las terminales nerviosas en condiciones patológicas en ECL, EA y otros trastornos (Hasimoto et al., *Alpha-Sinucleína in Lewy body disease and Alzheimer's disease*, *Brain Pathol* (1999) 9:707-20; *Masliah, et al., (2000)*. Masliah et al. (2005) *Neuron* 46: 857-68 describe la inmunización de alfa-sinucleína en un modelo de ratón de la enfermedad de Parkinson.

55 **[0006]** EA, EP y demencia con cuerpos de Lewy (DCL) son los trastornos neurodegenerativos más comúnmente encontrados en los ancianos. Aunque su incidencia sigue aumentando, creando un grave problema de salud pública, hasta la fecha, estos trastornos no son curables ni evitables. Estudios epidemiológicos recientes han demostrado una estrecha relación clínica entre la EA y la EP, ya que aproximadamente el 30% de los pacientes con Alzheimer también tienen EP. En comparación con el resto de la población que envejece, los pacientes con EA son, por lo tanto, más propensos a desarrollar EP concomitante. Además, los pacientes con EP que se vuelven locos generalmente han desarrollado EA clásica. Aunque cada enfermedad neurodegenerativa parece tener una predilección por regiones cerebrales específicas y poblaciones celulares, lo que resulta en características patológicas distintas, EP, EA, DCL y ECL también comparten características patológicas comunes. Los pacientes con EA familiar, síndrome de Down o EA esporádica desarrollan LB en la amígdala, que son las características neuropatológicas clásicas de la EP. Además, cada enfermedad está asociada con la degeneración de las neuronas, las conexiones sinápticas interneuronales y, finalmente, la muerte celular, el agotamiento de los neurotransmisores y la acumulación anormal de proteínas mal plegadas, cuyos precursores participan en la función normal del sistema

nervioso central. Los estudios bioquímicos han confirmado la relación entre EA, EP y DCL.

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

[0008] El alfa-SN es parte de una gran familia de proteínas que incluye la sinucleína beta y gamma y la sinoretina. Alfa-SN se expresa en el estado normal asociado con las sinapsis y se cree que desempeña un papel en la plasticidad neuronal, el aprendizaje y la memoria. Se han identificado mutaciones en el alfa-SN humano (h) que mejoran la agregación del alfa-SN (Ala30Pro y Ala53Thr) y se asocian con formas raras de formas autosómicas dominantes de la EP. Se desconoce el mecanismo por el cual estas mutaciones aumentan la propensión de alfa-SN a agregarse.

[0009] A pesar de que un número de mutaciones se puede encontrar en APP y alfa-SN en la población, la mayoría de los casos de EA y EP son esporádicos. Las formas esporádicas más frecuentes de estas enfermedades están asociadas con una acumulación anormal de A β y alfa-SN, respectivamente. Sin embargo, las razones de la acumulación excesiva de estas proteínas son desconocidas. A β es secretado por las neuronas y se acumula en las placas amiloides extracelulares. Adicionalmente, A β puede ser detectado dentro de las neuronas. Alfa-SN se acumula en inclusiones intraneuronales llamadas LB. Aunque las dos proteínas normalmente se encuentran juntas en las placas de EA neuríticas extracelulares, también se encuentran ocasionalmente juntas en inclusiones intracelulares.

[0010] Los mecanismos por los que la acumulación de alfa-SN conduce a la neurodegeneración y los síntomas característicos de EP no están claros. Sin embargo, identificar el papel de los factores que promueven y/o bloquean la agregación de alfa-SN es fundamental para la comprensión de la patogénesis de la ECL y el desarrollo de nuevos tratamientos para sus trastornos asociados. La investigación para identificar tratamientos se ha dirigido hacia la búsqueda de compuestos que reducen la agregación de alfa-SN (Hashimoto, *et al.*) o pruebas de factores de crecimiento que promuevan la regeneración y/o supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, que son las células afectadas principalmente (Djaldetti et al., *New therapies for Parkinson's disease*, *J. Neurol* (2001) 248: 357-62; Kirik et al., *Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system*, *J. Neurosci* (2000) 20: 4686-4700). Estudios recientes en un modelo de ratón transgénico de EA han demostrado que los anticuerpos contra A β 1-42 facilitan y estimulan la eliminación de amiloide del cerebro, mejoran la patología de tipo EA y dan como resultado un mejor desempeño cognitivo (Schenk et al., *Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in PDAPP mouse*, *Nature* (1999) 408:173-177; Morgan et al., *A-beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease*, *Nature* (2000) 408: 982-985; Janus et al., *A-beta peptide immunization reduces behavioral impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease*, *Nature* (2000) 408: 979-82). En contraste con las placas de amiloide extracelular que se encuentran en los cerebros de los pacientes con Alzheimer, los cuerpos de Lewy son intracelulares y los anticuerpos no suelen entrar en la célula.

[0011] Sorprendentemente, dada la naturaleza intracelular de LB en el tejido cerebral, los autores han tenido éxito en la reducción del número de inclusiones en ratones transgénicos inmunizados con sinucleína. La presente divulgación está dirigida, entre otras cosas, al tratamiento de la EP y otras enfermedades asociadas con LB mediante la administración de sinucleína, fragmentos de sinucleína, antígenos que imitan la sinucleína o fragmentos de la misma, o anticuerpos contra ciertos epítomos de sinucleína a un paciente en condiciones que generan una respuesta inmune beneficiosa en el paciente. Los autores también han logrado sorprendentemente reducir el número de inclusiones en ratones transgénicos inmunizados con A β . La presente divulgación está dirigida, entre otras cosas, al tratamiento de la EP y otras enfermedades asociadas con LB mediante la administración de A β , fragmentos de A β , antígenos que imitan A β o fragmentos de los mismos, o anticuerpos contra ciertos epítomos de A β a un paciente bajo condiciones que generan una respuesta inmune beneficiosa en el paciente. Por lo tanto, la divulgación satisface una larga necesidad de regímenes terapéuticos para prevenir o mejorar la neuropatología y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado con la EP y otras enfermedades asociadas con los LB.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN.

[0012] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-10 de la alfa-sinucleína humana, los residuos se numeran de acuerdo con SEQ ID NO: 1, para uso en terapia.

La invención proporciona además un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de alfa-sinucleína humana, y un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, los restos se numeran de acuerdo con SEQ ID NO: 1, para uso en terapia.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo quimérico o humanizado que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de alfa-sinucleína, numerándose los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, y un vehículo farmacéutico, para uso en terapia.

La invención proporciona además un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de alfa-sinucleína humana, en donde el fragmento inmunogénico está libre de residuos 25-140 de alfa-sinucleína, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro.

La invención proporciona además un polipéptido eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana en donde dicho polipéptido no induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 25-69 de alfa-sinucleína humana, para uso para realizar profilaxis o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, en donde el polipéptido carece al menos los residuos 25-69 de alfa-sinucleína humana, y en donde los residuos están numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

La invención proporciona además un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de alfa-sinucleína humana, en donde el fragmento inmunogénico está libre de residuos 25-140 de alfa-sinucleína, y un polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína, dicho segundo fragmento es efectivo para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro.

Aquí se describen métodos para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación alfa-SN en el cerebro. Tales métodos implican inducir una respuesta inmunogénica contra alfa-SN. Dicha inducción se puede lograr mediante la administración activa de un inmunógeno o pasivo mediante la administración de un anticuerpo o un derivado de un anticuerpo a la sinucleína. En algunos métodos, el paciente es asintomático. En algunos métodos, el paciente tiene la enfermedad y es asintomático. En algunos métodos, el paciente tiene un factor de riesgo para la enfermedad y es asintomático. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson, y la administración del agente mejora las características motoras del paciente. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson, ya que la administración del agente previene el deterioro de las características motoras del paciente. En algunos métodos, el paciente está libre de la enfermedad de Alzheimer.

[0013] Para el tratamiento de pacientes que sufren de cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro, un régimen de tratamiento implica la administración de una dosis de alfa-SN o un fragmento activo del mismo al paciente para inducir la respuesta inmune. En algunos métodos, el alfa-SN o uno de sus fragmentos activos se administra en dosis múltiples durante un período de al menos seis meses. El alfa-SN o uno de sus fragmentos activos pueden administrarse, por ejemplo, periféricamente, intraperitonealmente, oralmente, subcutáneamente, intracranealmente, intramuscularmente, tópicamente, intranasalmente o intravenosamente. En algunos métodos, el alfa-SN o un fragmento activo del mismo se administra con un adyuvante que mejora la respuesta inmune al alfa-SN o un fragmento activo del mismo. En algunos métodos, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos contra alfa-SN o un fragmento activo de la misma.

[0014] En algunos métodos, el agente es los aminoácidos 35-65 de la alfa-SN. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 130-140 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos en total. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 130-136 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos en total. En algunos métodos, los aminoácidos C-terminales del agente son el aminoácido C-terminal de alfa-SN. En algunos de los métodos anteriores, el fragmento alfa-SN o activo está vinculado a un portador en el extremo N del fragmento alfa-SN o activo. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 1-10 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos en total. En algunos métodos, los aminoácidos N-terminales del agente son los aminoácidos N-terminales de alfa-SN. En algunos de los métodos anteriores, el fragmento alfa-SN o activo está vinculado a un portador en el extremo C del fragmento alfa-SN o activo. En algunos de los métodos anteriores, el fragmento alfa-SN o activo está unido a una molécula portadora para formar un conjugado. En algunos métodos, el agente se administra a un paciente administrando un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un fragmento alfa-SN.

[0015] Para el tratamiento de pacientes que sufren de cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro, un régimen de tratamiento implica la administración de una dosis de un anticuerpo a la alfa-SN o un fragmento activo del mismo al paciente para inducir la respuesta inmune. El anticuerpo utilizado puede ser humano, humanizado, quimérico o policlonal y puede ser monoclonal o policlonal. En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es una IgG1 humana. En algunos métodos, el anticuerpo se prepara a partir de un humano inmunizado con péptido alfa-SN y el humano puede ser el paciente a tratar con un anticuerpo. En algunos métodos, el anticuerpo se une a la superficie externa de las células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy. En

algunos métodos, el anticuerpo se internaliza dentro de las células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy.

5 **[0016]** En algunos procedimientos, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica. En algunos métodos, el anticuerpo se administra en una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferiblemente, al menos 1 mg/kg de peso corporal. En algunos métodos, el anticuerpo se administra en dosis múltiples durante un período prolongado, por ejemplo, al menos seis meses. En algunos métodos, los anticuerpos pueden administrarse como una composición de liberación sostenida. El anticuerpo puede administrarse, por ejemplo, de manera periférica, intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosa. En algunos métodos, se monitoriza al paciente para determinar el nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

15 **[0017]** En algunos procedimientos, el anticuerpo se administra mediante la administración de un polinucleótido que codifica al menos una cadena de anticuerpo al paciente. El polinucleótido se expresa para producir la cadena de anticuerpos en el paciente. Opcionalmente, el polinucleótido codifica cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y el polinucleótido se expresa para producir las cadenas pesadas y ligeras en el paciente.

20 **[0018]** Esta descripción proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos a la alfa-SN descritos en esta solicitud y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 **[0019]** La descripción también proporciona procedimientos de prevención o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación alfa-SN en el cerebro que comprende la administración de un agente que induce una respuesta inmunogénica contra alfa-SN, y que comprende además la administración de un segundo agente que induce una respuesta inmunogénica contra A β al paciente. En algunos métodos, el agente es A β o un fragmento activo del mismo. En algunos métodos, el agente es un anticuerpo para A β .

30 **[0020]** La descripción también proporciona procedimientos de prevención o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro que comprende administrar un agente que induce una respuesta inmunogénica contra A β a un paciente. En algunos métodos, el agente es A β o un fragmento activo del mismo. En algunos métodos, el agente es un anticuerpo para A β . En algunos métodos la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, el paciente está libre de la enfermedad de Alzheimer y no tiene factores de riesgo. En algunos métodos, comprende además monitorizar un signo o síntoma de la enfermedad de Parkinson en el paciente. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson y la administración del agente produce una mejoría en un signo o síntoma de la enfermedad de Parkinson.

35 **[0021]** Esta descripción proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica contra un componente de un cuerpo de Lewy en un paciente, tal como se ha descrito anteriormente, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En algunos compuestos, el agente es alfa-SN o un fragmento activo, por ejemplo, NAC, o cualquiera de los fragmentos C-terminales descritos en la aplicación. La descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo específico para un componente de un cuerpo de Lewy.

40 **[0022]** Esta descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un agente eficaz para provocar una respuesta inmune contra un componente sinucleína-NAC de una placa amiloide en un paciente. En algunos compuestos, el agente es alfa-SN o un fragmento activo, por ejemplo, NAC, o cualquiera de los fragmentos C-terminales de alfa-sinucleína descritos en la solicitud, y, opcionalmente, un adyuvante. En otros compuestos, el agente es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a alfa-SN o un fragmento del mismo y, opcionalmente, un vehículo farmacéutico.

45 **[0023]** La descripción también proporciona procedimientos de cribado de un anticuerpo para la actividad en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con cuerpos de Lewy. Tales métodos implican poner en contacto una célula neuronal que expresa sinucleína con el anticuerpo. Luego, se determina si el contacto reduce los depósitos de sinucleína en las células en comparación con las células de control que no se pusieron en contacto con el anticuerpo.

50 **[0024]** La descripción también proporciona procedimientos de cribado de un anticuerpo para la actividad en el tratamiento o prevención de una enfermedad de cuerpos de Lewy en el cerebro de un paciente. Tales métodos implican poner en contacto el anticuerpo con un polipéptido que comprende al menos cinco aminoácidos contiguos de alfa-SN. Luego, se determina si el anticuerpo se une específicamente al polipéptido, la unión específica proporciona una indicación de que el anticuerpo tiene actividad en el tratamiento de la enfermedad. La descripción proporciona además métodos para realizar profilaxis o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. El método comprende administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, siendo los residuos numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, efectuando así la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad.

5 **[0025]** Opcionalmente, el fragmento inmunogénico de la alfa-sinucleína es libre de residuos 1-69 de alfa-sinucleína, los residuos se numeran de acuerdo con SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a la alfa-sinucleína humana dentro de un epítipo seleccionado del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128 y SN124-140, numerándose los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica está libre de anticuerpos que se unen específicamente a residuos de alfa-sinucleína humana fuera del epítipo seleccionado. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene de 5 a 20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 70-140 de alfa-sinucleína, y los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene de 5 a 20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 120 y 140 de la alfa-sinucleína, numerándose los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN87-97, SN111-121, SN114-124 y SN128-136, y contiene no más de 40 residuos contiguos en total de alfa-sinucleína, siendo los residuos numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende SN125-140 y no contiene más de 40 residuos contiguos en total de alfa-sinucleína, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende SN130-140 y contiene no más de 40 residuos contiguos en total de alfa-sinucleína, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende SN83-140, numerándose los residuos según SEQ ID NO: 1.

20 **[0026]** Opcionalmente, el fragmento inmunogénico se selecciona de un grupo que consiste en SN124-140, SN125-140, SN126-140, SN127-140, SN128-140, SN 129-140, SN130-140, SN131-140, SN132-140, SN133-140, SN134-140, SN135-140, SN136-140, SN137-140, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN129-139, SN130-139, SN131-139, SN132-139, SN133-139, SN134-139, SN135-139, SN136-139, SN137-139, SN124-138, SN124-138, SN125-138, SN126-138, SN127-138, SN128-138, SN 129-138, SN130-138, SN131-138, SN132-138, SN133-138, SN134-138, SN135-138, SN136-138, SN124-137, SN125-137, SN126-137, SN127-137, SN128-137, SN 129-137, SN130-137, SN131-137, SN132-137, SN133-137, SN134-137, SN135-137, SN124-136, SN125-136, SN126-136, SN127-136, SN128-136, SN 129-136, SN130-136, SN131-136, SN132-136, SN133-136, y SN134-136, numerándose los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

30 **[0027]** Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa-sinucleína humana dentro de un epítipo seleccionado del grupo que consiste en SN1-20, SN2-21, SN2-23 y SN1-40, numerándose los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica está libre de anticuerpos que se unen específicamente a residuos de alfa-sinucleína humana dentro de la región SN25-69, SN25-140, SN40-69, SN40-140 o SN70-140. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene de 5 a 20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 1-40 de alfa-sinucleína, y los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene de 5 a 20 aminoácidos contiguos de entre las posiciones 120 y 140 de alfa-sinucleína, numerándose los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico no contiene más de 40 residuos contiguos en total de alfa-sinucleína, numerándose los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

45 **[0028]** Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa-sinucleína humana dentro de un epítipo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y dentro de un epítipo dentro de los residuos 70-140 de la alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a la alfa-sinucleína humana dentro de un epítipo dentro de los residuos 1-20 de la alfa-sinucleína humana y dentro de un epítipo dentro de los residuos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica no comprende anticuerpos que se unen específicamente a la alfa-sinucleína humana dentro de un epítipo dentro de los residuos 41 y 119 de la alfa-sinucleína humana.

50 **[0029]** Opcionalmente, el fragmento inmunogénico está ligado a un portador para formar un conjugado. Opcionalmente, el polipéptido comprende el fragmento inmunogénico fusionado al portador. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico está unido a la molécula portadora en el extremo C del fragmento de alfa-sinucleína. Opcionalmente, varias copias del fragmento están interconectadas con múltiples copias del transportista. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico se administra con un adyuvante. Opcionalmente, el paso de administración efectúa al menos una eliminación parcial de cuerpos de Lewy. Opcionalmente, el paso de administración desagrega los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, la etapa de administración reduce los niveles de oligómeros de alfa-sinucleína en las sinapsis. Opcionalmente, la etapa de administración elimina la sinucleína mediante la activación de una vía lisosomal.

60 **[0030]** Opcionalmente, la respuesta inmunogénica es inducida por la administración de una única proteína o polipéptido de fusión. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica se induce mediante la administración de más de un polipéptido (por ejemplo, dos polipéptidos). Opcionalmente, la respuesta inmunogénica se induce mediante la administración de un primer polipéptido que comprende un primer fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana, y administrando un polipéptido que comprende un segundo

fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140, y preferiblemente los residuos 120-140, de alfa-sinucleína humana.

5 **[0031]** Opcionalmente, la respuesta inmunogénica es inducida por la administración de dos o más polipéptidos en combinación. Opcionalmente, los dos o más polipéptidos son coadministrados y/o formulados conjuntamente.

10 **[0032]** La descripción también proporciona una composición que comprende un primer polipéptido que comprende un primer fragmento inmunogénico de la alfa-sinucleína y un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunogénico de la alfa-sinucleína, en el que el primer fragmento inmunogénico es eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y el segundo fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína es eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, la composición está libre de un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína que comprende los residuos 25-69 de alfa-sinucleína. Los fragmentos inmunogénicos primero y segundo pueden estar unidos físicamente (por ejemplo, como un conjugado o proteína de fusión). Se pueden co-formular los fragmentos inmunogénicos primero y segundo.

20 **[0033]** También se describen métodos de efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. En una realización, los métodos comprenden la administración a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad de un régimen eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, siendo los números numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. En otra realización, los métodos comprenden administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad un régimen eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-40 de alfa-sinucleína humana, siendo numerados los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. En otra realización más, los métodos comprenden administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad un régimen eficaz de un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-40 de alfa-sinucleína humana y un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

30 **[0034]** Cuando el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, los residuos se numeran de acuerdo con SEQ ID NO: 1. opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 83-140 de alfa humana sinucleína, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente dentro de un epítipo dentro de un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128 y SN124-140, numerándose los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

40 **[0035]** Cuando el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-40 de la alfa-sinucleína humana, los residuos se numeran de acuerdo con SEQ ID NO: 1. opcionalmente el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20, o dentro de los residuos 1-10, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

45 **[0036]** Cuando un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-40 de la alfa-sinucleína humana y un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. opcionalmente, el segundo anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se administran simultáneamente. Opcionalmente, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se administran en el mismo curso de tratamiento.

50 **[0037]** Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Opcionalmente, el anticuerpo es una población policlonal de anticuerpos que carecen de unión específica a residuos de alfa-sinucleína fuera del epítipo. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo del isotipo IgG1 humano. Opcionalmente, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica. Opcionalmente, el anticuerpo se administra en una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg, preferiblemente, al menos 1 mg/kg de peso corporal. Opcionalmente, el anticuerpo se administra en dosis múltiples durante al menos seis meses. Opcionalmente, el anticuerpo se administra como una composición de liberación sostenida. Opcionalmente, el anticuerpo se administra por vía intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosa. Opcionalmente, el anticuerpo se internaliza dentro de las células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, el anticuerpo se une a la superficie externa de las células neuronales que tienen cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, el anticuerpo se une a la alfa-sinucleína en la superficie externa de las células neuronales promoviendo la reticulación de la alfa-sinucleína, en donde la etapa de administración desagrega los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, la etapa de administración reduce los niveles de oligómeros de alfa-sinucleína humanas en las sinapsis. Opcionalmente, la etapa de administración elimina la alfa-sinucleína humana mediante la activación de una vía lisosomal. En algunos métodos, la enfermedad es la

enfermedad de Parkinson. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a la alfa-sinucleína humana desnaturalizada según se determina mediante inmunotransferencia. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a la alfa-sinucleína humana desnaturalizada con una afinidad de al menos 10^9 M^{-1} . Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a las sinapsis según lo determinado por la inmunocitoquímica.

[0038] La descripción también proporciona una composición para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, que comprende un primer anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y un segundo anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 (y preferiblemente los residuos 120-140) de alfa-sinucleína humana, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

[0039] La descripción también proporciona un kit para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, que comprende un primer recipiente que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los restos 1-20 de alfa-sinucleína humana y un segundo recipiente que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 (y preferiblemente los residuos 120-140) de alfa-sinucleína humana, los residuos se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

[0040] La descripción proporciona además métodos para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. Los métodos comprenden administrar a un paciente que padece o está en riesgo de la enfermedad un régimen eficaz de un agente que induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, los números se numeran de acuerdo con la SEQ. ID NO:1, efectuando así la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica está libre de anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-69 de la alfa-sinucleína humana, siendo numerados los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente dentro de un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionada del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128 y SN124-140, siendo numerados los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

[0041] La descripción proporciona además métodos de cribado para un agente que tiene actividad útil en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy. Los métodos comprenden poner en contacto el agente con un animal no humano transgénico dispuesto para desarrollar una característica de una enfermedad del cuerpo de Lewy con el agente; y determinar si el agente afecta la extensión o la velocidad de desarrollo de la característica en relación con un animal no humano transgénico de control. El agente es (i) un fragmento de alfa-sinucleína que induce anticuerpos que se unen específicamente a al menos un epítipo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana o (ii) un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo con residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, numerándose los residuos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

[0042] Opcionalmente, el animal no humano transgénico comprende un transgén que expresa alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, el método comprende además examinar una pluralidad de anticuerpos de prueba para unirse a la alfa-sinucleína humana desnaturalizada, y seleccionar el anticuerpo de unión más alta como el agente. Opcionalmente, el método comprende además seleccionar una pluralidad de anticuerpos de prueba para unirse a depósitos de sinucleína en una sección de tejido mediante inmunocitoquímica, y seleccionar el anticuerpo de unión más alta como el agente.

[0043] La descripción proporciona además un método de humanizar el anticuerpo monoclonal 8A5 o 6H7, que comprende: la determinación de la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR del anticuerpo monoclonal; seleccionar un anticuerpo aceptor; y producir un anticuerpo humanizado que comprende las CDR del anticuerpo monoclonal y los marcos de región variable del anticuerpo aceptor.

[0044] La descripción proporciona además un método de producción de una forma quimérica del anticuerpo monoclonal 8A5 o 6H7, que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal; selección de región constante de cadena pesada y ligera; producir un anticuerpo quimérico que comprende una cadena ligera que comprende la región variable de la cadena ligera fusionada con la región constante de la cadena ligera, y una cadena pesada que comprende la región variable de la cadena pesada fusionada con la región constante de la cadena pesada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0045]

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

FIG. 2 muestra secciones de cerebro inmunohistoteñido de ratones no transgénicos (paneles A, E y I), ratones transgénicos alfa-SN inmunizados con adyuvante solo (paneles B,F, J) y ratones transgénicos alfa-SN inmunizados con alfa-SN que se desarrolló bajo títulos (paneles C, G y K) y títulos altos (paneles D, H e I) de anticuerpos contra alfa-SN. Las secciones se sometieron a tinción con un anticuerpo anti-alfa-sinucleína para detectar los niveles de sinucleína (paneles EA), un anticuerpo anti-IgG para determinar los niveles totales de IgG presentes en la sección (paneles EH) y para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador de células astrogiales.

FIG. 3 muestra los efectos del anticuerpo policlonal anti-mSYN en la agregación de sinucleína en células GT1-7 transfectadas según se observa por microscopía óptica.

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

FIG. 5 muestra los resultados de estudios sobre el efecto de deposición inmunización amiloide A β 1-42 en los cerebros de los ratones no transgénicos, SYN, APP y transgénicos SYN/APP. Los niveles de amiloide detectables observados en los ratones APP y SY N/APP se reducen mediante la inmunización A β 1-42.

FIG. 6 muestra los resultados de los estudios del efecto de la inmunización con A β 1-42 sobre la formación de inclusión de sinucleína en los cerebros de ratones no transgénicos, SYN, APP y SYN/APP transgénicos. Las inclusiones de sinucleína detectadas en ratones SYN y SYN/APP se reducen mediante la inmunización A β 1-42.

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

FIG. 8 muestra el mapeo de epítomos de anticuerpos. Anticuerpos de ratones que muestran títulos altos y afinidad alta y anticuerpos anti-sinucleína α humanos se mapearon usando una técnica ELISA. En la mayoría de las muestras de sueros de ratones vacunados, los epítomos reconocidos estaban dentro de la región C-terminal de la α -sinucleína humana. En los sueros de los controles tratados con CFA, no se detectaron epítomos.

FIG. 9 muestra el análisis de imagen de los niveles de inmunorreactividad de α -sinucleína humana y otros marcadores de generación de neurodosis. (A) Número medio de inclusiones positivas de α -sinucleína en la corteza temporal. La vacunación con α -sinucleína humana resultó en una disminución no significativa en el número de inclusiones en comparación con los controles. Este efecto fue más pronunciado en ratones del grupo II en comparación con el grupo I. (B) Área de porcentaje del neuropil ocupado por terminales sinaptofisina-inmunoreactivos en la corteza frontal. En los ratones transgénicos (tg) tratados con CFA solo, el número de terminales inmunolaqueados con sinaptofisina disminuyó en un 20%, mientras que los niveles de inmunorreactividad a sinaptofisina por sinapsis no cambiaron. (C) Los niveles de inmunorreactividad a CD45 (marcador microglial) en la corteza temporal fueron ligeramente más altos en los cerebros de ratones vacunados con α -sinucleína humana. (D) Área de porcentaje del neuropil de terminales inmunoreactivos de α -sinucleína humana ocupados en la corteza temporal. En los ratones tg vacunados con α -sinucleína humana, hubo una disminución en la acumulación de α -sinucleína en los terminales inmunoreactivos a la sinaptofisina. * = diferencia significativa en comparación con los ratones t- α -sinucleína humanos tratados con CFA solo ($p < 0,05$, prueba T de Student).

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

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

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

DEFINICIONES

[0046] El término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos 65 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 80 o 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia o más (p. ej., 99 por ciento de identidad de

secuencia o más). Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren por sustituciones conservativas de aminoácidos.

[0047] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula luego el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros de programa designados.

[0048] La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, *p. ej.*, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase *en general* Ausubel *et al.*, *supra*). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). El software para realizar los análisis de BLAST está disponible públicamente a través del sitio web del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI). Normalmente, los parámetros de programa predeterminados se pueden usar para realizar la comparación de secuencias, aunque también se pueden usar parámetros personalizados. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valor predeterminado una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89, 10915 (1989)).

[0049] Para los propósitos de clasificación de sustituciones de aminoácidos como ácidos conservativas o no conservativas, aminoácidos son agrupados del siguiente modo: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

[0050] Los agentes terapéuticos de la invención son típicamente sustancialmente puros a partir de contaminante no deseado. Esto significa que un agente es típicamente de al menos aproximadamente un 50% p/p (peso/peso) de pureza, además de estar sustancialmente libre de proteínas y contaminantes que interfieren. A veces, los agentes son al menos aproximadamente 80% p/p y, más preferiblemente, al menos 90 o aproximadamente 95% p/p de pureza. Sin embargo, utilizando técnicas convencionales de purificación de proteínas, se pueden obtener péptidos homogéneos de al menos el 99% p/p.

[0051] La frase que una molécula "se une específicamente" a una diana se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la molécula en presencia de una población heterogénea de otros productos biológicos. Por lo tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, una molécula específica se une preferentemente a un objetivo particular y no se une en una cantidad significativa a otros productos biológicos presentes en la muestra. La unión específica de un anticuerpo a una diana en tales condiciones requiere que el anticuerpo sea seleccionado por su especificidad a la diana. Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos de ELISA en fase sólida se utilizan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. *Consulte*, por ejemplo, Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para obtener una descripción de los formatos de inmunoensayo y las condiciones que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica. Unión específica entre dos entidades significa una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M⁻¹ o 10^{10} M⁻¹. Se prefieren las afinidades mayores de 10^8 M⁻¹.

[0052] El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se usa para incluir anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del cual se derivaron para la unión específica a un antígeno. Los fragmentos incluyen cadenas pesadas, cadenas ligeras, Fab, Fab' F(ab')₂, Fabc y Fv. Los fragmentos se producen por técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye una o más cadenas de inmunoglobulina que están conjugadas químicamente a, o expresadas como, proteínas de fusión con otras proteínas. El término "anticuerpo" también incluye anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990); Kostelny y col., *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992). El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos de cadena única en los que los dominios variables de las cadenas pesada y ligera están vinculados a través de un espaciador.

- 5 **[0053]** La APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰ se refieren, respectivamente, a los polipéptidos de 695, 751 y 770 residuos de aminoácidos de longitud codificados por el gen de la APP humana. Véase Kang et al., Nature 325, 773 (1987); Ponte et al., Nature 331, 525 (1988); y Kitaguchi et al., Nature 331, 530 (1988). Los aminoácidos que se encuentran en la proteína precursora de amiloide humana (APP) se asignan a números de acuerdo con la secuencia de la isoforma APP770. Términos tales como A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43 se refieren a un péptido A β que contiene los residuos de aminoácidos 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 y 1-43.
- 10 **[0054]** Un "antígeno" es una entidad a la que se une específicamente un anticuerpo.
- 15 **[0055]** El término "epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que responden células B y/o T. Los epítomos de células B pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más generalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítomos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p. ej., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. Las células T reconocen epítomos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para células CD8 o aproximadamente 13-15 aminoácidos para células CD4. Células T que reconocen el epítopo pueden identificarse mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, como se determina por incorporación ³H-timidina por las células T cebadas en respuesta a un epítopo (Burke et al., J. Inf. Dis. 170, 1110-19 (1994)), por destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges et al., J. Immunol. 156, 3901-3910) o por secreción de citoquinas.
- 20 **[0056]** El término respuesta "inmunológica" o "inmune" es el desarrollo de una respuesta humoral beneficiosa (mediada por anticuerpo) y/o una respuesta celular (mediada por células T específicas de antígeno o sus productos de secreción) dirigida contra un péptido amiloide en un paciente receptor. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa inducida por la administración de un inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpos o células T cebadas. Se provoca una respuesta inmunitaria celular mediante la presentación de epítomos polipeptídicos en asociación con moléculas MHC de Clase I o Clase II para activar células auxiliares T CD4⁺ específicas de antígeno y/o células T citotóxicas CD8⁺. La respuesta también puede implicar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de microglía, eosinófilos u otros componentes de la inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante ensayos de proliferación (células T CD4⁺) o ensayos CTL (linfocitos T citotóxicos) (véase Burke, *supra*; Tigges, *supra*). Las contribuciones relativas de las respuestas humorales y celulares al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno se pueden distinguir aislando por separado los anticuerpos y las células T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.
- 30 **[0057]** Un "agente inmunogénico" o "inmune" es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí misma en la administración a un mamífero, opcionalmente junto con un adyuvante.
- 35 **[0058]** El término "todo-D" se refiere a péptidos que tienen $\geq 75\%$, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, y 100% de aminoácidos D-configuración.
- 40 **[0059]** El término "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido no complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos se clonan a veces en un vector plásmido.
- 45 **[0060]** El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra junto con un antígeno aumenta la respuesta inmune al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmune al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar la respuesta inmunitaria mediante varios mecanismos, incluido el reclutamiento de linfocitos, la estimulación de las células B y/o T, y la estimulación de los macrófagos.
- 50 **[0061]** El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento ya sea profiláctico o terapéutico.
- 55 **[0062]** La competición entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que la inmunoglobulina sometida a prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, como el alfa-SN. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competencia en sándwich (véase Stahli et al., Methods in Enzymology 9: 242- 253 (1983)); EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (véase Kirkland et al., J. Immunol. 137: 3614-3619 (1986)); ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo intercalado directo marcado en fase sólida (véase Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de la etiqueta de fase sólida utilizando la etiqueta 1-125 (véase Morel et al., Molec. Immunol. 25 (1): 7-15 (1988)); EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (Cheung et al., Virology 176: 546-552 (1990)); y RIA

5 marcado directo (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32: 77-82 (1990)). Típicamente, un ensayo de este tipo implica el uso de un antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que contienen cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Por lo general, la prueba de inmunoglobulina está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por ensayos de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente proximal al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que ocurra un impedimento estérico. Generalmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos un 50% o un 75%.

10 **[0063]** El término "síntoma" o "síntoma clínico" se refiere a una prueba subjetiva de una enfermedad, tal como marcha alterada, como percibida por el paciente. Un "signo" se refiere a la evidencia objetiva de una enfermedad observada por un médico.

15 **[0064]** La frase "en combinación", cuando se refiere a la administración de dos o más anticuerpos alfa-sinucleína anti-humano (es decir, reconociendo cada uno un epítipo diferente) o la administración de dos o más polipéptidos o inmunógenos que inducen una respuesta de anticuerpos contra la alfa-sinucleína humana, incluye la administración simultánea y la administración en el mismo curso de tratamiento. Administración simultánea de agentes abarca la administración de los agentes como proteína de fusión o conjugada (p. ej., físicamente vinculados entre sí), una co-formulación (por ejemplo., en donde los agentes se combinan o se componen en una forma de dosificación, por ejemplo, una formulación de liberación sostenida o de depósito), la administración como composiciones separadas dentro de unos pocos minutos o dos horas entre sí (administración conjunta), o la administración como composiciones separadas en el mismo día. La administración en el mismo curso de tratamiento significa que ambos agentes se administran a un paciente para el tratamiento o la profilaxis de la misma condición. Cada agente puede ser administrado una o varias veces. Por ejemplo, un agente podría administrarse primero y el segundo agente administrarse el día siguiente o la semana siguiente. De manera similar, los dos agentes pueden administrarse cada uno más de una vez, por ejemplo, en días consecutivos, días alternos, semanas alternas o según otros programas (por ejemplo, de manera que se espera que el beneficio para el paciente exceda el de la administración de cualquiera de los agentes solo).

20 **[0065]** Un fragmento designado en forma SNx-y significa un fragmento de alfa-sinucleína que comienza en el aminoácido X y termina en el aminoácido Y. Tal fragmento puede estar unido a un polipéptido heterólogo, pero no a otros aminoácidos de la alfa-sinucleína humana tal que el fragmento comienza antes de X o termina después de Y.

25 **[0066]** Los residuos en alfa-sinucleína o un fragmento de la misma están numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 1 cuando alfa-sinucleína o el fragmento es máximamente alineado con SEQ ID NO: 1 como se describió anteriormente utilizando parámetros predeterminados.

30 **[0067]** Las composiciones o métodos "que comprenden" uno o más elementos recitados pueden incluir otros elementos no recitados específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende péptido alfa-SN abarca tanto un péptido alfa-SN aislado como un péptido alfa-SN como un componente de una secuencia polipeptídica más grande.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. General

40 **[0068]** La invención proporciona anticuerpos para uso en métodos de prevención o tratamiento de varias enfermedades y condiciones caracterizadas por la presencia de depósitos de péptido alfa-SN agregados a una masa insoluble en el cerebro de un paciente, en forma de cuerpos de Lewy. Dichas enfermedades se conocen colectivamente como enfermedades del cuerpo de Lewy (ECL) e incluyen la enfermedad de Parkinson (EP). Dichas enfermedades se caracterizan por agregados de alfa-SN que tienen una estructura de lámina con pliegue β y se tiñen con tioflavina-S y rojo Congo (véase Hasimoto, *Ibid*). Los métodos para prevenir o tratar tales enfermedades utilizan un agente que puede generar una respuesta inmunogénica a alfa-SN. La respuesta inmunogénica actúa para prevenir la formación de depósitos de sinucleína o eliminarlos de las células del cerebro. Aunque una comprensión del mecanismo no es esencial para la práctica de la invención, la respuesta inmunogénica puede inducir la eliminación como resultado de anticuerpos contra la sinucleína que se internalizan dentro de las células solas o con la alfa-sinucleína. Los resultados presentados en los Ejemplos muestran que los anticuerpos contra la alfa-sinucleína administrados de forma periférica cruzan la barrera hematoencefálica y se internalizan, ya sea solos o con alfa-sinucleína, dentro de las células que contienen depósitos de alfa-sinucleína. Los anticuerpos internalizados pueden promover la degradación de la alfa-sinucleína mediante la activación de las vías lisosómicas. Los anticuerpos internalizados con afinidad por la alfa-sinucleína en forma desnaturalizada también pueden estabilizar la molécula en forma no agregada. De forma alternativa o adicional, los anticuerpos pueden interferir con la agregación de sinucleína en la superficie exterior de la célula. Por ejemplo, los anticuerpos contra la alfa-sinucleína pueden reconocer y reticular proteínas conformadas anormalmente en la superficie de las células

neuronales. En algunos métodos, la respuesta de eliminación puede efectuarse, al menos en parte, por la fagocitosis mediada por el receptor Fc. La inmunización con sinucleína puede reducir la acumulación de sinucleína en las sinapsis y los cuerpos celulares neuronales en el cerebro. Aunque una comprensión del mecanismo no es esencial para la práctica de la invención, este resultado puede explicarse por los anticuerpos contra la sinucleína que son absorbidos por las células neuronales (por ejemplo, por las vesículas sinápticas).

[0069] Opcionalmente, los agentes que generan una respuesta inmunogénica contra alfa-SN se pueden usar en combinación con agentes que generan una respuesta inmunogénica a A β . La respuesta inmunogénica es útil para eliminar los depósitos de A β en individuos que tienen tales depósitos (por ejemplo, individuos que tienen tanto la enfermedad de Alzheimer como la de Parkinson); sin embargo, la respuesta inmunogénica también tiene actividad en la eliminación de los depósitos de sinucleína. Por lo tanto, la presente descripción utiliza dichos agentes solos, o en combinación con agentes que generan una respuesta inmunogénica a alfa-SN en individuos con ECL pero que no están sufriendo o están en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

[0070] La descripción proporciona además composiciones farmacéuticas y métodos para prevenir y tratar la enfermedad amiloideogénica. Se ha demostrado que la alfa y beta-sinucleína están involucradas en la nucleación de depósitos de amiloide en ciertas enfermedades amiloides, en particular la enfermedad de Alzheimer. (Clayton, DF, et al., TINS 21(6): 249-255, 1998). Más específicamente, se ha aislado un fragmento del dominio NAC de alfa y beta-sinucleína (residuos 61-95) a partir de placas amiloides en pacientes con Alzheimer; de hecho, este fragmento comprende aproximadamente el 10% de la placa que permanece insoluble después de la solubilización con dodecil sulfato de sodio (SDS). (George, JM, et al. Neurosci. News 1:12-17, 1995). Además, se ha informado que tanto el alfa-SN de longitud total como el fragmento NAC del mismo aceleran la agregación del péptido β -amiloide en amiloide insoluble *in vitro*. (Clayton, *supra*). El componente NAC de las placas amiloides sirve como un objetivo para los tratamientos de base inmunológica de la presente invención, como se detalla a continuación. De acuerdo con un aspecto, la descripción incluye composiciones farmacéuticas que comprenden agentes eficaces para provocar una respuesta inmune contra un componente de sinucleína-NAC de una placa amiloide en un paciente. Dichas composiciones pueden ser eficaces para prevenir, retardar o reducir la deposición de placa en la enfermedad amiloide.

II. AGENTES QUE GENERAN UNA RESPUESTA INMUNOGÉNICA CONTRA LA ALFA SINUCLEINA

[0071] Una respuesta inmunogénica puede ser activa, como cuando se administra un inmunógeno para inducir anticuerpos reactivos con alfa-SN en un paciente, o pasiva, cuando se administra un anticuerpo que sí se une a la alfa-SN en un paciente.

1. Agentes que inducen la respuesta inmune activa

[0072] Los agentes terapéuticos inducen una respuesta inmunogénica dirigida específicamente a ciertos epítomos en el péptido alfa-SN. Los agentes preferidos son el propio péptido alfa-SN y sus fragmentos. La Solicitud de Estados Unidos N° 60/471.929 presentada el 19 de mayo de 2003, y la publicación de patente PCT WO 05/013889 describe nuevos fragmentos de alfa-sinucleína que pueden usarse como agentes terapéuticos, opcionalmente, en combinación con un adyuvante. También se pueden usar variantes de tales fragmentos, análogos y miméticos del péptido alfa-SN natural que inducen y/o reaccionan de forma cruzada con anticuerpos contra los epítomos preferidos del péptido alfa-SN. La Solicitud de Estados Unidos N° 60/471.929 presentada el 19 de mayo de 2003, y la publicación de patente PCT WO 05/013889 proporciona nuevos fragmentos de alfa-sinucleína útiles en métodos de prevención y tratamiento de la enfermedad sinucleinopática y amiloideogénica. Opcionalmente, estos fragmentos pueden usarse en combinación con un adyuvante.

[0073] La alfa-sinucleína se identificó originalmente en los cerebros humanos como la proteína precursora del componente no β -amiloide de (NAC) de placas de EA. (Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90 (23):11282-11286 (1993). Alfa-SN, también denominado precursor del componente no A β del amiloide EA (NACP), es un péptido de 140 aminoácidos. Alfa-SN tiene la secuencia de aminoácidos:

```
MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVV
HGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNE
EGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPAA (SEQ ID NO:1)
```

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

[0074] El componente no A β de amiloide EA (NAC) se deriva de alfa-SN. NAC, un dominio altamente hidrofóbico dentro de la alfa-sinucleína, es un péptido que consta de al menos 28 residuos de aminoácidos (residuos 60-87) (SEQ ID NO: 3) y opcionalmente 35 residuos de aminoácidos (residuos 61-95) (SEQ ID NO: 2). Consulte la Fig. 1, NAC muestra una tendencia a formar una estructura de hoja beta (Iwai, et al., Biochemistry, 34:10139-10145).

Jensen *et al.* han informado que NAC tiene la secuencia de aminoácidos:
EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV (SEQ ID NO: 2)
(Jensen et al., Biochem. J. 310 (Pt 1): 91-94 (1995); número de acceso de GenBank S56746).

5 **[0075]** Ueda *et al.* se han informado que NAC tiene la secuencia ácida:
KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (SEQ ID NO: 3)
(Ueda et al., PNAS EE.UU. 90:11282-11286 (1993).

10 **[0076]** El alfa-SN desagregado o fragmentos del mismo, incluyendo NAC, significa unidades peptídicas
monoméricas. El alfa-SN desagregado o sus fragmentos son generalmente solubles y son capaces de
autoagregación para formar oligómeros solubles. Los oligómeros de alfa-SN y sus fragmentos son generalmente
solubles y existen principalmente como hélices alfa. El alfa-SN monomérico se puede preparar *in vitro* disolviendo el
15 péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La solución resultante se centrifuga para eliminar cualquier
partícula insoluble. El alfa-SN agregado o sus fragmentos, incluido el NAC, significa oligómeros del alfa-SN o
fragmentos del mismo que se asocian en conjuntos de láminas beta insolubles. El alfa-SN agregado o sus
fragmentos, incluido el NAC, significa también polímeros fibrilares. Las fibrillas son generalmente insolubles. Algunos
anticuerpos se unen a alfa-SN soluble o fragmentos del mismo o agregados alfa-SN o fragmentos del mismo.
Algunos anticuerpos se unen a oligómeros de alfa-sinucleína con más fuerza que a formas monoméricas o fibrilares.
Algunos anticuerpos se unen tanto al alfa-SN soluble como al agregado o fragmentos del mismo, y opcionalmente
20 también a formas oligoméricas.

[0077] El alfa-SN, el componente principal de los cuerpos de Lewy característicos de la EP, y los fragmentos
epitópicos de los mismos, tales como, por ejemplo, NAC, o fragmentos distintos de NAC, se pueden usar para
inducir una respuesta inmunogénica. Preferiblemente, tales fragmentos comprenden cuatro o más aminoácidos de
25 alfa-SN o análogos de los mismos. Algunos fragmentos activos incluyen un epítipo en o cerca del extremo C-
terminal de la alfa-SN (p. ej., dentro de los aminoácidos 70-140, 100-140, 120-140, 130-140, o 135-140). En algunos
fragmentos activos, el residuo C-terminal del epítipo es el residuo C-terminal de alfa-SN. Otros componentes de los
cuerpos de Lewy, por ejemplo, sinfilina-1, Parkin, ubiquitina, neurofilamento, beta-cristalina y sus fragmentos
epitópicos también se pueden usar para inducir una respuesta inmunogénica.
30

[0078] Como se ha señalado, ciertos fragmentos preferidos de alfa-sinucleína son de la molécula C-terminal. Tales
fragmentos carecen de los residuos 1-69 de alfa-sinucleína humana. La inmunización con tales fragmentos genera
una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos contra uno o más epítopos dentro de los residuos 70-140
de alfa-sinucleína humana. Los fragmentos C-terminales inmunogénicos incluyen SN85-99, SN109-123, SN112-126
35 y SN126-138, como se muestra en la Fig. 8, y otros fragmentos que difieren de uno de estos en hasta dos
aminoácidos adicionales o menos en cada extremo. Otro fragmento preferido SN83-140, que incluye todos estos
epítopos. Algunos fragmentos de alfa-sinucleína generan anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo
dentro de uno o más de: SN83-101, SN107-125, SN110-128 y SN124-140 de la alfa-sinucleína humana. Algunos
fragmentos generan anticuerpos que se unen exclusivamente de manera específica dentro de uno de los cuatro
40 fragmentos anteriores. Por ejemplo, el fragmento SN83-101 comienza en el residuo 83 y termina en los residuos 101
de alfa-sinucleína y genera solo anticuerpos que se unen específicamente a SN83-101.

[0079] Algunos fragmentos tienen no más de 40 residuos contiguos en total de alfa-sinucleína. Algunos de estos
fragmentos comprenden SN125-140, SN130-140, SNS87,97, SN111-121, SN114-124 o SN128-136. Algunos
45 fragmentos tienen un total de 5-20 aminoácidos contiguos en total de la mitad C-terminal de alfa-sinucleína (es decir,
residuos 70-140). Algunos fragmentos tienen 5-20 aminoácidos contiguos de las posiciones 120-140 de la alfa-
sinucleína. Los fragmentos particularmente preferidos incluyen SN124-140, SN125-140, SN126-140, SN127-140,
SN128-140, SN 129-140, SN130-140, SN131-140, SN132-140, SN133-140, SN134-140, SN135-140, SN136-140,
SN137-140, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN124-139, SN125-139, SN126-139,
50 SN127-139, SN128-139, SN 129-139, SN130-139, SN131-139, SN132-139, SN133-139, SN134-139, SN135-139,
SN136-139, SN137-139, SN124-138, SN124-138, SN125-138, SN126-138, SN127-138, SN128-138, SN 129-138,
SN130-138, SN131-138, SN132-138, SN133-138, SN134-138, SN135-138, SN136-138, S SN124-137, SN125-137,
SN126-137, SN127-137, SN128-137, SN 129-137, SN130-137, SN131-137, SN132-137, SN133-137, SN134-137,
SN135-137, SN124-136, SN125-136, SN126-136, SN127-136, SN128-136, SN 129-136, SN130-136, SN131-136,
55 SN132-136, SN133-136, y SN134-136.

[0080] Otros fragmentos de alfa-sinucleína útiles para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad
caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro (por ejemplo, la enfermedad de
Parkinson) son de la región N-terminal de la molécula. La inmunización con los fragmentos genera una respuesta
60 inmunogénica que comprende anticuerpos contra uno o más epítopos dentro de los residuos 1-20 o, en algunos
casos, uno o más epítopos dentro de los residuos 1-10. Como se muestra en el Ejemplo IX, la administración de
6H7, un anticuerpo que reconoce el extremo amino de la alfa-sinucleína, parece eliminar la agregación de alfa-
sinucleína en el cerebro de ratones transgénicos que sobreexpresan la alfa-sinucleína humana. Se espera que la
inmunización con fragmentos de alfa-sinucleína que comprenden la región amino-terminal de alfa-sinucleína dé
65 como resultado la eliminación de los agregados y/o impida la formación de agregados.

[0081] Por lo tanto, la descripción proporciona un método para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro mediante la administración a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad de un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína efectivo para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los **residuos 1-40**, los residuos 1-20 o los residuos 1-10 de alfa-sinucleína humana, los números se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. En una realización, el fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína está libre de residuos 70-140 de alfa-sinucleína. En una realización, el fragmento inmunogénico está libre de residuos 41-140 de alfa-sinucleína. En una realización, el fragmento inmunogénico está libre de residuos 25-140 de alfa-sinucleína.

[0082] Los inmunógenos adecuados para efectuar la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación alfa-sinucleína en el cerebro incluyen, pero no se limitan a, fragmentos que comprenden de 5 a 20 residuos de aminoácidos contiguos de la terminal amino de alfa-sinucleína. En una realización preferida, el fragmento comprende el primer residuo (amino-terminal) de alfa-sinucleína. Por lo tanto, los ejemplos de fragmentos incluyen la secuencia de los residuos 1 a N_a de la SEQ ID NO: 1. que es un evento de 5 a 20 (por ejemplo, MDVFMKGLSKAKE GVVA AE); KGLSKAKEG; MDVFMKGLSKAK; MDVFMKGLSKA; MDVFMKGLSK; MDVFMKGLS; MDVFMKGL; MDVFMKG; MD-VFMKK y MDVFMKG; MD-VFMKK y MDVFMKG; MDVFMKK y MDVFMKG; MDVFMKG; MD-VFMKK y MDVFMKG; alfa-sinucleína. Por lo tanto, los fragmentos de ejemplo tienen la secuencia de residuos 2 a N_b, y 3 a N_c de la SEQ ID NO: 1. donde N_b es de 6 a 21 y N_c es de 7 a 22 (p. ej., DVFMKGLSKAKEGVVAAAEK; DVFM KGLSKAKEGVVAAAE; DVFMKGLSKAKEGVVAAA; DVFMKGLSKAKEGVVAA; DVFMKGLSKAKEGVVA; DVFMKGLSKAKEGVVA; DVFMKGLSKAKEGVV; DVFMKGLSKAKEGVV; DVFMKGLSKAKEG; DVFMKGLSKAK; DVFMKGLSKAK; DVFMKGLSKA; DVFMKGLSK; DVFMKGLS; DVFMKGL; DVFMKG; DVFMK; VFMKGLSKAKEGVVAAAEKT; VFMKGLSKAKEGWAAAEK; VFMKGLSKAKEGWAAAE; VFMKGL SKAKEGVVAAA; VFMKGLSKAKEGVVAA; VFM- KGLSKAKEGVVA; VFMKGLSKAKEGVV; VFMKGLSKAKEGV; VFMKGLSKAKEG; VFMKGLSKAK; VFMKGLSKA; VFMKGLSK; VFMKGLS; VFMKGL; y VFMKG). Como se discute a continuación, los fragmentos antes mencionados pueden estar unidos a una molécula portadora (p. ej., una proteína conjugada o de fusión, véase Sec. II(3)). Alternativamente, como se explica a continuación, un fragmento mencionado anteriormente puede administrarse mediante la vacunación del sujeto con un ácido nucleico que codifica el fragmento (véase Sec. II(4)).

[0083] La referencia a alfa-SN incluye las secuencias de aminoácidos humanos naturales indicadas anteriormente, así como análogos que incluyen variantes alélicas, de especies y inducidas, formas de longitud completa y fragmentos inmunogénicos de las mismas. La alfa-sinucleína humana, que significa una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la SEQ ID NO: 1 o sus variantes alélicas, se prefiere en todas las realizaciones. Los análogos típicamente difieren de los péptidos naturales en una, dos o unas pocas posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservativas. Los análogos típicamente exhiben al menos 80 o 90% de identidad de secuencia con péptidos naturales. Las posiciones de los aminoácidos en los análogos de la alfa-sinucleína natural se asignan a los números de aminoácidos correspondientes en la alfa-sinucleína natural cuando la alfa-sinucleína y la análoga natural están alineadas al máximo. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de los aminoácidos N o C terminales en una, dos o unas pocas posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido glutámico natural en la posición 139 de alfa-SN puede reemplazarse con ácido iso-aspartico. Ejemplos de aminoácidos no naturales son aminoácidos D, alfa, alfa-disustituidos, aminoácidos N-alquílicos, ácido láctico, 4-hidroxi prolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N, N,N-trimetilsilina, épsilon-N-acetilsilina, O-fosfo serina, N-acetils erina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilina, omega-N-metilarginina, beta-alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-amino butírico, homoserina, citrina, vitamina, y el ácido isoaspartico. Los agentes terapéuticos también incluyen análogos de fragmentos alfa-SN. Algunos agentes terapéuticos son péptidos todo-D, p. ej., todo-D alfa-SN o todo-D NAC, y de análogos de péptidos todo-D. Los análogos se unen específicamente a una población policlonal de anticuerpos contra la alfa-sinucleína humana natural. Los fragmentos y análogos pueden analizarse para determinar la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos en comparación con los controles no tratados o con placebo, como se describe a continuación.

[0084] El alfa-SN, sus fragmentos y análogos pueden sintetizarse mediante síntesis peptídica en fase sólida o expresión recombinante, o pueden obtenerse a partir de fuentes naturales. Los sintetizadores automáticos de péptidos están disponibles comercialmente de numerosos proveedores, como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede ser en bacterias, como E. coli, levadura, células de insectos o células de mamíferos. Los procedimientos para la expresión recombinante se describen en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (CSHP Press, NY 2ª ed., 1989). Algunas formas de péptido alfa-SN también están disponibles comercialmente, por ejemplo, en BACHEM y American Peptide Company, Inc.

[0085] Los agentes terapéuticos también incluyen polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un fragmento activo de péptido alfa-SN, junto con otros aminoácidos. Por ejemplo, los agentes preferidos incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de alfa-SN fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga que induce una respuesta de células T auxiliares contra la secuencia de aminoácidos heteróloga y, por lo tanto, una respuesta de células B contra el segmento alfa-SN. Dichos polipéptidos pueden analizarse para determinar la eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales en comparación con los controles no tratados o con placebo, como se

describe a continuación. El péptido alfa-SN, el análogo, el fragmento activo u otro polipéptido pueden administrarse en forma asociada o multitérica o en forma disociada. Los agentes terapéuticos también incluyen multímeros de agentes inmunogénicos monoméricos. Los agentes terapéuticos pueden incluir secuencias de polilisina.

5 **[0086]** En una variación adicional, un péptido inmunogénico, tal como un fragmento de la alfa-SN, se puede presentar por un virus o bacterias como parte de una composición inmunogénica. Un ácido nucleico que codifica el péptido inmunogénico se incorpora en un genoma o episoma del virus o bacteria. Opcionalmente, el ácido nucleico se incorpora de tal manera que el péptido inmunogénico se expresa como una proteína secretada o como una proteína de fusión con una proteína de la superficie externa de un virus o una proteína transmembrana de bacterias para que se muestre el péptido. Los virus o bacterias utilizados en tales métodos deben ser no patógenos o atenuados. Los virus adecuados incluyen adenovirus, HSV, virus de la encefalitis equina venezolana y otros virus alfa, virus de la estomatitis vesicular y otros virus rabdo, vacuna y viruela aviar. Las bacterias adecuadas incluyen Salmonella y Shigella. La fusión de un péptido inmunogénico a HBsAg de HBV es particularmente adecuada.

15 **[0087]** Los agentes terapéuticos también incluyen péptidos y otros compuestos que no tienen necesariamente una similitud de secuencia de aminoácidos significativa con alfa-SN, pero sin embargo sirven como miméticos de alfa-SN e inducen una respuesta inmune similar. Por ejemplo, todos los péptidos y proteínas que forman láminas beta plisadas se pueden examinar para determinar su idoneidad. También se pueden usar anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos monoclonales contra alfa-SN u otros componentes del cuerpo de Lewy. Tales anticuerpos anti-Id imitan al antígeno y generan una respuesta inmune a él (véase *Essential Immunology*, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., P. 181). Los agentes distintos del alfa-SN deben inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los segmentos preferidos del alfa-SN enumerados anteriormente (por ejemplo, NAC). Preferiblemente, tales agentes inducen una respuesta inmunogénica que se dirige específicamente a uno de estos segmentos sin dirigirse a otros segmentos de alfa-SN.

25 **[0088]** Las bibliotecas aleatorias de péptidos u otros compuestos también pueden ser examinados para determinar su idoneidad. Bibliotecas combinatorias pueden ser producidas para muchos tipos de compuestos que se pueden sintetizar paso a paso. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de giro beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas y oligocarbamatos sustituidos por N con oligómeros. Las grandes bibliotecas combinatorias de los compuestos se pueden construir mediante el método de bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) descritas en Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93/06121, Columbia University, WO 94/08051, Pharmacopeia, WO 95/35503 y Scripps, WO 95/30642. Las bibliotecas de péptidos también pueden generarse mediante métodos de presentación de fagos. Véase, p. ej., Devlin, WO 91/18980.

35 **[0089]** Las bibliotecas combinatorias y otros compuestos se analizan inicialmente para determinar su idoneidad determinando su capacidad para unirse a anticuerpos o linfocitos (B o T) que se sabe que son específicos para el alfa-SN u otros componentes del cuerpo de Lewy. Por ejemplo, las pantallas iniciales se pueden realizar con cualquier suero policlonal o anticuerpo monoclonal para alfa-SN o un fragmento del mismo. Las bibliotecas se seleccionan preferiblemente para determinar su capacidad para unirse a anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-20 o 70-140 de alfa-sinucleína humana. Los compuestos pueden entonces ser examinados para la unión específica a un epítipo específico dentro de alfa-SN (p. ej., SN 1-20, SN 83-101, SN107-125, SN110-128 y SN124-140). Los compuestos se pueden ensayar mediante los mismos procedimientos descritos para mapear las especificidades de los epítipos de anticuerpos. Los compuestos identificados por tales pantallas se analizan posteriormente para determinar su capacidad para inducir anticuerpos o linfocitos reactivos a alfa-SN o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, se pueden ensayar múltiples diluciones de sueros en placas de microtitulación que se han recubierto previamente con alfa-SN o un fragmento de la misma y se puede realizar un ELISA estándar para ensayar los anticuerpos reactivos a la alfa-SN o el fragmento. Los compuestos pueden ensayarse para determinar la eficacia profiláctica y terapéutica en animales transgénicos predispuestos a una enfermedad asociada con la presencia del cuerpo de Lewy, como se describe en los Ejemplos. Tales animales incluyen, por ejemplo, los ratones transgénicos que sobreexpresan la alfa-SN o mutante de la misma (p. ej., sustitución de alanina a treonina en la posición 53) como se describe, p. ej., en WO 98/59050, Masliah, et al., *Science* 287:1265-1269 (2000), y van der Putter, et al., *J. Neuroscience* 20: 6025-6029 (2000), o tales ratones transgénicos que también sobreexpresan APP o un mutante de la misma. Particularmente preferidos son tales ratones transgénicos de sinucleína que tienen una mutación 717 de APP descrita por Games et al., *Nature* 373, 523 (1995) y ratones que tienen una mutación sueca de APP 670/671, tal como se describe por McConlogue et al., *US* 5.612.486 y Hsiao et al., *Science* 274, 99 (1996); Staufenbiel et al., *Proc. Natl Acad Sci. EE.UU.* 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat y otros, *Proc. Natl Acad Sci. EE.UU.* 94, 13287-13292 (1997); Borchelt et al., *Neuron* 19, 939-945 (1997)). En el documento WO 01/60794 se proporcionan ejemplos de tales animales transgénicos de sinucleína/APP. Los modelos animales adicionales de EP incluyen los modelos animales de 6-hidroxidopamina, rotenona y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (M. Flint Beal, *Nature Reviews Neuroscience* 2: 325-334 (2001)). El mismo enfoque de selección puede usarse en otros análogos potenciales de alfa-SN y péptidos más largos que incluyen fragmentos de alfa-SN, descritos anteriormente y otros componentes del cuerpo de Lewy y análogos o fragmentos de los mismos.

65 i. Inmunización activa para iniciar una respuesta inmunitaria contra epítipos en ambos extremos de alfa-sinucleína

[0090] Como se describe aquí, la administración de anticuerpos que reconocen epítomos en el terminal amino y regiones carboxi terminales de la alfa-sinucleína (es decir, 8A5 y 6H7) redujo los agregados de alfa-sinucleína en el cerebro de ratones transgénicos que sobreexpresan alfa-sinucleína humana (ver, por ejemplo, Ejemplo IX). Basado en parte en este descubrimiento, se contempla que la inducción de una respuesta inmune contra los epítomos en ambos extremos de la alfa-sinucleína tendrá ventajas en la profilaxis y la terapia. Por lo tanto, en un aspecto, la descripción proporciona un método para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro mediante la inducción de una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 1-20, o alternativamente, los residuos 1-10, de alfa-sinucleína humana y un epítomo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. En una realización preferida, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Una respuesta inmunitaria que comprende anticuerpos contra epítomos en ambas regiones terminales de la proteína puede denominarse una respuesta inmunitaria "dual". Se puede inducir una respuesta inmunitaria dual de varias maneras y la presente descripción no se limita a ningún método particular para iniciar tal respuesta.

[0091] Una doble respuesta inmune puede ser inducida por la vacunación con un único polipéptido que es eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los restos 1-20 de alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. En realizaciones preferidas, los anticuerpos se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 1-10 y/o dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Se puede usar un polipéptido que carezca de al menos los residuos 25-69 de alfa-sinucleína humana, al menos los residuos 30-110 de alfa-sinucleína humana, o al menos los residuos 21-119 de alfa-sinucleína humana. Cuando se usan tales polipéptidos, la respuesta inmunogénica no incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 25-69 de alfa-sinucleína humana.

[0092] Una doble respuesta inmune también puede ser inducida por la vacunación en combinación de dos (o más) polipéptidos en donde un polipéptido induce una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los restos 1-20 de la alfa-sinucleína y anticuerpos humanos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. En realizaciones preferidas, los anticuerpos se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 1-10 y/o en los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Por lo tanto, el tratamiento o la profilaxis pueden efectuarse administrando un primer fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína que induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y un segundo fragmento inmunogénico que induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 70-140 (o 120-140) de alfa-sinucleína humana. Los fragmentos de alfa-sinucleína humana pueden administrarse en combinación, como se discutió anteriormente (*p. ej.*, administrándose como una proteína de fusión o conjugado, en una coformulación, o en el mismo curso de terapia).

ii. Composiciones y kits

[0093] La descripción proporciona composiciones útiles para iniciar una respuesta inmune contra epítomos en ambos extremos de la alfa-sinucleína. Las composiciones incluyen formas de dosificación y formulaciones que contienen dos o más polipéptidos, como se describe anteriormente, donde un polipéptido induce una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. En realizaciones preferidas, los polipéptidos inducen anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 1-10 y/o dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Las formulaciones ejemplares (adecuadas para co-formular polipéptidos) son conocidas en la técnica e incluyen las que se describen a continuación en la Sección VII ("Regímenes de tratamiento").

[0094] La descripción también proporciona kits para iniciar una respuesta inmune contra epítomos en ambos extremos de alfa-sinucleína. Los kits incluyen dos o más agentes que inducen una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítomo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. Los agentes se pueden combinar en una sola preparación para uso simultáneo. Los agentes pueden ocupar contenedores separados (*p. ej.*, viales, jeringas, tubos o similares), cada uno de los cuales contiene un polipéptido diferente para uso simultáneo, secuencial o separado. Estos agentes pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente efectivos en el tratamiento de la enfermedad del cuerpo de Lewy. Los kits también pueden incluir agentes que aumentan el paso de los agentes a través de la barrera hematoencefálica, otros adyuvantes y materiales para la administración al paciente.

2. Agentes para la respuesta inmune pasiva

[0095] Los agentes terapéuticos de la descripción también incluyen anticuerpos que se unen específicamente a la alfa-SN u otros componentes de cuerpos de Lewy. Esta descripción también proporciona anticuerpos que se unen

específicamente a un componente de sinucleína-NAC de una placa amiloide. Se conocen anticuerpos inmunorreactivos para alfa-SN (ver, por ejemplo, Arima, et al., Brian Res. 808: 93-100 (1998); Crowther et al., Neuroscience Lett. 292:128-130 (2000); Spillantini, et al., Nature 388: 839-840 (1997). Tales anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Algunos de estos anticuerpos se unen específicamente a los agregados insolubles de alfa-SN sin unirse específicamente a la forma monomérica soluble. Algunos se unen específicamente a la forma monomérica soluble sin unirse a la forma agregada insoluble. Algunos se unen específicamente a formas monoméricas tanto agregadas como solubles. Algunos de estos anticuerpos se unen específicamente a una forma corta natural de alfa-SN (p. ej., NAC) sin unirse a un alfa-SN de longitud completa natural. Algunos anticuerpos se unen específicamente a una forma larga sin unirse a una forma corta. Algunos anticuerpos se unen específicamente a alfa-SN sin unirse a otros componentes de LB. Algunos anticuerpos se unen específicamente a alfa-SN sin unirse específicamente a otros componentes de las placas amiloides. Ver la publicación de patente PCT WO 05/0138889 y la Solicitud de Estados Unidos N° 60/471,929 presentada el 19 de mayo de 2003, proporciona anticuerpos específicos para el extremo que se unen específicamente a fragmentos de alfa-sinucleína sin unirse específicamente a alfa-sinucleína intacta per se. Estos anticuerpos son útiles en métodos de prevención y tratamiento de enfermedades sinucleinopáticas y amiloidogénicas.

[0096] En experimentos llevados a cabo en apoyo de la invención, un ensayo *ex vivo* predictivo (Ejemplo VII) se utilizó para ensayar la eliminación de un anticuerpo que se une específicamente a sinucleína-NAC. Un anticuerpo para NAC se puso en contacto con una muestra de tejido cerebral que contenía placas amiloides y células microgliales. Se usó suero de conejo como control. La monitorización posterior mostró una marcada reducción en el número y tamaño de las placas indicativas de la actividad de eliminación del anticuerpo.

[0097] A partir de estos datos, es evidente que la carga de placa amiloide asociada con la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades amiloides puede ser disminuida en gran medida por la administración de reactivos inmunológicos dirigidos contra epítomos de NAC, que son eficaces para reducir la carga de placa amiloide. Se entiende además que se puede usar una amplia variedad de anticuerpos en tales composiciones. Como se discutió anteriormente, la Solicitud de Estados Unidos N° 60/471.929 presentada el 19 de mayo de 2003, proporciona anticuerpos específicos para el extremo que se unen específicamente a fragmentos de alfa-sinucleína sin unirse específicamente a alfa-sinucleína intacta per se.

[0098] Los anticuerpos utilizados en los métodos terapéuticos por lo general tienen una región constante intacta o al menos suficiente de la región constante para interactuar con un receptor de Fc. Se prefiere el isotipo IgG1 humano debido a que tiene la mayor afinidad de isotipos humanos por el receptor FcRI en células fagocíticas. También se pueden usar fragmentos Fab biespecíficos, en los que un brazo del anticuerpo tiene especificidad por el alfa-SN y el otro por un receptor de Fc. Algunos anticuerpos se unen a alfa-SN, opcionalmente en forma desnaturalizada, como cuando se tratan con SDS, con una afinidad de unión mayor o igual a aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M⁻¹. Algunos anticuerpos de la invención se unen específicamente a la alfa-sinucleína humana en sinapsis o cuerpos de células neuronales según lo determinado por la inmunocitoquímica.

[0099] Los sueros policlonales típicamente contienen poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen a varios epítomos a lo largo de la longitud de la alfa-SN. Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos para un segmento particular de alfa-SN, como NAC. Los sueros policlonales que son específicos para un segmento en particular contienen anticuerpos que se unen específicamente a ese segmento y carecen de anticuerpos que se unen específicamente a otros segmentos de alfa-SN. Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítomo específico dentro de alfa-SN que puede ser un epítomo conformacional o no conformacional. Los epítomos no conformacionales permanecen presentes cuando el alfa-SN está desnaturalizado con SDS. La eficacia profiláctica y terapéutica de los anticuerpos puede ensayarse utilizando los procedimientos de modelos animales transgénicos descritos en los Ejemplos. algunos anticuerpos monoclonales se unen a un epítomo dentro de NAC. En algunos métodos, se utilizan múltiples anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión a diferentes epítomos. Dichos anticuerpos pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente. También se pueden usar anticuerpos contra los componentes del cuerpo de Lewy que no sean alfa-SN. Por ejemplo, los anticuerpos pueden dirigirse al neurofilamento, la ubiquitina o la sinfilina. Los agentes terapéuticos también incluyen anticuerpos producidos contra análogos de alfa-SN y fragmentos de los mismos. Algunos agentes terapéuticos son péptidos todo-D, p. ej., todo-D alfa-SN o todo-D NAC.

[0100] Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítomo dentro de restos especificados, tales como alfa-SN 1-5, por ejemplo, lo que se entiende es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los restos especificados (es decir, alfa-SN 1-5 en este ejemplo). Dicho anticuerpo no necesariamente entra en contacto con todos los residuos dentro de alfa-SN 1-5. Tampoco todas las sustituciones o eliminaciones de aminoácidos individuales con alfa-SN1-5 afectan necesariamente de manera significativa la afinidad de unión. La especificidad de epítomo de un anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, formando una biblioteca de presentación de fagos en la que diferentes miembros muestran diferentes subsecuencias de alfa-SN. La biblioteca de presentación de fagos se selecciona para los miembros que se unen específicamente a un anticuerpo bajo prueba. Se aísla una familia de secuencias. Típicamente, tal familia contiene una secuencia central común, y longitudes variables de secuencias flanqueantes en diferentes miembros. La secuencia central más corta que muestra la unión específica al anticuerpo define el epítomo unido por el anticuerpo. Los anticuerpos también pueden analizarse para determinar la

especificidad de epítipo en un ensayo de competencia con un anticuerpo cuya especificidad de epítipo ya se ha determinado.

5 **[0101]** Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de NAC. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de una forma de sinucleína glicosilada de 22 kilodalton, p. ej., P22-sinucleína (H. Shimura et al., Science 2001, 13 de julio, 293 (5528): 224-5).

10 **[0102]** Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en el extremo N de alfa-SN (por ejemplo, un epítipo dentro de los aminoácidos 1-20 o los aminoácidos 1-10 de alfa-sinucleína como se numera de acuerdo con la SEQ ID NO: 1). Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en el que el residuo N-terminal del epítipo es el residuo N-terminal de alfa-SN de longitud completa. Dichos anticuerpos no se unen a los mutantes de delección de alfa-sinucleína en los que falta el residuo 1. Algunos de estos anticuerpos no se unen a la alfa-sinucleína de longitud completa en la que el aminoácido N-terminal se une a un polipéptido heterólogo. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-69 o residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-20 de la alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo con un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionados de los restos 1 a N_a de SEQ ID NO: 1. donde N_a es de 5 a 20; residuos 2 a N_b de la SEQ ID NO: 1. donde N_b es 6 a 21; o los residuos 3 N_c de la SEQ ID NO: 1 donde N_c es de 7 a 22. Algunos anticuerpos se unen a un epítipo dentro de un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN1-5, SN1-6, SN1-7, SN1-8, SN1-9, SN1-10, SN1-11, SN1-12, SN1-13, SN1-14 SN1-15, SN1-16, SN1-17, SN1-18, SN1-19, y SN1-20.

25 **[0103]** Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en o cerca del extremo C del alfa-SN (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 70-140, 100-140, 120-140, 130-140 o 135-140). Algunos anticuerpos se unen a un epítipo en el que el residuo C-terminal del epítipo es el residuo C-terminal de alfa-SN (de longitud completa). Dichos anticuerpos no se unen a los mutantes por delección de alfa-sinucleína en los que falta el residuo 140. Algunos de estos anticuerpos no se unen a la alfa-sinucleína de longitud completa en la que el aminoácido C-terminal se une a un polipéptido heterólogo. En algunos métodos, el anticuerpo se une específicamente a NAC sin unirse a alfa-SN de longitud completa.

30 **[0104]** Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 o 83-140 de la alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 120-140 de la alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo con un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado de 83-101, 107-125, 110-128 y 124-140. Algunos anticuerpos se unen a un epítipo dentro de un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN124-140, SN125-140, SN126-140, SN127-140, SN128-140, SN 129-140, SN130-140, SN131-140, SN132-140, SN133-140, SN134-140, SN135-140, SN136-140, SN137-140, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN 129-139, SN130-139, SN131-139, SN132-139, SN133-139, SN134-139, SN135-139, SN136-139, SN137-139, SN124-138, SN124-138, SN125-138, SN126-138, SN127-138, SN128-138, SN 129-138, SN130-138, SN131-138, SN132-138, SN133-138, SN134-138, SN135-138, SN136-138, SN124-137, SN125-137, SN126-137, SN127-137, SN128-137, SN 129-137, SN130-137, SN131-137, SN132-137, SN133-137, SN134-137, SN135-137, SN124-136, SN125-136, SN126-136, SN127-136, SN128-136, SN 129-136, SN130-136, SN131-136, SN132-136, SN133-136, y SN134-136.

45 **[0105]** Los anticuerpos monoclonales que se unen a epítipos C-terminales se unen preferiblemente con alta afinidad, por ejemplo, al menos 10⁸, 10⁹ o 10¹⁰M⁻¹ a alfa-sinucleína humana.

50 **[0106]** Los anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen específicamente a un segmento preferido de alfa-SN sin unirse específicamente a otras regiones de alfa-SN tienen una serie de ventajas con respecto a anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o sueros policlonales a alfa-SN intacto. Primero, para dosis iguales de masa, las dosis de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una dosis molar superior de anticuerpos efectivos para eliminar las placas de amiloide. En segundo lugar, los anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de eliminación contra los LB sin inducir una respuesta de eliminación contra el alfa-SN intacto, lo que reduce la posibilidad de efectos secundarios.

55 **[0107]** Opcionalmente, los anticuerpos pueden analizarse para determinar la actividad profiláctica o terapéutica en animales transgénicos de la enfermedad de LB como se describe anteriormente. Opcionalmente, se preselecciona una colección de anticuerpos para determinar la unión relativa a la alfa-sinucleína humana desnaturalizada o un fragmento de la misma. Las afinidades de unión relativas pueden estimarse a partir de intensidades relativas de señal en una inmunotransferencia. Se selecciona un anticuerpo que tenga una afinidad de unión relativa por encima de la media, o preferiblemente el anticuerpo que tenga la afinidad de unión más alta ensayada para su posterior selección en animales transgénicos. Se puede realizar una preselección similar para ensayar los anticuerpos para determinar la unión a agregados de alfa-sinucleína en secciones de tejido mediante inmunocitoquímica. Las secciones de tejido se pueden obtener del cerebro de un paciente enfermo o de un modelo animal transgénico.

65 **[0108]** En una realización, el anticuerpo denominado 6H7, o un anticuerpo que compite con 6H7 para la unión a alfa-sinucleína se utiliza para la inmunización pasiva específica. En una realización, el anticuerpo designado como 8A5, o

un anticuerpo que compite con 8A5 por la unión específica a la alfa-sinucleína se usa para la inmunización pasiva. En algunas realizaciones, 6H7 u 8A5 se usan en combinación entre sí o con otros anticuerpos anti-alfa-sinucleína.

i. Inmunización activa para iniciar una respuesta inmunitaria contra epítomos en ambos extremos de alfa-sinucleína

[0109] Como se describe aquí, la administración de anticuerpos que reconocen epítomos en el terminal amino y regiones carboxi terminales de la alfa-sinucleína (es decir, 8A5 y 6H7) redujo los agregados de alfa-sinucleína en el cerebro de ratones transgénicos que sobreexpresan alfa-sinucleína humana (ver, por ejemplo, Ejemplo IX). Basado en parte en este descubrimiento, se contempla que la administración en combinación de anticuerpos que reconocen un epítomo aN-terminal (p. ej., como se describe anteriormente) y los anticuerpos que reconocen un epítomo C-terminal (p. ej., como se describe anteriormente) será particularmente eficaz en la profilaxis y la terapia. Por lo tanto, se describe un método para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación alfa-sinucleína en el cerebro mediante la administración en combinación a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad un régimen eficaz de un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítomo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana, numerados según la SEQ ID NO: 1 y administrando un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítomo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. Preferiblemente, el primer anticuerpo se une a un epitiope de alfa-sinucleína dentro de la secuencia de los residuos 1 a N_a de SEQ ID NO: 1. donde N_a es de 5 a 20; dentro de la secuencia de los residuos 2 a N_b de la SEQ ID NO: 1. donde N_b es 6 a 21; y/o dentro de la secuencia de los residuos 3 a N_c de la SEQ ID NO: 1. y N_c es de 7 a 22. Preferiblemente, el segundo anticuerpo se une específicamente a un epítomo dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. El primer y segundo anticuerpo pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo, coformular), el mismo día, el mismo mes y/o como parte del mismo curso de terapia.

ii. Composiciones y kits

[0110] Las composiciones se describen para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación alfa-sinucleína en el cerebro que comprende uno o más anticuerpos que se unen a una región terminal de alfa-sinucleína, por ejemplo, que tienen una especificidad descrita anteriormente. Las composiciones incluyen formas de dosificación y formulaciones que contienen dos o más anticuerpos. Las formulaciones ejemplares (adecuadas para coformular anticuerpos) son conocidas en la técnica e incluyen las que se describen a continuación en la Sección VII ("Regímenes de tratamiento")

[0111] La descripción también proporciona kits para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. Los kits incluyen dos (o más) anticuerpos en los que un primer anticuerpo se une a un epítomo en el extremo N de la alfa-sinucleína humana y el segundo anticuerpo se une a un epítomo en el extremo C de la alfa-sinucleína humana. Los anticuerpos se pueden combinar en una única preparación o kit para uso simultáneo. Alternativamente, los anticuerpos pueden ocupar contenedores separados (p. ej., viales, jeringas, tubos o similares) en un kit para uso simultáneo, secuencial o separado. Estos anticuerpos pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de la enfermedad de Lewy Bidy. Los kits también pueden incluir agentes que aumentan el paso de los anticuerpos a través de la barrera hematoencefálica, otros adyuvantes y materiales para la administración al paciente.

iii. Características generales de las inmunoglobulinas

[0112] La unidad estructural básica del anticuerpo es conocida por comprender un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto por dos pares de cadenas polipeptídicas idénticas, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora.

[0113] Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. (véase *en general*, Fundamental Immunology, Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, NY, 1989, Cap. 7.

[0114] Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, permitiendo la unión a un epítomo específico. Desde el extremo N al terminal C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a

cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901 - 917 (1987); o Chothia et al., *Nature* 342: 878-883 (1989).

5 iv. Producción de anticuerpos no humanos

[0115] Los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen la misma o similar especificidad de unión y afinidad como un ratón u otro anticuerpo no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, generalmente mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos (C), como IgG1 e IgG4. Se prefiere el isotipo humano IgG1. En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana. Los anticuerpos IgM también pueden usarse en algunos métodos. Un anticuerpo quimérico típico es, por lo tanto, una proteína híbrida que consiste en el dominio de unión V o antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio C o efector de un anticuerpo humano.

[0116] Los anticuerpos humanizados tienen residuos de marco de región variable sustancialmente de un anticuerpo humano (denominado anticuerpo aceptor) y regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de un anticuerpo de ratón, (denominado inmunoglobulina donante). Véase, Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci. EE.UU.* 86:10029-10033 (1989), WO 90/07861, US 5.693.762, US 5.693.761, US 5.585.089, US 5.530.101 y Winter, US 5.225.539. La(s) región(es) constante(s), si está(n) presente(s), también es (son) sustancial(es) o totalmente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos normalmente se eligen de anticuerpos humanos cuyas secuencias marco muestran un alto grado de identidad de secuencia con los dominios de región variable murinos de los que se derivaron las CDR. Los residuos del marco de la región variable de la cadena pesada y ligera se pueden derivar de las mismas secuencias de anticuerpos humanos o diferentes. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser secuencias de anticuerpos humanos naturales o pueden ser secuencias de consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Carter et al., WO 92/22653. Ciertos aminoácidos de los residuos del marco de la región variable humana se seleccionan para la sustitución en función de su posible influencia en la conformación de CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de tales posibles influencias se realiza mediante el modelado, el examen de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

[0117] Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto de marco de la región variable murina y un resto del marco de la región variable humana seleccionado, el aminoácido del marco humano generalmente debe ser sustituido por el aminoácido marco equivalente del anticuerpo del ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una no covalentemente al antígeno directamente,
- (2) sea adyacente a una región CDR,
- (3) de lo contrario interactúe con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 6 Å de una región CDR), o
- (4) participe en la interfaz VL-VH.

[0118] Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos del marco humano aceptor que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donante de ratón o de las posiciones equivalentes de las inmunoglobulinas humanas más típicas. Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos del marco humano aceptor que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Los marcos de la región variable de las inmunoglobulinas humanizadas usualmente muestran al menos un 85% de identidad de secuencia con una secuencia de marco de la región variable humana o el consenso de tales secuencias.

[0119] Algunos anticuerpos humanizados comprenden regiones determinantes de complementariedad (CDRs) secuencias derivadas de mAb 6H7 anticuerpo monoclonal de ratón o mAb 8A5 anticuerpo monoclonal de ratón. La línea celular designada JH17.6H7.1.54.28 que produce el anticuerpo 6H7 tiene el número de acceso de ATCC, que se ha depositado bajo las disposiciones del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA 20108) el 4 de agosto de 2005. La línea celular designada JH4.8A5.25.7.36 produciendo el anticuerpo 8A5 tiene el número de acceso ATCC _habiéndose depositado el 4 de agosto de 2005.

[0120] Como se señaló anteriormente, un número de métodos son conocidos para la producción de anticuerpos quiméricos y humanizados utilizando una línea celular que expresa anticuerpos (por ejemplo, hibridoma). Por ejemplo, las regiones variables de inmunoglobulina de los anticuerpos de ratón 8A5 y/o 6H7 se pueden clonar y secuenciar utilizando métodos bien conocidos. En un método, con fines ilustrativos y no limitativos, la región VH variable de la cadena pesada se clona por RT-PCR utilizando ARNm preparado a partir de células de hibridoma. Se emplean cebadores de consenso para el péptido líder de la región VH que abarca el codón de iniciación de la traducción como el cebador 5' y un cebador 3' específico de las regiones constantes de g2b. Los cebadores ejemplares se describen en la publicación de patente estadounidense US 2005/0009150 de Schenk et al. (en

adelante, "Schenk"). Las secuencias de múltiples clones derivados independientemente pueden compararse para garantizar que no se introduzcan cambios durante la amplificación. La secuencia de la región VH también se puede determinar o confirmar mediante la secuenciación de un fragmento VH obtenido mediante la metodología 5' RACE RT-PCR y el cebador específico 3' g2b.

[0121] La región variable de cadena ligera VL de 8A5 o 6H73 D6 se puede clonar de una manera análoga como la región VH. En un enfoque, un conjunto de cebadores de consenso diseñado para la amplificación de las regiones VL murinas se diseña para hibridar con la región VL que abarca el codón de iniciación de la traducción, y un cebador 3' específico para la región Ck murina aguas abajo de la región de unión VJ. En un segundo enfoque, la metodología 5'RACE RT-PCR se emplea para clonar un ADNc que codifica VL. Los cebadores ejemplares se describen en Schenk. Las secuencias clonadas se combinan luego con secuencias que codifican regiones presentes en humanos.

[0122] En un enfoque, las regiones variables de la cadena pesada y ligera se rediseñan para codificar secuencias de donantes de empalme aguas abajo de las respectivas uniones VDJ o VJ, y se clonan en el vector de expresión de mamíferos, como pCMV-hy1 para la cadena pesada, y pCMV-hk1 para la cadena ligera. Estos vectores codifican regiones constantes humanas γ_1 y Ck como fragmentos exónicos aguas abajo del casete de región variable insertado. Tras la verificación de la secuencia, los vectores de expresión de la cadena pesada y la cadena ligera se pueden cotransfectar en células COS para producir anticuerpos quiméricos. Los medios condicionados se recogen 48 horas después de la transfección y se analizan mediante análisis de transferencia Western para determinar la producción de anticuerpos o ELISA para determinar la unión al antígeno. Los anticuerpos quiméricos se humanizan como se describe anteriormente.

v. Anticuerpos humanos

[0123] Los anticuerpos humanos contra alfa-SN son proporcionados por una variedad de técnicas descrita a continuación. Algunos anticuerpos humanos se seleccionan mediante experimentos de unión competitiva, o de lo contrario, para que tengan la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular, como uno de los anticuerpos monoclonales de ratón descritos en el Ejemplo XI. Los anticuerpos humanos también pueden analizarse para determinar la especificidad de un epítipo particular utilizando solo un fragmento de alfa-SN como inmunógeno, y/o seleccionando anticuerpos contra una colección de mutantes por delección de alfa-SN. Los anticuerpos humanos preferiblemente tienen especificidad de isotipo IgG1 humana.

(1) Metodología de trioma

[0124] El enfoque básico y una pareja de fusión celular ejemplar, SPAZ-4, para uso en este método han sido descritos por Oestberg et al, Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, patente de EE.UU. Nº 4.634.664; y Engleman et al., Patente de Estados Unidos 4.634.666. Las líneas celulares productoras de anticuerpos obtenidas por este método se llaman triomas, porque descienden de tres células: dos humanas y una de ratón. Inicialmente, una línea de mieloma de ratón se fusiona con un linfocito B humano para obtener una célula híbrida xenogénica que no produce anticuerpos, como la línea celular SPAZ-4 descrita por Oestberg, supra. La célula xenogénica se fusiona con un linfocito B humano inmunizado para obtener una línea celular de trioma productora de anticuerpos. Se ha encontrado que los triomas producen anticuerpos de forma más estable que los hibridomas comunes hechos de células humanas.

[0125] Los linfocitos B inmunizados se obtienen de la sangre, el bazo, los ganglios linfáticos o médula ósea de un donante humano. Si se desean anticuerpos contra un antígeno o epítipo específico, es preferible usar ese antígeno o epítipo del mismo para la inmunización. La inmunización puede ser *in vivo* o *in vitro*. Para la inmunización *in vivo*, las células B se aíslan típicamente de un humano inmunizado con alfa-SN, un fragmento del mismo, un polipéptido más grande que contiene alfa-SN o fragmento, o un anticuerpo anti-idiotípico para un anticuerpo para alfa-SN. En algunos métodos, las células B se aíslan del mismo paciente al que finalmente se administrará la terapia con anticuerpos. Para la inmunización *in vitro*, los linfocitos B se exponen típicamente al antígeno durante un período de 7-14 días en un medio como el RPMI-1640 (véase Engleman, supra) suplementado con 10% de plasma humano.

[0126] Los linfocitos B inmunizados se fusionan a una célula híbrida xenogénica tal como SPAZ-4 por métodos bien conocidos. Por ejemplo, las células se tratan con polietilenglicol al 40-50% de MW 1.000-4.000, a aproximadamente 37 grados C, durante aproximadamente 5-10 minutos. Las células se separan de la mezcla de fusión y se propagan en medio selectivo para los híbridos deseados (p. ej., HAT o AH). Los clones que secretan anticuerpos que tienen la especificidad de unión requerida se identifican analizando el medio de cultivo de trioma para determinar la capacidad de unirse a alfa-SN o un fragmento del mismo. Los triomas que producen anticuerpos humanos que tienen la especificidad deseada se subclonan mediante la técnica de dilución limitante y se cultivan *in vitro* en medio de cultivo. Las líneas celulares de trioma obtenidas se ensayan para determinar su capacidad para unirse a alfa-SN o un fragmento del mismo.

[0127] Aunque los triomas son genéticamente estables, no producen anticuerpos a niveles muy altos. Los niveles de expresión pueden aumentarse clonando los genes de anticuerpos del trioma en uno o más vectores de expresión, y transformando el vector en líneas celulares de mamíferos, bacterias o levaduras estándar.

(2) Mamíferos no humanos transgénicos

[0128] Los anticuerpos humanos contra alfa-SN también se pueden producir a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de inmunoglobulina humana. Por lo general, el locus de inmunoglobulina endógeno de tales mamíferos transgénicos está inactivado funcionalmente. Preferiblemente, el segmento del locus de inmunoglobulina humana incluye secuencias no reorganizadas de componentes de cadena pesada y ligera. Tanto la inactivación de los genes de inmunoglobulina endógena como la introducción de genes de inmunoglobulina exógenos se pueden lograr mediante recombinación homóloga dirigida, o mediante la introducción de cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos resultantes de este proceso son capaces de reorganizar funcionalmente las secuencias de componentes de inmunoglobulina, y expresan un repertorio de anticuerpos de varios isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humana, sin expresar genes de inmunoglobulina endógena. La producción y las propiedades de los mamíferos que tienen estas propiedades se describen en detalle en, p. ej., Lonberg et al., WO93/1222, US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, Nature), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741. Los ratones transgénicos son particularmente adecuados. Los anticuerpos anti-alfa-SN se obtienen inmunizando un mamífero no humano transgénico, tal como se describe por Lonberg o Kucherlapati, *supra*, con alfa-SN o un fragmento de los mismos. Los anticuerpos monoclonales son preparados, p. ej., al fusionar células B de tales mamíferos con líneas celulares de mieloma adecuadas utilizando la tecnología de Kohler-Milstein convencional. Los anticuerpos policlonales humanos también se pueden proporcionar en forma de suero de seres humanos inmunizados con un agente inmunogénico. Opcionalmente, dichos anticuerpos policlonales pueden concentrarse por purificación por afinidad utilizando alfa-SN u otro péptido amiloide como reactivo de afinidad.

(3) Métodos de visualización de fagos

[0129] Un enfoque adicional para obtener anticuerpos anti-alfa-SN humanos es cribar una biblioteca de ADN de células B humanas según el protocolo general esbozado por Huse et al, Science 246:1275-1281 (1989). Como se describe para la metodología de trioma, tales células B pueden obtenerse de un humano inmunizado con alfa-SN, fragmentos, polipéptidos más largos que contienen alfa-SN o fragmentos o anticuerpos anti-idiotípicos. Opcionalmente, tales células B se obtienen de un paciente que finalmente recibirá tratamiento con anticuerpos. Se seleccionan los anticuerpos que se unen a alfa-SN o un fragmento de los mismos. Las secuencias que codifican dichos anticuerpos (o fragmentos de unión) se clonan y amplifican. El protocolo descrito por Huse se vuelve más eficiente en combinación con la tecnología de visualización de fagos. Véase, por ejemplo, Dower et al., WO 91/17271 y Mc-Cafferty et al., WO 92/01047, US 5.877.218, US 5.871.907, US 5.858.657, US 5.837.242, US 5.733.743 y US 5.565.332. En estos métodos, se producen bibliotecas de fagos en las que los miembros muestran diferentes anticuerpos en sus superficies externas. Los anticuerpos generalmente se muestran como fragmentos Fv o Fab. Los anticuerpos que presentan fagos con una especificidad deseada se seleccionan por enriquecimiento por afinidad a un péptido alfa-SN o un fragmento del mismo.

[0130] En una variación del método de presentación de fagos, se puede producir los anticuerpos humanos que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado. Ver Winter, WO 92/20791. En este método, la región variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo murino seleccionado se utiliza como material de partida. Si, por ejemplo, una región variable de cadena ligera se selecciona, como material de partida, una biblioteca de fagos se construye en la que los miembros muestran la misma región variable de cadena ligera (es decir, el material de partida murino) y una cadena pesada de la región variable diferente. Las regiones variables de la cadena pesada se obtienen de una biblioteca de regiones variables de la cadena pesada humana reorganizadas. Se selecciona un fago que muestra una fuerte unión específica para alfa-SN (por ejemplo, al menos 10^8 y preferiblemente al menos 10^9 M⁻¹). La región variable de la cadena pesada humana de este fago sirve entonces como material de partida para construir una biblioteca de fagos adicional. En esta biblioteca, cada fago muestra la misma región variable de cadena pesada (es decir, la región identificada a partir de la primera biblioteca de presentación) y una región variable de cadena ligera diferente. Las regiones variables de cadena ligera se obtienen de una biblioteca de regiones de cadena ligera variable humana reorganizadas. De nuevo, se seleccionan los fagos que muestran una unión específica fuerte para alfa-SN. Estos fagos muestran las regiones variables de anticuerpos anti-alfa-SN completamente humanos. Estos anticuerpos usualmente tienen la misma o similar especificidad de epítipo que el material de partida murino.

vi. Selección de la región constante

[0131] Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos pueden estar enlazados para al menos una porción de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea el complemento dependiente de anticuerpos y/o la toxicidad mediada por células. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad complementaria y los isotipos IgG2 e IgG4 no. La elección del isotipo también puede afectar el paso de anticuerpos al cerebro. Se prefiere IgG1 de isotipo humano. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrameros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras,

como Fab, Fab' F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla en los cuales dominios variables de cadena pesada y ligera están vinculados a través de un espaciador.

vii. Expresión de anticuerpos recombinantes

5 **[0132]** Anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos se producen típicamente mediante la expresión recombinante. Las construcciones de polinucleótidos recombinantes típicamente incluyen una secuencia de control de la expresión unida operativamente a las secuencias codificantes de las cadenas de anticuerpos, incluidas las regiones promotoras asociadas o naturalmente heterólogas. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado al huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

15 **[0133]** Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos hospedadores ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección, p. ej., resistencia a la ampicilina o resistencia a la higromicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

20 **[0134]** *E. coli* es un huésped procariota particularmente útil para clonar las secuencias de ADN de la presente descripción. Los microbios, como la levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen la quinasa de 3-fosfoglicerato y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de deshidrogenasa de alcohol, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

25 **[0135]** Las células de mamífero son un huésped preferido para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos. Ver Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Se han desarrollado varias líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas de células CHO, varias líneas de células COS, células HeLa, células L, células de riñón embrionario humano y líneas celulares de mieloma. Preferiblemente, las células no son humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesarios, como el ribosoma, sitios de unión, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control de expresión preferidas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino y similares. Véase Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

30 **[0136]** Alternativamente, las secuencias codificantes de anticuerpos pueden incorporarse en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la expresión posterior en la leche del animal transgénico (véase, p. ej., US 5.741.957, US 5.304.489, US 5.849.992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas en enlace operable con un promotor y potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, como la caseína o la bulina de lactoglo beta.

35 **[0137]** Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés se pueden transferir en la célula huésped por procedimientos bien conocidos, dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procarióticas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, la electroporación, la lipofección, la biolística o la transfección basada en virus se pueden usar para otros huéspedes celulares. Otros métodos utilizados para transformar células de mamíferos incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección (véase en general, Sambrook et al., *Supra*). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes se pueden microinyectar en ovocitos fertilizados, o se pueden incorporar al genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de dichas células se transfieren a ovocitos enucleados.

40 **[0138]** Una vez expresados, los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con los procedimientos estándar de la técnica, incluyendo la purificación por HPLC, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase en general, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

3. Conjugados

45 **[0139]** Algunos agentes para inducir una respuesta inmune contienen el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmune contra los LB pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, un inmunógeno peptídico puede unirse a una molécula portadora adecuada para formar un conjugado que ayuda a provocar una respuesta inmune. Los vehículos adecuados incluyen albúminas séricas, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, o un toxoide de otras bacterias patógenas, tales como la difteria, *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado de toxina atenuada. Los

epítomos de células T también son moléculas portadoras adecuadas. Algunos conjugados pueden estar formados por agentes de la invención que une a una molécula de polímero inmunoestimulador (p. ej., cisteína de tripalmitoil-S-glicerina (Pam₃Cys), manano (un polímero manosa), o glucano (un polímero 1 → 2 beta)), citocinas (p. ej., IL-1, péptidos alfa y beta IL-1, IL-2, gamma-INF, IL-10, GM-CSF) y quimiocinas (por ejemplo, MIP1alfa y beta, y RANTES). Los agentes inmunogénicos también pueden unirse a péptidos que mejoran el transporte a través de los tejidos, como se describe en O'Mahony, WO 97/17613 y WO 97/17614. Los inmunógenos pueden estar vinculados a los portadores con o sin amino ácidos espaciadores (p. ej., gly-gly).

[0140] Algunos conjugados pueden formarse mediante la unión de agentes de la invención a al menos un epítomo de células T. Algunos epítomos de células T son promiscuos, mientras que otros epítomos de células T son universales. Los epítomos de células T promiscuos son capaces de mejorar la inducción de la inmunidad de las células T en una amplia variedad de sujetos que muestran varios tipos de HLA. En contraste con los epítomos de células T promiscuos, los epítomos de células T universales son capaces de mejorar la inducción de la inmunidad de las células T en un gran porcentaje, p. ej., al menos el 75%, de sujetos que muestran diversas moléculas de HLA codificadas por diferentes alelos HLA-DR.

[0141] Existen un gran número de epítomos de células T de origen natural, tales como, toxoide tetánico (p. ej., los epítomos P2 y P30), antígeno de superficie de la hepatitis B, la tos ferina, toxoide, proteína F de virus del sarampión, importante proteína de la membrana externa de *Chlamydia trachomatis*, toxoide diftérico, circumsporozita T de *Plasmodium falciparum*, antígeno CS de *Plasmodium falciparum*, isomerasa de fosfato de triosa de *Schistosoma mansoni*, TraT de *Escherichia coli* y hemaglutinina del virus de la influenza (HA). Los péptidos inmunogénicos de la invención también pueden conjugarse con los epítomos de células T descritos en Sinigaglia F. et al., Nature, 336: 778-780 (1988); Chicz RM y otros, J. Exp. Med., 178: 27-47 (1993); Hammer J. y otros, Cell 74:197-203 (1993); Falk K. y otros, Immunogenetics, 39: 230-242 (1994); WO 98/23635; y, Southwood S. et al. J. Immunology, 160: 3363-3373 (1998). Otros ejemplos incluyen:

Influenza hemaglutinina: HA₃₀₇₋₃₁₉ PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 4)

Malaria CS: epítomo T3 EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ ID NO: 5)

Antígeno superficial de Hepatitis B: HBsAg₁₉₋₂₈ FLLTRILTI (SEQ ID NO: 6)

Proteína de choque térmico 65: hsp65 153-171 DQSIGDLIAEAMDKVGNEG (SEQ ID NO: 7) bacilo Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID NO: 8)

Toxoide tetánico: TT₈₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 9)

Toxoide tetánico: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 10)

VIH gp120 T1: KQIINMWQEVGKAMY (SEQ ID NO: 11)

[0142] Alternativamente, los conjugados pueden formarse mediante la unión de los agentes de la invención a al menos un epítomo de células T artificial capaz de unirse a una gran proporción de moléculas MHC de Clase II, como el epítomo pan DR ("PADRE"). PADRE se describe en los documentos US 5.736.142, WO 95/07707, y Alexander J et al., Immunity, 1:751-761 (1994). Un péptido PADRE preferido es AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 12), (los residuos comunes en negrita) en donde X es preferiblemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la más preferida la ciclohexilalanina.

[0143] Los agentes inmunogénicos pueden estar vinculados a los portadores mediante reticulación química. Las técnicas para unir un inmunógeno a un portador incluyen la formación de enlaces disulfuro usando N-succinimidil-3-(2-piridil-tio)propionato (SPDP) y succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidril, esto se puede proporcionar mediante la adición de un residuo de cisteína). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre ellos mismos y la cisteína peptídica reside en una proteína y un enlace amida a través de épsilon-amino en una lisina u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Una variedad de tales agentes formadores de disulfuro/amida se describen por Immun. Rev. 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en lugar de un enlace disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tioéter están disponibles comercialmente e incluyen ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético y ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxilo pueden activarse combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, sal de sodio.

[0144] La inmunogenicidad se puede mejorar mediante la adición de residuos de gápmero (p. ej., gly-gly) entre el epítomo T_h y el inmunógeno de péptido de la invención. Además de separar físicamente el epítomo T_h del epítomo de células B (es decir, el inmunógeno de péptido), los residuos de glicina pueden interrumpir cualquier estructura secundaria artificial creada por la unión del epítomo T_h con el inmunógeno de péptido, y por lo tanto eliminar la interferencia entre las respuestas de las células T y/o B. La separación conformacional entre el epítomo auxiliar y el dominio que provoca el anticuerpo permite así interacciones más eficientes entre el inmunógeno presentado y las células T_h y B apropiadas.

[0145] Para mejorar la inducción de inmunidad de células T en un gran porcentaje de sujetos que muestran diferentes tipos de HLA a un agente de la presente invención, se puede preparar una mezcla de conjugados con diferentes epítomos de células T_h. La mezcla puede contener una mezcla de al menos dos conjugados con diferentes epítomos de células T_h, una mezcla de al menos tres conjugados con diferentes epítomos de células T_h, o una mezcla

de al menos cuatro conjugados con diferentes epítomos de células T_H. La mezcla se puede administrar con un adyuvante.

5 [0146] Los péptidos inmunogénicos también pueden expresarse como proteínas de fusión con vehículos (es decir, péptidos heterólogos). El péptido inmunogénico se puede unir en su extremo amino, su extremo carboxil, o ambos a un portador. Opcionalmente, pueden estar presentes múltiples repeticiones del péptido inmunogénico en la proteína de fusión. Opcionalmente, un péptido inmunogénico puede unirse a múltiples copias de un péptido heterólogo, por ejemplo, en los extremos N y C del péptido. Algunos péptidos portadores sirven para inducir una respuesta de células T auxiliares contra el péptido portador. Las células T auxiliares inducidas inducen a su vez una respuesta de las células B contra el péptido inmunogénico unido al péptido portador.

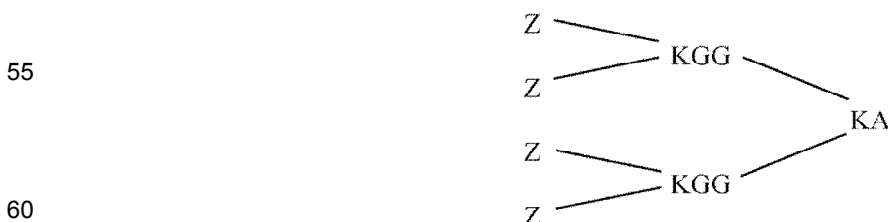
15 [0147] Algunos agentes comprenden una proteína de fusión en la que un fragmento N-terminal de alfa-SN está unido en su extremo C a un péptido portador. En tales agentes, el residuo N-terminal del fragmento de alfa-SN constituye el residuo N-terminal de la proteína de fusión. Por consiguiente, tales proteínas de fusión son eficaces para inducir anticuerpos que se unen a un epítipo que requiere que el residuo N-terminal de alfa-SN esté en forma libre. Algunos agentes comprenden una pluralidad de repeticiones de NAC enlazadas en el extremo C a una o más copias de un péptido portador. Algunas proteínas de fusión comprenden diferentes segmentos de alfa-SN en tándem.

20 [0148] Algunos agentes comprenden una proteína de fusión en la que un fragmento C-terminal de alfa-SN está unido en su extremo N a un péptido portador. En tales agentes, el residuo C-terminal del fragmento de alfa-SN constituye el residuo C-terminal de la proteína de fusión. Por consiguiente, tales proteínas de fusión son eficaces para inducir anticuerpos que se unen a un epítipo que requiere que el residuo C-terminal de alfa-SN esté en forma libre. Algunos agentes comprenden una pluralidad de repeticiones de un péptido C-terminal, como el SN125-140 unido en el extremo N a una o más copias de un péptido portador. Algunas proteínas de fusión comprenden diferentes segmentos de alfa-SN en tándem.

30 [0149] En algunas proteínas de fusión, la NAC se fusiona en su extremo N-terminal a un péptido portador heterólogo. NAC se puede utilizar con fusiones C-terminales. Algunas proteínas de fusión comprenden un péptido heterólogo unido al extremo N o al extremo C de la NAC, que a su vez está vinculado a uno o más segmentos NAC adicionales de alfa-SN en tándem. Algunas proteínas de fusión comprenden múltiples copias de un péptido de alfa-sinucleína C-terminal, como se describió anteriormente, y múltiples copias de un péptido heterólogo interconectado entre sí.

35 [0150] Algunos ejemplos de proteínas de fusión se muestran a continuación. Algunas de estas proteínas de fusión comprenden segmentos de alfa-SN (incluidos cualquiera de los fragmentos descritos anteriormente) unidos a epítomos de toxoide tetánico, como se describe en los documentos US 5.196.512, EP 378.881 y EP 427.347. Algunas proteínas de fusión comprenden segmentos de alfa-SN unidos a al menos un PADRE. Algunos péptidos heterólogos son epítomos de células T promiscuas, mientras que otros péptidos heterólogos son epítomos de células T universales. En algunos métodos, el agente para la administración es simplemente una proteína de fusión única con un segmento alfa-SN unido a un segmento heterólogo en configuración lineal. Los agentes terapéuticos pueden representarse utilizando una fórmula. Por ejemplo, en algunos métodos, el agente es un multímero de proteínas de fusión representadas por la fórmula 2^x, en donde x es un número entero de 1-5. Preferiblemente, x es 1, 2 o 3, siendo 2 el más preferido. Cuando x es dos, tal multímero tiene cuatro proteínas de fusión unidas en una configuración preferida denominada MAP4 (véase US 5.229.490).

50 [0151] La configuración MAP4 se muestra a continuación, donde las estructuras ramificadas se producen mediante el inicio de la síntesis de péptidos tanto en el extremo N y las aminas de cadena lateral de la lisina. Dependiendo del número de veces que se incorpore lisina a la secuencia y se permita que se ramifique, la estructura resultante presentará múltiples extremos N. En este ejemplo, se han producido cuatro extremos N idénticos en el núcleo que contiene lisina ramificada. Tal multiplicidad aumenta grandemente la capacidad de respuesta de las células B afines.



65 [0152] Z se refiere al péptido NAC, un fragmento del péptido NAC, u otro fragmento activo de alfa-SN como se describe en la sección I. 2 anterior. Z puede representar más de un fragmento activo, por ejemplo:

Z = péptido alfa-SN 60-72 (región NAC) = NH₂-KEQVTNVCGGAVVT-COOH (SEQ ID NO: 13)

Z = péptido alfa-SN (región NAC) = NH₂-GVTAVAQKTVECG-COOH (SEQ ID NO: 14)

Z = péptido alfa-SN 102-112 = ácido NH₂-C-amino-heptanoico-KNEEGAPCQEG-COOH (SEQ ID NO: 15)
 péptido alfa-SN 128-140

5 **[0153]** Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

Z-toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 16)

Z-toxoide tetánico 947-967 en una configuración MAP4:

10 Z-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 17)

Z-toxoide tetánico₈₃₀₋₈₄₄ en una configuración MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 18)

Z-Toxoide tetánico₈₃₀₋₈₄₄ + toxoide tetánico₉₄₇₋₉₆₇ en una configuración lineal:

15 Z-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 19)

[0154] El péptido PADRE (todo en configuraciones lineales), en donde X es preferiblemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la más preferida la ciclohexilalanina-Z:

AKXVAAWTLKAAA-Z (SEQ ID NO: 20)

20 Péptido 3Z-PADRE:

Z-Z-Z-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 21)

[0155] Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

25 AKXVAAWTLKAAA-Z-Z-Z (SEQ ID NO: 22)

Z-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 23)

Z-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 24)

30 PKYVKQNTLKLAT-Z-Z-Z (SEQ ID NO: 25)

Z-PKYVKQNTLKLAT-Z (SEQ ID NO: 26)

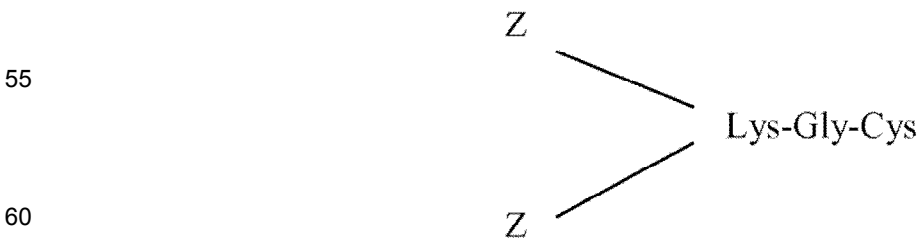
35 Z-Z-Z-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 27)

Z-Z-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 28)

40 Z-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-
 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z-Z-Z-Z-QYIKANSKFIGITEL-
 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 29)

45 Z-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z-
 QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z (SEQ ID NO: 30)

50 Z-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 31) en una resina 2 ramificada:



EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 32)

(Proteína de fusión del fragmento de sinucleína en configuración MAP-4)

65

[0156] Los mismos o similares métodos y proteínas de vinculación de soporte se pueden utilizar para la generación de inmunógenos para ser usados en la generación de anticuerpos contra alfa-SN para su uso en la inmunización pasiva. Por ejemplo, puede administrarse alfa-SN o un fragmento unido a un portador a un animal de laboratorio en la producción de anticuerpos monoclonales para alfa-SN.

5

4. Ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos

[0157] Las respuestas inmunes contra los cuerpos de Lewy también pueden ser inducidas mediante la administración de segmentos nucleicos ácidos de codificación de péptido alfa-SN, y fragmentos de los mismos, otros inmunógenos peptídicos, o anticuerpos y sus cadenas componentes usadas para inmunización pasiva. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno está típicamente vinculado a elementos reguladores, como un promotor y un potenciador que permiten la expresión del segmento de ADN en las células diana deseadas de un paciente. Para la expresión en células sanguíneas, como es deseable para la inducción de una respuesta inmune, los elementos promotores y potenciadores de los genes de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada o el promotor y potenciador temprano intermedio principal CMV son adecuados para la expresión directa. Los elementos regulatorios vinculados y las secuencias codificadoras a menudo se clonan en un vector. Para la administración de anticuerpos de cadena doble, las dos cadenas se pueden clonar en vectores iguales o separados. El ácido nucleico que codifica los agentes terapéuticos también puede codificar al menos un epítipo de células T. Las descripciones en el presente documento que se refieren al uso de adyuvantes y al uso de aplicarse *mutatis mutandis* a su uso con los agentes terapéuticos que codifican ácidos nucleicos.

[0158] Un número de sistemas de vectores virales están disponibles, incluyendo sistemas retrovirales (véase, p. ej. Lawrie y Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)); vectores adenovirales (ver, p. ej. Bett et al, J. Virol 67, 5911 (1993).); vectores adenovirales asociados (ver, p. ej., Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)), vectores virales de la familia de la viruela, incluyendo virus vaccinia y los virus de la viruela aviar, vectores virales del género de virus alfa tales como los derivados de los virus del bosque Sindbis y Semliki (ver, p. ej., Dubensky et al., J. Virol. 70, 508-519 (1996)), virus de la encefalitis equina venezolana (véase de EE.UU. 5,643,576) y rabdovirus, tales como el virus de la estomatitis vesicular (véase el documento WO 96/34625) y los virus del papiloma (Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629 y Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

[0159] El ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que lo contiene, puede empaquetarse en liposomas. Los lípidos adecuados y los análogos relacionados se describen en los documentos US 5.208.036, US 5.264.618, US 5.279.833 y US 5.283.185. Los vectores y el ADN que codifican un inmunógeno también pueden adsorberse a o asociarse con vehículos particulados, ejemplos de los cuales incluyen polímeros de polimetil metacrilato y polilactidas y poli(lactida-co-glicólidos), (véase, p. ej., McGee et al., J Micro Encap. 1996).

[0160] Los vectores de terapia génica o ADN desnudo se pueden administrar in vivo mediante la administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (p. ej., infusión intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica, o intracraneal) o aplicación tópica (ver, p. ej., EE.UU. 5.399.346). Tales vectores pueden incluir además agentes tales como bupivacaína (ver p. ej., US 5.593.970). El ADN también se puede administrar utilizando una pistola de genes. Ver Xiao y Brandsma, *supra*. El ADN que codifica un inmunógeno se precipita sobre la superficie de perlas de metal microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda de choque o gas de helio en expansión, y penetran en los tejidos a una profundidad de varias capas celulares. Por ejemplo, el dispositivo de administración de genes Accel™ fabricado por Agacetus, Inc. Middleton, WI es adecuado. Alternativamente, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel al torrente sanguíneo simplemente manchando el ADN en la piel con irritación química o mecánica (véase el documento WO 95/05853).

[0161] En una variación adicional, los vectores que codifican inmunógenos pueden suministrarse a células ex vivo, tales como células explantadas de un paciente individual (p. ej., linfocitos, aspirados de médula ósea y biopsia de tejido) o células madre hematopoyéticas donantes universales, seguido de la reimplantación de las células en un paciente, generalmente después de la selección de las células que han incorporado el vector.

55 III. AGENTES PARA INDUCIR LA RESPUESTA INMUNOGÉNICA CONTRA A β

[0162] A β , también conocidos como péptido β -amiloide, o péptido A4 (véase los Estados Unidos 4.666.829; Glenner y Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)), es un péptido de 39-43 aminoácidos, que es el componente principal de las placas características de la enfermedad de Alzheimer. Se genera A β mediante el procesamiento de una proteína APP más grande por dos enzimas, denominadas secretasas β y γ (véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)). Las mutaciones conocidas en APP asociadas con la enfermedad de Alzheimer se producen cerca del sitio de secretasa β o γ , o dentro de A β . Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de la escisión de la secretasa γ de la APP en su procesamiento a A β , y las posiciones 670/671 están cercanas al sitio de la escisión de la secretasa β . Se cree que las mutaciones causan la EA al interactuar con las reacciones de escisión por las cuales se forma A β para aumentar la cantidad de la forma de 42/43 aminoácidos de A β generada.

65

[0163] A β tiene la propiedad inusual de que puede arreglar y activar cascadas de complemento tanto clásicas como alternativas. En particular, se une a C1q y en última instancia a C3bi. Esta asociación facilita la unión a macrófagos que conducen a la activación de las células B. Además, C3bi se descompone aún más y luego se une a CR2 en las células B de una manera dependiente de las células T, lo que lleva a un aumento de 10.000 en la activación de estas células. Este mecanismo hace que A β genere una respuesta inmunitaria superior a la de otros antígenos.

[0164] A β tiene varias formas naturales. Las formas humanas de A β se denominan A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43. Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor de APP se ilustran en la Fig. 1 de Hardy et al., TINS 20, 155-158 (1997). Por ejemplo, A β 42 tiene la secuencia: DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT (SEQ ID NO: 33).

[0165] A β 41, A β 40 y A β 39 difieren de A β 42 por la omisión de Ala, Ala-Ile, una d Ala-Ile-Val, respectivamente, desde el extremo C-terminal. A β 43 se diferencia de A β 42 por la presencia de un residuo Thr en el extremo C-terminal.

[0166] Los agentes análogos a los descritos anteriormente para alfa-SN se han descrito anteriormente para A β (véase WO 98/25386 y WO 00/72880). Estos agentes incluyen A β y fragmentos activos de los mismos, conjugados de A β , y conjugados de fragmentos activos beta, anticuerpos a A β y fragmentos activos de los mismos (p. ej., anticuerpos de ratón, humanizados, humanos, y quiméricos), y ácidos nucleicos que codifican cadenas de anticuerpos. Se prefieren los fragmentos activos de la mitad N-terminal de A β . Los fragmentos inmunogénicos preferidos incluyen A β 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 3-7, 1-3 y 1-4. La designación A β 1-5, por ejemplo, indica un fragmento que incluye los residuos 1-5 de A β y carece de otros residuos de A β . Se prefieren particularmente fragmentos que comienzan en los residuos 1-3 de A β y terminan en los residuos 7-11 de A β .

[0167] Las descripciones en este documento que se refieren a agentes que inducen una respuesta inmune activa, agentes para inducir una respuesta inmune pasiva, conjugados, y ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos (véase Secciones II. 1, 2, 3 y 4, arriba) se aplican *mutatis mutandis* para el uso de A β y sus fragmentos. Las descripciones en el presente documento que se relacionan con agentes que inducen una respuesta inmune activa, edades para inducir una respuesta inmune pasiva, conjugados y ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos (véase las Secciones II. 1, 2, 3 y 4, arriba) se aplican *mutatis mutandis* al uso de A β y sus fragmentos. Las descripciones en este documento que se relacionan con los pacientes son susceptibles de tratamiento, y los regímenes de tratamiento (véase las Secciones IV y V, a continuación) se aplican *mutatis mutandis* al uso de A β y sus fragmentos.

[0168] A β desagregado o sus fragmentos significa unidades peptídicas monoméricas. A β desagregado o sus fragmentos son generalmente solubles, y son capaces de auto-agregarse para formar oligómeros solubles. Los oligómeros de A β y sus fragmentos son generalmente solubles y existen predominantemente como hélices alfa o bobinas aleatorias. A β agregado o fragmentos de los mismos, significa oligómeros de alfa-SN o fragmentos de los mismos que se asocian en ensamblajes de láminas beta insolubles. A β agregado o fragmentos del mismo, significa también polímeros fibrilares. Las fibrillas suelen ser insolubles. Algunos anticuerpos se unen a A β soluble o fragmentos de los mismos o A β agregados o fragmentos de los mismos. Algunos anticuerpos se unen a A β soluble o fragmentos de los mismos y agregados A β o fragmentos de los mismos. Algunos ejemplos de conjugados incluyen:

AN90549 (A β 1-7-toxoide tetánico 830-844 en una configuración MAP4): (SEQ ID NO: 34)
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL

AN90550 (A β 1-7-toxoide tetánico 947-967 en una configuración MAP4):
DAEFRHD-FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE (SEQ ID NO: 35)

AN90542 (A β 1-7-toxoide tetánico 830-844 + 947-967 en una configuración lineal):
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWRVLPKVSASHLE (SEQ ID NO: 36)

AN90576: (A β 3-9)-toxoides tetánicos 830-844 en una configuración MAP4):
EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 37)

[0169] El péptido PADRE (todo en configuraciones lineales), en el que X es preferiblemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la más preferida la cicloilaxilalanina:

AN90562 (PADRE-A β 1-7):
AKXVAAWTLAAA-DAEFRHD (SEQ ID NO: 38)

AN90543 (3 PADRE-A β 1-7):
DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 39)

[0170] Otros ejemplos de proteínas de fusión (epítipo inmunogénico de A β en negrita) incluyen:

AKXVAAWTLKAAA-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (SEQ ID NO: 40)

DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 41)

5 **DAEFRHD**-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 42)

FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 43)

EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 44)

10 PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (SEQ ID NO: 45)

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD (SEQ ID NO: 46)

15 **DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD**- PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 47)

DAEFRHD-DAEFRHD- PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 48)

20 **DAEFRHD**-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-QYIKANSKFIGITEL-
FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO: 49)

25 **DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD**-
QYIKANSKFIGITELNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 50)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 51)

30 **DAEFRHD**-QYIKANSKFIGITE LCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEQ ID NO: 52)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 53) en una resina de 2 ramas.



45 **[0171]** Los anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de Aβ (con el primer residuo de extremo N de Aβ natural designada 1). Algunos anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítipo dentro de los aminoácidos 1-5, y algunos a un epítipo dentro de 5-10. Algunos anticuerpos preferidos se unen a epítipos dentro de los aminoácidos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 o 3-7. Algunos anticuerpos preferidos se unen a un epítipo que comienza en los restos 1-3 y termina en los residuos 7-11 de Aβ. Otros anticuerpos incluyen los que se unen a epítipos con los residuos 13 a 280 (p. ej., anticuerpo monoclonal 266). Los anticuerpos preferidos tienen isotipo IgG1 humano.

50 IV. ANTICUERPOS DE EVALUACIÓN PARA LA ACTIVIDAD DE LIMPIEZA

55 **[0172]** La descripción proporciona métodos para seleccionar un anticuerpo para actividad en la eliminación de un cuerpo de Lewy o cualquier otro antígeno, o entidad biológica asociada, para la cual se desea la actividad de eliminación. Para evaluar la actividad contra un cuerpo de Lewy, una muestra de tejido de un cerebro de un paciente con EP o un modelo animal con patología de Parkinson característica se pone en contacto con células fagocíticas que llevan un receptor de Fc, como células microgliales, y el anticuerpo que se está ensayando en un medio *in vitro*. Las células fagocíticas pueden ser un cultivo primario o una línea celular, como BV-2, C8-B4 o THP-1. En algunos métodos, los componentes se combinan en un portaobjetos de microscopio para facilitar el monitoreo microscópico. En algunos métodos, las reacciones múltiples se realizan en paralelo en los pozos de una placa de microtitulación. En tal formato, se puede montar un portaobjetos de microscopio en miniatura en los pozos separados, o se puede usar un formato de detección no microscópico, como la detección ELISA de alfa-SN. Preferiblemente, se realiza una serie de mediciones de la cantidad de cuerpo de Lewy en la mezcla de reacción *in vitro*, a partir de un valor de referencia antes de que la reacción haya avanzado, y uno o más valores de prueba durante la reacción. El antígeno se puede detectar mediante tinción, por ejemplo, con un anticuerpo marcado con fluorescencia para alfa-SN u otros componentes de LB. El anticuerpo utilizado para la tinción puede o no ser el mismo que el anticuerpo que se está analizando para determinar la actividad de eliminación. Una reducción relativa a la línea de base durante la reacción de los LB indica que el anticuerpo bajo prueba tiene actividad de eliminación. Es probable que tales anticuerpos

sean útiles para prevenir o tratar la EP y otros ECL.

[0173] Métodos análogos se pueden utilizar para detectar anticuerpos para la actividad en la limpieza de otros tipos de entidades biológicas. El ensayo se puede usar para detectar la actividad de limpieza contra prácticamente cualquier tipo de entidad biológica. Típicamente, la entidad biológica tiene algún papel en la enfermedad humana o animal. La entidad biológica se puede proporcionar como una muestra de tejido o en forma aislada. Si se proporciona como una muestra de tejido, la muestra de tejido preferiblemente no está fijada para permitir el acceso fácil a los componentes de la muestra de tejido y para evitar perturbar la conformación de los componentes relacionados con la fijación. Los ejemplos de muestras de tejido que se pueden analizar en este ensayo incluyen tejido canceroso, tejido precanceroso, tejido que contiene crecimientos benignos como verrugas o lunares, tejido infectado con microorganismos patógenos, tejido infiltrado con células inflamatorias, matrices patológicas que contienen tejido entre las células (por ejemplo, pericarditis fibrinosa), tejido con antígenos aberrantes y tejido cicatricial. Los ejemplos de entidades biológicas aisladas que pueden usarse incluyen alfa-SN, antígenos o virus virales, proteoglicanos, antígenos de otros microorganismos patógenos, antígenos tumorales y moléculas de adhesión. Dichos antígenos pueden obtenerse a partir de fuentes naturales, expresión recombinante o síntesis química, entre otros medios. La muestra de tejido o entidad biológica aislada se pone en contacto con células fagocíticas que llevan receptores Fc, como monocitos o células microgliales, y un anticuerpo para ser ensayado en un medio. El anticuerpo puede dirigirse a la entidad biológica sometida a prueba o a un antígeno asociado con la entidad. En esta última situación, el objetivo consiste en ensayar si la entidad biológica es vicariamente fagocitosada con el antígeno. Normalmente, aunque no necesariamente, el anticuerpo y la entidad biológica (a veces con un antígeno asociado) se ponen en contacto entre sí antes de agregar las células fagocíticas. La concentración de la entidad biológica y/o el antígeno asociado, si está presente, permanece en el medio y luego se controla. Una reducción en la cantidad o concentración de antígeno o la entidad biológica asociada en el medio indica que el anticuerpo tiene una respuesta de eliminación contra el antígeno y/o entidad biológica asociada en combinación con las células fagocíticas.

[0174] Los anticuerpos u otros agentes también pueden ser examinados para la actividad en la limpieza de cuerpos de Lewy utilizando el ensayo *in vitro* descrito en el Ejemplo II. Las células neuronales transfectadas con un vector de expresión que expresa sinucleína forman inclusiones de sinucleína que pueden visualizarse microscópicamente. La actividad de un anticuerpo u otro agente para eliminar tales inclusiones se puede determinar comparando la apariencia o el nivel de sinucleína en las células transfectadas tratadas con el agente con la apariencia o el nivel de sinucleína en las células de control no tratadas con el agente. Una reducción en el tamaño o la intensidad de las inclusiones de sinucleína o una reducción en el nivel de actividad de señales de sinucleína en la eliminación de sinucleína. La actividad puede monitorizarse visualizando las inclusiones de sinucleína microscópicamente o ejecutando extractos de células en un gel y visualizando una banda de sinucleína. Como se señaló en el Ejemplo 1, sección 2, el cambio en el nivel de sinucleína es más marcado si los extractos se fraccionan en fracciones citosólicas y de membrana, y se analiza la fracción de membrana.

[0175] Los anticuerpos u otros agentes también pueden ser examinados para la actividad en la limpieza de cuerpos de Lewy utilizando el ensayo *in vivo* descrito en el Ejemplo IX. Brevemente, se inyecta un anticuerpo de prueba en el neocórtex de ratones transgénicos que sobreexpresan α -sinucleína humana y tienen agregados de α -sinucleína intraneuronales. En un enfoque, los animales utilizados son ratones transgénicos heterocigotos de 4 a 8 meses de edad que sobreexpresan α -sinucleína humana de tipo salvaje en el cerebro bajo el control transcripcional del promotor PDGF (véase Maliah, 2000, Science 287:1265-69). El anticuerpo y los controles de prueba (p. ej., anticuerpos de control irrelevantes de isotipo coincidente) se disuelven en una solución adecuada (p. ej., solución salina tamponada con fosfato estéril) para la inyección en ratones. Para cada ratón, 2 μ l de una solución de anticuerpo de 2 mg/ml se inyectan estereotácticamente bajo anestesia en las capas profundas del neocórtex parietal del hemisferio cerebral derecho (lado ipsilateral). Los hemisferios izquierdos (lado contralateral) sirven como control de línea de base para cada ratón. Los sitios de inyección se suturan y los ratones se controlan hasta que se recuperan de la anestesia. Dos semanas después de la inyección, los ratones se sacrificaron, se extrajeron sus cerebros y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 48 h, y se cortan coronalmente a 40 μ m de espesor. Secciones de todo el sitio de la inyección se tiñeron con un anticuerpo α -sinucleína (p. ej., ELADW-47, reconociendo aminoácidos alfa-sinucleína 115-122). Para cada sección, los agregados de α -sinucleína intraneuronal se cuentan en 4 campos microscópicos (objetivo 20x) alrededor del sitio de inyección en el hemisferio ipsilateral y en 4 campos correspondientes en el hemisferio de control contralateral. Para cada animal, se agregan los recuentos de agregados de α -sinucleína para dos secciones y la diferencia entre el recuento total de agregados de α -sinucleína entre los dos hemisferios es determinar el efecto del anticuerpo de prueba en el despeje agregado para cada ratón individual. Una reducción en el recuento total de agregados de α -sinucleína en el hemisferio tratado es indicio de que los anticuerpos u otros agentes tienen actividad en la eliminación de los cuerpos de Lewy. Preferiblemente se observa una reducción de al menos el 10%. Más preferiblemente, se observa una reducción de al menos 20%, al menos 40%, al menos 60% o al menos 80%.

V. PACIENTES AMENABLES A LOS REGÍMENES DE TRATAMIENTO DE COMPONENTES DE CUERPO ANTI-LEWY

[0176] Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de una enfermedad sinucleinopática

pero no muestran síntomas, así como pacientes que muestran actualmente síntomas. Los pacientes susceptibles de tratamiento también incluyen individuos con riesgo de enfermedad de una ECL pero que no muestran síntomas, así como pacientes que presentan síntomas en la actualidad. Tales enfermedades incluyen la enfermedad de Parkinson (incluyendo la enfermedad de Parkinson idiopática), DCL, EDCL, LBVAD, fallo autonómico puro, disfagia de cuerpo Lewy, ECL incidental, ECL heredada (p. ej., mutaciones del gen de la alfa-SN, PARK3 y PARK4) y atrofia multisistémica (p. ej., atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome de Shy-Drager). Por lo tanto, los métodos actuales pueden administrarse profilácticamente a individuos que tienen un riesgo genético conocido de una ECL. Tales individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo está determinado por el análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo para la EP incluyen mutaciones en los genes de sinucleína o Parkin, UCHL1 y CYP2D6; particularmente mutaciones en la posición 53 del gen de sinucleína. Las personas que actualmente padecen la enfermedad de Parkinson pueden ser reconocidas por sus manifestaciones clínicas, que incluyen temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural.

[0177] En algunos métodos, es libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de cualquier enfermedad amiloidogénica y sufre de al menos una enfermedad sinucleinopática. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de cualquier enfermedad caracterizada por depósitos de amiloide extracelular. En algunos métodos, el paciente está libre de enfermedades caracterizadas por depósitos de amiloide del péptido A β . En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo, deterioro cognitivo leve y síndrome de Down. En algunos métodos, el paciente tiene enfermedad de Alzheimer concurrente y una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el paciente tiene enfermedad de Alzheimer concurrente y una enfermedad caracterizada por la acumulación de sinucleína. En algunos métodos, el paciente tiene enfermedad de Alzheimer y Parkinson concurrente.

[0178] En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (p. ej., 10, 20, o 30). Por lo general, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que la paciente llegue a 40, 50, 60 o 70. El tratamiento generalmente implica dosis múltiples durante un período de tiempo. El tratamiento puede monitorizarse mediante el ensayo de anticuerpo, o activa las respuestas de células B de células T o al agente terapéutico (p. ej., péptido alfa-SN o A β , o ambos) a lo largo del tiempo. Si la respuesta se cae, se indica una dosis de refuerzo.

[0179] Opcionalmente, la presencia de ausencia de síntomas, signos o factores de riesgo de una enfermedad se determina antes de comenzar el tratamiento.

VI. PACIENTES AMENABLES A LOS REGÍMENES DE TRATAMIENTO DE COMPONENTES ANTIAMILOIDES

[0180] Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad pero que no muestran síntomas, así como pacientes que muestran actualmente síntomas de la amiloidosis. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquier persona corre el riesgo de padecerla si vive lo suficiente. Por lo tanto, los presentes métodos pueden administrarse profilácticamente a la población general sin la necesidad de realizar una evaluación del riesgo del paciente en cuestión. Los métodos actuales son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer o cualquiera de las otras enfermedades amiloides hereditarias. Tales individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo está determinado por el análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo para la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y posiciones 670 y 671 denominadas mutaciones Hardy y Swedish respectivamente (véase Hardy, TINS, supra). Otros marcadores de riesgo son las mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, antecedentes familiares de EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Las personas que actualmente padecen la enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidas de demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, hay una serie de pruebas de diagnóstico disponibles para identificar a las personas que tienen EA. Estos incluyen la medición de los niveles de LCR tau y A β 42. La elevación de tau y la disminución de los niveles de A β 42 significan la presencia de EA. Las personas que padecen la enfermedad de Alzheimer también pueden ser diagnosticadas por los criterios de MMSE o ADRDA como se explica en la sección de Ejemplos.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Por lo general, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcance los 40, 50, 60 o 70. El tratamiento generalmente implica dosis múltiples durante un período de tiempo. El tratamiento puede monitorizarse mediante el ensayo de anticuerpo, o activa las respuestas de células T o células B al agente terapéutico (p. ej., NAC) con el tiempo, a lo largo de las líneas descritas en VII Métodos de Vigilancia y Diagnóstico, a continuación. Si la respuesta cae, se indica una dosis de refuerzo.

VII. REGÍMENES DE TRATAMIENTO

[0181] En general, los regímenes de tratamiento implican administrar un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica a la alfa-SN y/o un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica a A β a un paciente. En

aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible o, de lo contrario, en riesgo de una ECL u otra enfermedad sinucleopática en un régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición o medicamento suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, incluidos los síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicamentos se administran a un paciente sospechoso o que ya padece una enfermedad de este tipo en un régimen que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (fisiológico, bioquímico, histológico y/o conductual), incluidas sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, en algunos métodos, el tratamiento produce al menos una eliminación parcial de los cuerpos de Lewy, al menos una desagregación parcial de los cuerpos de Lewy y/o reduce los niveles de oligómeros de alfa-sinucleína en las sinapsis. Una cantidad adecuada para llevar a cabo un tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Una combinación de cantidad y frecuencia de dosificación adecuada para lograr un tratamiento terapéutico o profiláctico se define como un régimen terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Tanto en los regímenes profilácticos como en los terapéuticos, los agentes generalmente se administran en varias dosis hasta que se logra una respuesta inmune suficiente. Normalmente, la respuesta inmune se monitorea y se administran dosis repetidas si la respuesta inmune comienza a disminuir.

[0182] En algunos métodos, la administración de un agente resulta en la reducción de los niveles intracelulares de sinucleína agregada. En algunos métodos, la administración de un agente produce una mejoría en un síntoma clínico de una ECL, como la función motora en el caso de la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la reducción en los niveles intracelulares de sinucleína agregada o la mejora en un síntoma clínico de la enfermedad se monitorea a intervalos después de la administración de un agente.

[0183] Las dosis efectivas de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, ya sea que el paciente sea humano o animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, incluidos los mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento deben ajustarse para optimizar la seguridad y la eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si también se administra adyuvante, y se requieren dosis más altas en ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunógeno para la administración a veces varía de 1-500 µg por paciente y, más generalmente, de 5-500 µg por inyección para administración humana. Ocasionalmente, se usa una dosis más alta de 1-2 mg por inyección. Típicamente, se utilizan aproximadamente 10, 20, 50 o 100 µg para cada inyección humana. La masa del inmunógeno también depende de la proporción de masa del epítipo inmunogénico dentro del inmunógeno a la masa del inmunógeno en su conjunto. Típicamente, se usan 10^{-3} a 10^{-5} micromoles de epítipo inmunogénico para microgramos de inmunógeno. El momento de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, una vez al año, una vez cada década. En cualquier día dado que se da una dosificación de inmunógeno, la dosificación es mayor que 1 µg/paciente y habitualmente mayor que 10 µg/paciente si también se administra el adyuvante, y mayor que 10 µg/paciente y habitualmente mayor que 100 µg/paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo en intervalos de tiempo, como intervalos de 6 semanas. Otro régimen consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Otro régimen conlleva una inyección cada dos meses de por vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser de forma irregular, según lo indicado por el monitoreo de la respuesta inmune.

[0184] Para la inmunización pasiva con un anticuerpo, los intervalos de dosificación de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1-10 mg/kg o, en otras palabras, 70 mg o 700 mg o dentro del rango de 70-700 mg, respectivamente, para un paciente de 70 kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado cae dentro de los rangos indicados. El anticuerpo se suele administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica al medir los niveles de anticuerpos en sangre del alfa-SN en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una concentración de anticuerpos en plasma de 1-1000 µg/mL y en algunos métodos de 25 a 300 µg/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría

parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, a la patente se le puede administrar un régimen profiláctico.

5 **[0185]** Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican inmunógenos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para los vectores virales infecciosos varían de 10 a 100, o más, viriones por dosis.

10 **[0186]** Los agentes para inducir una respuesta inmune pueden administrarse por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intratecales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración más típica de un agente inmunogénico es subcutánea, aunque otras vías pueden ser igualmente efectivas. La siguiente vía más frecuente es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza generalmente en los músculos del brazo o la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se acumulan depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. La inyección intramuscular o la infusión intravenosa se prefieren para la administración de anticuerpos. En algunos métodos, los anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, como un dispositivo Medipad™.

20 **[0187]** Como se ha señalado anteriormente, los agentes que inducen una respuesta inmunogénica contra alfa-SN y Aβ respectivamente pueden administrarse en combinación. Los agentes pueden combinarse en una única preparación o kit para uso simultáneo, secuencial o separado. Los agentes pueden ocupar viales separados en la preparación o kit o pueden combinarse en un solo vial. Estos agentes pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de la ECL. En el caso de la enfermedad de Parkinson y el síndrome de Down, en los cuales los LB aparecen en el cerebro, los agentes de la invención también pueden administrarse junto con otros agentes que aumentan el paso de los agentes de la invención a través de la barrera hematoencefálica.

30 **[0188]** Los agentes inmunogénicos, tales como péptidos, se administran a veces en combinación con un adyuvante. Se puede usar una variedad de adyuvantes en combinación con un péptido, como alfa-SN, para provocar una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin causar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, lípido A monofosforil 3 De-O-acilado (MPL™) (véase GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un glicósido triterpénico o saponina aislada de la corteza del árbol de Quillaja Saponaria Molina encontrada en América del Sur (véase Kensil et al., en *Vaccine Design: The Subunit and Adyach Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (como el escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunológicos, como el lípido A monofosforil (véase Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), polímeros plurónicos, y micobacterias muertas. Otro adyuvante es CpG (WO 98/40100). Alternativamente, alfa-SN o Aβ se pueden acoplar a un adyuvante. Sin embargo, tal acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación de alfa-SN para afectar la naturaleza de la respuesta inmune a la misma. Los adyuvantes pueden administrarse como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse por separado, antes, simultáneamente con, o después de la administración del agente terapéutico.

45 **[0189]** Una clase preferida de adyuvantes es sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de alumbre, fosfato de alumbre, sulfato de alumbre. Dichos adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglútamico o polilisina. otra clase de adyuvantes son las formulaciones de emulsión de aceite en agua. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (p. ej., N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-iso-glutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) theramide™), u otros componentes bacterianos de la pared celular. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (WO 90/14837), que contiene 5% de escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85 (que contiene opcionalmente varias cantidades de MTP-PE) formuladas en partículas submicrónicas utilizando un microfluidizador como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero bloqueado por pluronic L121 y thr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrónica o vortex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula y (c) sistema de adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT) que contiene 2% de escualeno, Tween 80 al 0,2% y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™).

65 **[0190]** Otra clase de adyuvantes preferidos es adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (QS-21, Aquila, Framingham, MA) o partículas generadas de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes) y ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen RC-529, GM-CSF y adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (p. ej., IL-1, IL-2, IL-4, IL-

6, IL-12, IL13 e IL-15), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral (FNT). Otra clase de adyuvantes son los análogos de glucolípidos que incluyen N-glicosilamidas, N-glicosilureas y N-glicosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el residuo de azúcar por un aminoácido, como inmunomoduladores o adyuvantes (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.855.283). Proteínas de choque térmico, p. ej., HSP70 y HSP90, también se pueden usar como adyuvantes.

[0191] Un adyuvante puede administrarse con un inmunógeno como una única composición, o se puede administrar antes de, simultáneamente con o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y el adyuvante se pueden envasar y suministrar en el mismo frasco o se pueden envasar en viales separados y mezclarse antes de usarse. El inmunógeno y el adyuvante se envasan típicamente con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica prevista. Si el inmunógeno y el adyuvante se envasan por separado, el empaque generalmente incluye instrucciones para mezclar antes del uso. La elección de un adyuvante y/o vehículo depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación, la eficacia del adyuvante para las especies que se vacunan y, en humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido aprobado o es apto para administración humana por los organismos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para la administración humana. Se prefieren alum, MPL y QS-21. Opcionalmente, se pueden usar dos o más adyuvantes diferentes simultáneamente. Las combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21, MPL o RC-529 con GM-CSF, y alumbre, QS-21 y MPL juntas. Además, se puede usar el adyuvante incompleto de Freund (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS-21 y MPL y todas sus combinaciones.

[0192] Los agentes a menudo se administran como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Ver Remington's *Pharmaceutical Science* (15ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). Por lo tanto, cualquier agente (por ejemplo, fragmento de alfa-sinucleína o anticuerpo que se une específicamente a alfa-sinucleína) puede usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad sinucleinopática. La forma preferida depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración en animales o humanos. El diluyente se selecciona para que no afecte la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

[0193] Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como sefarsa funcionalizada con látex (TM), agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos ácidos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos (como gotas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes (es decir, adyuvantes).

[0194] Para la administración parenteral, los agentes se pueden administrar como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como aceites de agua, solución salina, glicerol o etanol. Además, en las composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes coadyuvantes, sustancias tamponantes del pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los anticuerpos pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida del ingrediente activo. Una composición ejemplar comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl. Las composiciones para administración parenteral son típicamente sustancialmente estériles, sustancialmente isotónicas y se fabrican bajo condiciones GMP de la FDA o cuerpo similar. Por ejemplo, las composiciones que contienen productos biológicos se esterilizan típicamente mediante esterilización por filtración. Las composiciones pueden formularse para la administración de una sola dosis.

[0195] Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para un efecto adyuvante mejorado, como se explicó anteriormente (véase Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997)). Los agentes pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Las

composiciones pueden formularse en forma de dosificación por unidad (es decir, la formulación contiene una cantidad suficiente del ingrediente activo para una dosis a un paciente).

5 **[0196]** Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen la vía oral, intranasal, y formulaciones pulmonares, supositorios, y aplicaciones transdérmicas.

10 **[0197]** Los supositorios, aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de 0,5% a 10%, preferiblemente 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10%-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25%-70%.

15 **[0198]** La aplicación tópica puede resultar en la liberación transdérmica o intradérmica. La administración tópica se puede facilitar mediante la administración conjunta del agente con toxina del cólera o derivados detoxificados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn et al., Nature 391, 851 (1998)). La coadministración se puede lograr utilizando los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas mediante reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

20 **[0199]** Alternativamente, la administración transdérmica se puede lograr usando un recorrido de la piel o utilizando transferosomas (Paul et al., Eur. J. Immunol. 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15 (1998)).

25 VIII. MÉTODOS DE MONITOREO Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

[0200] La descripción proporciona métodos para detectar una respuesta inmune contra el péptido alfa-SN y/o el péptido A β en un paciente que sufre de o es susceptible a un ECL. Los métodos son particularmente útiles para controlar un curso de tratamiento que se administra a un paciente. Los métodos se pueden utilizar para controlar tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. Los métodos son útiles para controlar tanto la inmunización activa (p. ej., anticuerpo producido en respuesta a la administración de inmunógeno) y la inmunización pasiva (p. ej., medir el nivel de anticuerpo administrado).

35 1. Inmunización activa

[0201] Algunos métodos implican la determinación de un valor de línea de base de una respuesta inmune en un paciente antes de administrar una dosificación de agente, y comparar este con un valor para la respuesta inmune después del tratamiento. Un aumento significativo (es decir, mayor que el margen típico de error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales mediciones) en el valor de la respuesta inmunitaria señala un resultado de tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha logrado o aumentado una respuesta inmune). Si el valor de la respuesta inmune no cambia significativamente, o disminuye, se indica un resultado de tratamiento negativo. En general, se espera que los pacientes que se someten a un tratamiento inicial con un agente inmunogénico muestren un aumento en la respuesta inmune con dosis sucesivas, que eventualmente alcanzan una meseta. La administración del agente generalmente se continúa mientras la respuesta inmune está aumentando. El logro de la meseta es un indicador de que la administración del tratamiento puede interrumpirse o reducirse en dosis o frecuencia.

50 **[0202]** En otros procedimientos, un valor control (es decir, una desviación media y estándar) de la respuesta inmune se determina para una población objeto de control. Típicamente, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos de la respuesta inmune en un paciente después de administrar un agente terapéutico se comparan con el valor de control. Un aumento significativo con respecto al valor control (p. ej., mayor que una desviación estándar de la media) señala un resultado positivo del tratamiento. La falta de un aumento significativo o una disminución indica un resultado negativo del tratamiento. La administración del agente generalmente se continúa mientras la respuesta inmune aumenta en relación con el valor de control. Como antes, el logro de una meseta relativa a los valores de control en un indicador de que la administración del tratamiento puede interrumpirse o reducirse en dosis o frecuencia.

60 **[0203]** En otros procedimientos, un valor de control de la respuesta inmune (p. ej., una media y desviación estándar) se determina a partir de una población de control de individuos que han experimentado tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas inmunes han alcanzado una meseta en respuesta al tratamiento. Los valores medidos de la respuesta inmune en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (p. ej., más de una desviación estándar) del valor de control, el tratamiento puede interrumpirse. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor de control, se justifica la administración continua del agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control, entonces se puede indicar un cambio en el régimen de tratamiento, por ejemplo, el uso de un adyuvante diferente.

65

[0204] En otros métodos, un paciente que no está recibiendo tratamiento actualmente pero que se ha sometido a un curso previo de tratamiento es monitoreado para determinar la respuesta inmune para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de la respuesta inmune en el paciente puede compararse con un valor de la respuesta inmune previamente lograda en el paciente después de un curso previo de tratamiento. Una disminución significativa con respecto a la medición anterior (es decir, mayor que un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que el tratamiento puede reanudarse. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de someterse a un curso de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que permanecen libres de síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran una mejora de las características de la enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa relativa al nivel de control (es decir, más de una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en un paciente.

[0205] La muestra de tejido para análisis es típicamente sangre, plasma, suero, mucosa o líquido cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza para detectar una respuesta inmune a cualquier forma de alfa-SN, típicamente NAC o A β . La respuesta inmune se puede determinar a partir de la presencia de, p. ej., anticuerpos o células T que se unen específicamente a alfa-SN o AB. Los métodos ELISA para detectar anticuerpos específicos para alfa-SN se describen en la sección de ejemplos. Los métodos para detectar células T reactivas se han descrito anteriormente (véase, definiciones). En algunos métodos, la respuesta inmune se determina mediante un ensayo de limpieza, como se describe en la Sección III anterior. En tales métodos, una muestra de tejido o de sangre de un paciente que está siendo sometida a ensayo se pone en contacto con lbs (p. ej., desde un ratón transgénico de sinucleína/hAPP) y células fagocíticas que llevan receptores Fc. Posteriormente se supervisa la compensación de los LB. La existencia y el alcance de la respuesta de eliminación proporcionan una indicación de la existencia y el nivel de anticuerpos efectivos para eliminar el alfa-SN en la muestra de tejido del paciente sometido a prueba.

2. Inmunización pasiva

[0206] En general, los procedimientos para monitorizar la inmunización pasiva son similares a aquellos para monitorear la inmunización activa descritos anteriormente. Sin embargo, el perfil de anticuerpos después de la inmunización pasiva típicamente muestra un pico inmediato en la concentración de anticuerpos seguido de un decaimiento exponencial. Sin una dosis adicional, la descomposición se aproxima a los niveles de pretratamiento en un período de días a meses, dependiendo de la vida media del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la vida media de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

[0207] En algunos métodos, se realiza una medición de referencia del anticuerpo a alfa-SN en el paciente antes de la administración, se realiza una segunda medición poco después para determinar el nivel máximo de anticuerpos, y se realizan una o más mediciones adicionales a intervalos para controlar la descomposición de los niveles de anticuerpos. Cuando el nivel de anticuerpo se ha reducido al valor basal o un porcentaje predeterminado del pico menos la línea de base (p. ej., 50%, 25% o 10%), se administra la administración de una dosificación adicional de anticuerpo. En algunos métodos, los niveles máximos o subsiguientes medidos menos los antecedentes se comparan con los niveles de referencia previamente determinados para constituir un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico beneficioso en otros pacientes. Si el nivel de anticuerpos medido es significativamente menor que un nivel de referencia (p. ej., menor que la media menos una desviación estándar del valor de referencia en la población de pacientes que se benefician del tratamiento), se indica la administración de una dosis adicional de anticuerpo.

3. Kits de diagnóstico

[0208] La descripción proporciona además kits de diagnóstico para realizar los métodos de diagnóstico descritos anteriormente. Típicamente, tales kits contienen un agente que se une específicamente a los anticuerpos contra el alfa-SN. El kit también puede incluir una etiqueta. Para la detección de anticuerpos contra el alfa-SN, la etiqueta suele estar en forma de anticuerpos antiidiotípicos marcados. Para la detección de anticuerpos, el agente puede suministrarse preenzimado a una fase sólida, como a los pocillos de una placa de microtitulación. Los kits también suelen contener etiquetas que proporcionan instrucciones para el uso del kit. El etiquetado también puede incluir un cuadro u otro régimen de correspondencia que correlaciona los niveles del marcador medido con los niveles de anticuerpos contra alfa-SN. El término etiquetado se refiere a cualquier material escrito o grabado que se adjunta o acompaña a un kit en cualquier momento durante su fabricación, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término etiquetado abarca folletos publicitarios y folletos, materiales de embalaje, instrucciones, casetes de audio o video, discos de computadora, así como la escritura impresa directamente en los kits.

[0209] La descripción también proporciona kits de diagnóstico para la realización de imágenes *in vivo*. Dichos kits típicamente contienen un anticuerpo que se une a un epítipo de alfa-SN, preferiblemente dentro de NAC. Preferiblemente, el anticuerpo está marcado o se incluye un reactivo de marcaje secundario en el kit. Preferiblemente, el kit está etiquetado con instrucciones para realizar un ensayo de imágenes *in vivo*.

X. IMAGEN IN VIVO

[0210] La descripción proporciona métodos de LB de formación de imágenes *in vivo* en un paciente. Dichos métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de EP, u otra enfermedad asociada con la presencia de LB en el cerebro, o su susceptibilidad. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar en un paciente con síntomas de demencia. Si el paciente tiene LB, es probable que el paciente sufra, *p. ej.* EP. Los métodos también se pueden utilizar en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos anormales de amiloide indica susceptibilidad a futuras enfermedades sintomáticas. Los métodos también son útiles para monitorear la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes a los que se les ha diagnosticado previamente la enfermedad de Parkinson.

[0211] El método de trabajo mediante la administración de un reactivo, tal como un anticuerpo que se une a la alfa-SN en el paciente y después detectando el agente después de que se ha unido. Los anticuerpos preferidos se unen a los depósitos de alfa-SN en un paciente sin unirse al polipéptido NACP de longitud completa. Los anticuerpos que se unen a un epítipo de alfa-SN dentro de NAC son particularmente preferidos. Si se desea, la respuesta de eliminación se puede evitar utilizando fragmentos de anticuerpos que carezcan de una región constante de longitud completa, como los Fabs. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir como reactivo de tratamiento y diagnóstico. En general, los anticuerpos que se unen a los epítipos N-terminal de alfa-SN no muestran una señal tan fuerte como los anticuerpos que se unen a los epítipos C-terminal, probablemente porque los epítipos N-terminales son inaccesibles en los LB (Spillantini et al PNAS, 1998). Por consiguiente, tales anticuerpos son menos preferidos.

[0212] Reactivos de diagnóstico pueden administrarse por inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro por inyección intracraneal o taladrando un agujero a través del cráneo. La dosis de reactivo debe estar dentro de los mismos rangos que para los métodos de tratamiento. Típicamente, el reactivo está marcado, aunque en algunos métodos, el reactivo primario con afinidad por el alfa-SN no está marcado y se usa un agente de marcaje secundario para unirse al reactivo primario. La elección de la etiqueta depende de los medios de detección. Por ejemplo, una etiqueta fluorescente es adecuada para la detección óptica. El uso de etiquetas paramagnéticas es adecuado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Las etiquetas radiactivas también pueden detectarse utilizando PET o SPECT.

[0213] El diagnóstico se realiza comparando el número, el tamaño y/o la intensidad de los loci marcados con los valores de línea de base correspondientes. Los valores de la línea base pueden representar los niveles medios en una población de individuos no enfermos. Los valores de línea base también pueden representar niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de línea de base pueden determinarse en un paciente antes de comenzar el tratamiento, y los valores de medición a partir de entonces pueden compararse con los valores de línea de base. Una disminución en los valores en relación con la línea de base señala una respuesta positiva al tratamiento.

EJEMPLOS

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

[0214] La alfa-SN humana recombinante de longitud completa se resuspendió a una concentración de 1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato IX (PBS). Para cada inyección, se utilizaron 50 μ l de alfa-SN; dando una concentración final de 50 μ g por inyección a la que se agregaron 150 μ l de 1X PBS. El adyuvante completo de Freund (CFA) luego se añadió 1:1 a cualquiera de alfa-SN o PBS solo (control), se agitó y sonicó para resuspender completamente la emulsión. Para las inyecciones iniciales, ocho ratones transgénicos (4-7 meses) transgénicos (tg) humanos de la línea D (Masliah, et al. Science 287:1265-1269 (2000) recibieron inyecciones de alfa-SN humano en CFA y, como control, cuatro ratones tg alfa-SN humanos de la línea D recibieron inyecciones de PBS en CFA. Los ratones recibieron un total de 6 inyecciones. Tres inyecciones se realizaron a intervalos de dos semanas y luego 3 inyecciones a intervalos de un mes. Los animales se sacrificaron utilizando las Directrices NIH para el tratamiento humanitario de animales 5 meses después del inicio del experimento. Después de recolectar muestras de sangre para determinar los títulos de anticuerpos, los cerebros se fijaron por inmersión durante 4 días en paraformaldehído al 4% en PBS. Niveles de anticuerpos contra el alfa-SN humano por ELISA se muestran en la Tabla 1. Los ratones tratados se dividen en dos grupos por título. El primer grupo desarrolló un título moderado de 2 a 8.000. El segundo grupo desarrolló un título alto de 12.000 a 30.000. No se encontró título en los ratones de control. El análisis neuropatológico demostró que los ratones que producían títulos altos tenían una disminución marcada en el tamaño de las inclusiones de sinucleína. Los ratones que producían títulos moderados mostraron una disminución menor. La Fig. 2 (paneles y anuncios) muestra inclusiones de sinucleína en (a) un ratón no transgénico, (b) un ratón transgénico tratado solo con CFA, (c) un ratón transgénico inmunizado con alfa-sinucleína y CFA que desarrolló un título moderado y (d) un ratón transgénico inmunizado con alfa-sinucleína y CFA que desarrolló un título más alto. Las muestras se visualizaron mediante inmunotinción con un anticuerpo anti-humano alfa-SN. La Fig. 2 muestra las inclusiones de sinucleína en el panel (b) pero no en el panel (a). En el panel (c), ratón tratado, títulos moderados, las inclusiones tienen una intensidad algo reducida. En el panel (d) las inclusiones se reducen notablemente en intensidad. Los paneles (e)-(h) muestran niveles de anti-IgG en los cerebros, los mismos cuatro ratones que los

paneles (a) a (d) respectivamente. Se puede observar que la IgG está presente en los paneles (g) y, en mayor medida, en el panel (h). Los datos muestran que los anticuerpos administrados periféricamente contra el alfa-SN atraviesan la barrera hematoencefálica y llegan al cerebro. Los paneles (i) a (l) muestran la tinción para GAP, un marcador de células astrogliales, nuevamente para los mismos cuatro ratones que en las dos primeras filas de la figura. Se puede ver que los paneles (k) y (l) muestran una tinción moderadamente aumentada en comparación con (i) y (j). Estos datos muestran que la eliminación de los depósitos de sinucleína se acompaña de una reacción astrogliar y microglial leve.

Tabla 1

Grupo	Genotipo	n =	Edad en el Sac	Tratamiento/Longitud	Titulos	Syn (+) inclusiones/mm2
I	Syn Tg	4	10-13 meses	a-syn + CFA 50ug/inj para 3mo sac'd 3mo más tarde	2.000 - 8,000	15-29
II	Syn Tg	4	10-13 meses	a-syn + CFA 50ug/inj para 3mo sac'd 3mo más tarde	12.000 - 30,000	10-22
III	Syn Tg	4	10-13 meses	PBS + CFA para 3mo sac'd 3mo después	0	18-29

Ejemplo II. Cribado *in vitro* para inclusiones de sinucleína que eliminan anticuerpos

[0215] Se transfectaron células neuronales GT1-7 (Hsue et al. Am. J. Pathol. 157: 401-410 (2000)) con un vector de expresión pCR3.1-T (Invitrogen, Carlsbad, CA) que expresa alfa-SN murino y en comparación con las células transfectadas con el vector de expresión solo (Fig. 3, paneles B y A respectivamente). Las células transfectadas con el vector solo (panel A) tienen un aspecto fibroblástico, mientras que las células transfectadas con alfa-SN están redondeadas, con cuerpos de inclusión en la superficie celular visibles a través de la luz y la microscopía de barrido confocal. Las células transfectadas luego se trataron con suero preinmune de conejo (panel C) o 67-10, un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad contra los residuos 131-140 de la alfa-SN murina terminal C (Iwai, et al., Neuron 14: 467 (1995) (panel D). Se puede observar que los cuerpos de inclusión se tiñen con menos fuerza en el panel D que en el panel C, lo que indica que el anticuerpo contra la alfa-sinucleína fue eficaz para eliminar o prevenir el desarrollo de inclusiones. La Fig. 4 muestra un análisis de gel de partículas y las fracciones citosólicas de células transfectadas con GT1-7 tratadas con el suero preinmune de conejo y el anticuerpo policlonal 67 a 10. Se puede observar que los niveles de sinucleína en la fracción citosólica se mantienen prácticamente sin cambios mediante el tratamiento con suero o anticuerpo preinmune contra alfa-SN. La banda alfa-SN desaparece en la fracción de membrana de las células GT1-7 tratadas con anticuerpo contra alfa-SN. Estos datos indican que la actividad del anticuerpo alfa-sinucleína da como resultado la eliminación de la sinucleína asociada con la membrana celular.

[0216] Las células GT1-7 transfectadas se pueden usar para detectar la actividad de los anticuerpos en la eliminación de las inyecciones de sinucleína con detección ya sea mediante análisis inmunohistoquímico, microscopía óptica como en la Fig. 3 o mediante análisis de gel como en la Fig. 4.

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

i. Inmunización de ratones tg de alfa-sinucleína humana

[0217] Para este estudio, se utilizan ratones transgénicos (tg) de alfa-SN humano heterocigótico (Línea D) (Masliah et al, 2000, Science 286:1265-1269) y los controles no transgénicos (sin tg). Los animales experimentales se dividen en 3 grupos. Para el grupo I, se ensayan los efectos preventivos de la inmunización temprana con ratones que se inmunizan durante 8 meses a partir de los 2 meses de edad. Para el grupo II, los ratones adultos jóvenes se vacunan durante 8 meses a partir de los 6 meses para determinar si la inmunización puede reducir la progresión de la enfermedad una vez que se haya establecido una patología moderada. Para el grupo III, los ratones más viejos se inmunizan durante 4 meses a partir de los 12 meses para determinar si la inmunización puede reducir la gravedad de los síntomas una vez que se ha establecido una patología sólida. Para todos los grupos, los ratones se inmunizan con alfa-SN humano más recombinante más CFA o CFA solo, y para cada experimento se usan ratones de 20 tg y 10 sin tg. De ellos, 10 tg de ratones se inmunizan con alfa-SN + CFA humano y otros 10 tg con CFA solo. De manera similar, se inmunizan 5 ratones que no son ratones con alfa-SN + CFA humano y los otros 5 con CFA solo. En resumen, el protocolo de inmunización consiste en una inyección inicial con alfa-SN humano recombinante purificado (2 mg/ml) en CFA, seguido de una reinyección 1 mes después con alfa-SN humano en combinación con IFA. Los ratones se reinyectan con esta mezcla una vez al mes. En un pequeño subconjunto de ratones alfa-SN humanos tg (n = 3/cada; 6 meses de edad) y no tg (n = 3/cada; 6 meses de edad), experimentos adicionales que

consisten de la inmunización con alfa-SN murino (m), sinucleína beta humana o mutante (A53T). Se realiza alfa-SN humana.

5 **[0218]** Los niveles de anticuerpo alfa-SN se determinan utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con 0,4 µg por pocillo de alfa-SN de longitud completa purificada mediante incubación durante la noche a 4°C en tampón de carbonato de sodio, pH 9,6. Los pocillos se lavan 4X con 200 µl cada PBS que contiene 0,1% de Tween y se bloquean durante 1 hora en PBS-1% BSA a 37°C. Las muestras de suero se diluyen en serie "en el pozo", 1:3, comenzando en la fila A, y van desde una dilución de 1:150 a 1:328.050. Para los experimentos de control, se ejecuta una muestra de anticuerpo monoclonal de ratón contra alfa-SN, sin proteína y espacios en blanco de solo tampón. Las muestras se incuban durante la noche a 4°C, seguido de una incubación de 2 horas con anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina IgG anti-ratón de cabra (1:7500, Promega, Madison, WI). Luego se agrega el sustrato fluorescente de fosfatasa alcalina Atto-phos® durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lee a una longitud de onda de excitación de 450 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. Los resultados se representan en una gráfica semi-logarítmica con unidades de fluorescencia relativa en la ordenada y dilución del suero en la abscisa. El título de anticuerpos se define como la dilución a la que se produjo una reducción del 50% de la unión máxima de anticuerpos.

20 **[0219]** Para cada grupo, al final del tratamiento, los ratones se someten a una evaluación motora en el rotarod, como se describe (Masliah, *et al.* (2000)). Después del análisis, los ratones se someten a eutanasia y se extraen los cerebros para un análisis neuroquímico y neuropatológico detallado como se describe a continuación. Brevemente, el hemibraccio derecho se congela y homogeneiza para determinaciones de inmunoreactividad alfa-SN humana agregada y no agregada por transferencia Western (Masliah, *et al.* (2000)). El hemibraccio izquierdo se fija en paraformaldehído al 4%, se secciona en serie en el vibratome para inmunocitoquímica y análisis ultraestructural.

25 ii. Análisis inmunocitoquímicos y neuropatológicos.

30 **[0220]** Con el fin de determinar si la inmunización disminuye, las secciones de agregación de alfa-SN humanos están inmunoteñidos con un anticuerpo policlonal de conejo contra alfa-SN humano (1:500). Después de una incubación durante la noche a 4°C, las secciones se incuban con un anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo seguido de complejo de peroxidasa de rábano picante de Avidina D (HRP) (1:200, A-B-C Elite, Vector). Las secciones también están inmunocontenidas con anticuerpos anti-conejo, ratón o humanos biotinilados solos. Los experimentos con el secundario anti-ratón determinan si los anticuerpos contra el alfa-SN humano se cruzan en el cerebro. La reacción se visualizó con 0,1% 3,3,-diaminobenzidine tetraclorhidrato (DAB) en 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) con 0,001% de H₂O₂ y secciones están entonces montadas en deslizado bajo Entellan. Los niveles de inmunoreactividad se evalúan semicuantitativamente mediante densitometría óptica utilizando Quantimet 570C. Estas secciones también se estudian mediante análisis de imagen para determinar el número de inclusiones inmunoractivas alfa-SN y esta medida confiable de agregación alfa-SN actúa como un índice valioso de los efectos antiagregación de la vacunación (Masliah, *et al.* (2000)).

40 **[0221]** El análisis de los patrones de neurodegeneración se logra mediante el análisis de densidades sinápticas y dendríticas en el hipocampo, la corteza frontal, la corteza temporal y los ganglios basales, utilizando secciones de vibratome doble inmunotiquetadas para la sinaptofisina y la proteína asociada al microtúbulo 2 (MAP2) y visualizadas con LSCM. Se logra un análisis adicional de la neurodegeneración determinando la inmunoreactividad de la hidroxilasa de tirosina (TH) en el caudoputamen y la sustancia negra (SN) como se describió anteriormente (Masliah, *et al.* (2000)). Se tomarán imágenes de las secciones con el LSCM y cada imagen individual tiene un umbral interactivo de tal manera que se incluyen los terminales inmunoreactivos TH que muestran la intensidad de píxeles dentro de un rango lineal. Se establece una escala para determinar la proporción de píxeles a µm. A continuación, esta información se utiliza para calcular el % de área del neuropil cubierto por los terminales inmunoractivos TH. Estas mismas secciones también se utilizan para evaluar el número de neuronas TH en el SN.

50 **[0222]** Para evaluar los patrones de respuesta inmune a la inmunización, se realizan análisis inmunocitoquímicos y ultraestructurales con anticuerpos contra GFAP humano, MCH clase II, Mac 1, TNF-alfa, IL1beta e IL6 en las secciones cerebrales de ratones no tg y alfa-SN tg inmunizados con inmunógenos alfa-SN recombinante y de control.

55 iii. Análisis del comportamiento.

60 **[0223]** Para la actividad locomotora, los ratones se analizan durante 2 días en los instrumentos rotarod (San Diego, San Diego, CA), como se describió anteriormente (Masliah, *et al.* (2000)). El primer día, los ratones se entrenan para 5 pruebas: la primera a 10 rpm, la segunda a 20 rpm y la tercera a quinta a 40 rpm. En el segundo día, los ratones se ensayaron en 7 ensayos a 40 rpm cada uno. Los ratones se colocan individualmente en el cilindro y la velocidad de rotación aumenta de 0 a 40 rpm durante un período de 240 segundos. La cantidad de tiempo que los ratones permanecen en la barra (latencia de caída) se registra y se usa como una medida de la función motora.

65 Ejemplo IV. Inmunización con fragmentos de alfa-sinucleína

[0224] Ratones transgénicos alfa-SN humanos de 10-13 meses de edad se inmunizan con 9 regiones diferentes de alfa-SN para determinar qué epítomos transmiten la respuesta eficaz. Los 9 inmunógenos diferentes y un control se inyectan ip como se describe anteriormente. Los inmunógenos incluyen cuatro conjugados peptídicos alfa-SN humanos, todos acoplados a IgG anti-ratón de oveja a través de un enlace de cistina. Alfa-SN y PBS se utilizan como controles positivos y negativos, respectivamente. Los títulos se monitorean como se indica arriba y los ratones se someten a eutanasia al final de los 3 a 12 meses de inyecciones. La histoquímica, los niveles de alfa-SN y el análisis de toxicología se determinan post mortem.

i. Preparación de inmunógenos

[0225] Preparación de péptidos alfa-SN acoplados: conjugados peptídicos H alfa-SN se preparan mediante el acoplamiento a través de una cisteína artificial añadido al péptido alfa-SN usando el reactivo de reticulación sulfo-EMCS. Los derivados peptídicos alfa-SN se sintetizan con las siguientes secuencias finales de aminoácidos. En cada caso, la ubicación del residuo de cisteína insertada se indica con un subrayado.

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

NH₂-KEQVTNVCGGAVVT-COOH (SEQ ID NO: 54)

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

NH₂-GVTAVAQKTVECG-COOH (SEQ ID NO: 55)

péptido alfa-sinucleína 102-112:

ácido NH₂-C-amino-heptanoico- KNEEGAPCQEG-COOH (SEQ ID NO: 56) péptido alfa-sinucleína 128-140:

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

[0226] Para preparar la reacción de acoplamiento, diez mg de IgG anti-ratón de oveja (Jackson ImmunoResearch Laboratories) se dializaron durante la noche frente a tampón de borato de sodio 10 mM, pH 8,5. El anticuerpo dializado se concentra luego a un volumen de 2 mL utilizando un tubo Amicon Centriprep. Se disuelven diez mg de sulfo-EMCS [N (ε-maleimidocuproiloxi) succinimida] (Molecular Sciences Co.) en un ml de agua desionizada. Se agrega gota a gota un exceso molar de 40 veces de sulfo-EMCS con agitación a la IgG anti-ratón de oveja y luego se agita la solución durante diez minutos adicionales. La IgG anti-ratón de oveja activada se purifica y el tampón se intercambia al pasar sobre una columna de filtración en gel de 10 ml (Columna Pierce Presto, obtenida de Pierce Chemicals) equilibrada con NaPO₄ 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpos, identificadas por absorbancia a 280 nm, se agrupan y se diluyen a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, utilizando 1,4 mg por OD como coeficiente de extinción. Un exceso molar de 40 veces del péptido alfa-SN se disuelve en 20 ml de NaPO₄ 10 mM, pH 8,0, con la excepción del péptido alfa-SN para el cual 10 mg se disuelven primero en 0,5 ml de DMSO y luego se diluyen a 20 mL con el tampón NaPO₄ 10 mM. Cada una de las soluciones peptídicas se agrega a 10 ml de IgG anti-ratón de oveja activada y se agita a temperatura ambiente durante 4 h. Los conjugados resultantes se concentran hasta un volumen final de menos de 10 ml utilizando un tubo Amicon Centriprep y luego se dializan contra PBS para intercambiar el tampón y eliminar el péptido libre. Los conjugados se pasan a través de filtros de tamaño de poro de 0,22 μm para la esterilización y luego se dividen en alícuotas en fracciones de 1 mg y se almacenan congelados a -20°C. Las concentraciones de los conjugados se determinan utilizando el ensayo de proteínas BCA (Pierce Chemicals) con IgG de caballo para la curva estándar. La conjugación se documenta por el aumento de peso molecular de los péptidos conjugados en relación con el de la IgG de oveja anti-ratón activada.

Ejemplo V. Inmunización pasiva con anticuerpos a alfa-sinucleína

[0227] Ratones alfa-SN humanos cada uno se inyectaron con 0,5 mg en PBS de anticuerpos monoclonales anti-alfa-SN, como se muestra a continuación. Todas las preparaciones de anticuerpos se purifican para tener niveles bajos de endotoxinas. Los monoclonales se pueden preparar contra un fragmento inyectando el fragmento o una forma más larga de alfa-SN en un ratón, preparando hibridomas y seleccionando los hibridomas para el anticuerpo que se une específicamente a un fragmento deseado de alfa-SN sin unirse a otros fragmentos no superpuestos de alfa-SN.

[0228] Los ratones se inyectan ip según sea necesario durante un período de 4 meses para mantener una concentración de anticuerpo circulante medida por un título de ELISA superior a 1:1000 definido por ELISA a alfa-SN u otro inmunógeno. Los títulos se controlan como se indica arriba y los ratones se someten a eutanasia al final de los 6 meses de inyecciones. La histoquímica, los niveles de alfa-SN y la toxicología se realizan post mortem.

Ejemplo VI. Inmunización Aβ de ratones transgénicos Syn/APP

[0229] Este experimento compara los efectos de la inmunización Aβ en tres tipos de ratones transgénicos: ratones transgénicos con un transgén de alfa-sinucleína (SYN), ratones APP con un transgén de APP (Games *et al.*) y ratones SYN/APP doble transgénicos producidos por el cruce de un solo transgénico. Los ratones doble transgénicos se describen en Masliah *et al.*, PNAS EE.UU. 98:12245-12250 (2001). Estos ratones representan un modelo de individuos con enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. La Tabla 2 muestra los diferentes grupos, la edad de los ratones utilizados en el estudio, el procedimiento de tratamiento y el título de anticuerpos a Aβ. Se puede ver que se generó un título significativo en los tres tipos de ratones. La Fig. 5 muestra el % de área cubierta

por las placas amiloides de A β en el cerebro determinada por el examen de las secciones del cerebro de los sujetos tratados mediante microscopía. Se acumulan depósitos sustanciales en los ratones APP y SYN/APP pero no en los ratones SYN o controles no transgénicos. Los depósitos son mayores en los ratones doble transgénicos SYN/APP. La inmunización con A β 1-42 reduce los depósitos en los ratones APP y SYN/APP. La Fig. 6 muestra los depósitos de síntesis en los diversos grupos de ratones detectados mediante escaneo láser confocal y microscopía óptica. Los depósitos de sinucleína se acumulan en los ratones SYN y SYN/APP tratados con CFA solamente. Sin embargo, en los mismos tipos de ratones tratados con A β 1-42 y CFA hay una marcada reducción en el nivel de depósito de sinucleína. Estos datos indican que el tratamiento con A β es eficaz no solo para eliminar los depósitos de A β sino también para eliminar los depósitos de sinucleína. Por lo tanto, el tratamiento con A β o sus anticuerpos es útil para tratar no solo la enfermedad de Alzheimer sino también la enfermedad combinada de Alzheimer y Parkinson y la enfermedad de Parkinson en pacientes sin enfermedad de Alzheimer. El título de anticuerpos antiA β en ratones SYN/APP se correlacionó con una menor formación de inclusiones de sinucleína ($r = -0,71$, $p < 0,01$).

Tabla 2

Grupo	n =	Años	Tratamiento/Longitud	Títulos Ab
SYN	4	12-20 meses	Ab iny. 50ug/inj por 6mo	10.000-58.000
SYN	2	12-20 meses	Sal iny. por 6mo	0
APP	2	12-20 meses	Ab iny. 50ug/inj por 6mo	25.000
APP	2	12-20 meses	Sal iny. por 6mo	0
SYN/APP	4	12-20 meses	Ab iny. 50ug/inj por 6mo	1.000-50.000
SYN/APP	2	12-20 meses	Sal iny. por 6mo	0

Ejemplo VII. Ensayo de detección *ex vivo* de la actividad de un anticuerpo contra depósitos de amiloide

[0230] Para examinar el efecto de los anticuerpos en el despeje de la placa, establecimos un ensayo *ex vivo* en el que se cultivaron células microgliales primarias con secciones de criostato no fijadas de cerebros de ratones con ADAPP o humanos con EA. Se obtuvieron células microgliales de las cortezas cerebrales de ratones DBA/2N neonatos (1-3 días). Las cortezas se disociaron mecánicamente en HBSS⁻ (Hanks' Balanced Salt Solution, Sigma) con 50 μ g/mL de DNasa I (Sigma). Las células disociadas se filtraron con un filtro de células de 100 μ M (Falcon) y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en medio de crecimiento (DMEM alto en glucosa, FBS al 10%, 25 ng/ μ l de rmGM-CSF) y las células se colocaron en placas a una densidad de 2 cerebros por matraz de cultivo de plástico T-75. Después de 7-9 días, los matraces se rotaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 2 horas a 37°C. La suspensión celular se centrifugó a 1.000 rpm y se resuspendió en el medio de ensayo.

[0231] Se descongelaron secciones de criostato de 10 μ m de cerebro de ratón PDAPP o humano EA (intervalo post mortem <3 h) sobre portaobjetos de vidrio redondos recubiertos con poli-lisina y se colocaron en pocillos de placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos. Los portaobjetos se lavaron dos veces con medio de ensayo que consistía en H-SFM (medio libre de hibridoma sérico, Gibco BRL) con FBS al 1%, glutamina, penicilina/estreptomicina y 5 ng/ μ l de rmGM-CSF (I+D). Se agregaron anticuerpos de control o anti-AB a una concentración 2x (5 μ g/mL final) durante 1 hora. Las células microgliales se sembraron a una densidad de $0,8 \times 10^6$ células/ml de medio de ensayo. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora humidificada (37°C, 5% de CO₂) durante 24 horas o más. Al final de la incubación, los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Triton-X100 al 0,1%. Las secciones se tiñeron con 3D6 biotinilado seguido de un conjugado de estreptavidina/Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Las células microgliales exógenas se visualizaron mediante una tinción nuclear (DAPI). Los cultivos se observaron con un microscopio fluorescente invertido (Nikon, TE300) y las fotomicrografías se tomaron con una cámara digital SPOT utilizando el software SPOT (instrumentos digitales). Para el análisis de transferencia Western, los cultivos se extrajeron en urea 8M, se diluyeron 1:1 en tampón de muestra de tricina reductor y se cargaron en un gel de tricina al 16% (Novex). Después de la transferencia a inmobilon, las transferencias se expusieron a 5 μ g/mL de pabA β 42 seguido de un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP, y se desarrolló con ECL (Amersham).

[0232] Cuando el ensayo se realizó con secciones de cerebro PDAPP en presencia de un anticuerpo contra NAC, se observó una reducción marcada de en el número y tamaño de placas indicativas de la actividad de eliminación del anticuerpo. Un anticuerpo para NAC se puso en contacto con una muestra de tejido cerebral que contenía placas amiloides y células microgliales, como se discutió anteriormente. Se usó suero de conejo como control.

[0233] El mismo ensayo se realizó con secciones de cerebro PDAPP en presencia de varios anticuerpos contra A β . Se comparó la capacidad de los anticuerpos para inducir la fagocitosis en el ensayo *ex vivo* y para reducir la carga de placa *in vivo* en estudios de transferencia pasiva. Estos resultados muestran que la eficacia *in vivo* se debe a la eliminación mediada por anticuerpos directos de las placas dentro del SNC, y que el ensayo *ex vivo* predice la eficacia *in vivo*. (consulte las Tablas 16 y 17 del Ejemplo XIV del documento WO 00/72880; y, Ejemplo XIV, Tabla 16, del documento WO 0072876).

Ejemplo VIII: Inmunización activa con alfa-sinucleína

A. Materiales y métodos

- 5
- [0234]** *Vacunación de α -sinucleína tg ratones.* Para este estudio, se utilizaron ratones tg heterocigotos (línea D) que expresan α -sinucleína bajo el control regulador del promotor del factor de crecimiento β derivado de plaquetas (PDGF β) (Maliah, 2000, Science 287:1265-69). Estos animales se seleccionaron para su uso en el desarrollo de inclusiones inmunorreactivas de α -sinucleína en el cerebro, así como déficits neurodegenerativos y motores que imitan ciertos aspectos de la ECL. Los animales experimentales fueron divididos en dos grupos. Para el primer grupo, se inmunizaron un total de 20 ratones tg jóvenes (a los 3 meses) durante 8 meses con α -sinucleína recombinante (n = 10) o adyuvante solo (n = 10). Para el segundo grupo, se inmunizaron un total de 20 ratones Tg adultos jóvenes (6 meses de edad) durante 8 meses con α -sinucleína recombinante (n = 10) o adyuvante solo (n = 10). El Protocolo de inmunización consistió primero de una inyección con α -sinucleína recombinante (80 μ g/ml; 100 μ l) con adyuvante completo de Freund (CFA). Dos semanas más tarde los ratones recibieron otra inyección de α -sinucleína (80 μ g/ml; 100 μ l) con FA incompleta, seguido de reinyección una vez al mes (para los subsiguientes 7 meses) con α -sinucleína (80 μ g/ml; 100 μ l) en solución salina tamponada con fosfato. La α -sinucleína recombinante se preparó y purificó como se describe en Masliah et al., 2005, Neuron 46: 857-68, y se analizó en busca de endotoxinas.
- 10
- 15
- 20
- [0235]** Determinación de títulos de anticuerpos y afinidad relativa a α -sinucleína. Niveles de anticuerpos α -sinucleína en plasma se determinaron utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con 0,4 μ g por pocillo de purificados de longitud completa α -sinucleína. Las muestras se incubaron durante la noche a 4°C, seguido de lavado e incubación con anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina de IgG anti-ratón de cabra (1:7500, Promega, Madison, WI). La placa se leyó a una longitud de onda de excitación de 450 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. Los resultados se representaron en un gráfico semi-logarítmico con unidades de fluorescencia relativa en la ordenada y dilución del suero en la abscisa. El título de anticuerpos se definió como la dilución a la que se produjo una reducción del 50% de la unión máxima de anticuerpos.
- 25
- 30
- [0236]** Para determinar la afinidad relativa para α -sinucleína por los anticuerpos generados en los ratones vacunados, se realizaron dos conjuntos de experimentos. En el primero, se analizaron homogenados de cerebro de ratones tg α -sinucleína no inmunizados en un minigel, aparato multicanal (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada canal se incubó con el suero diluido de cada uno de los ratones, se transfirió a nitrocelulosa y se incubó con un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón seguido de la proteína A marcada con 125 I (Alford et al., J. Histochem. Cytochem 42: 283-287 (1994)). Se tomaron imágenes de las transferencias y se analizaron con el PhosphorImager (Molecular Dynamics, Piscataway, NJ). La banda inmunorreactiva se cuantificó utilizando el software ImageQuant (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Para el segundo conjunto de experimentos, secciones de vibratome en serie de un ratón tg α -sinucleína no inmunizado se incubaron en el suero diluido a partir de cada uno de los ratones tratados seguido de caballo biotinilado anti-IgG de ratón (1:100, Vector), la peroxidasa Avidina D-rábano picante (HRP, 1:200, ABC Elite, Vector), y se hizo reaccionar con tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) que contiene 0,001% de H₂O₂. Después del examen microscópico, las secciones se calificaron según el compartimento celular marcado (cuerpos celulares neuronales, sinapsis e inclusiones) y el grado de inmunorreactividad (0 = ninguno; 1 = muy leve, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = intenso).
- 35
- 40
- 45
- [0237]** *Mapeo de epítomos de anticuerpos α -sinucleína.* Los epítomos reconocidos por los anticuerpos de α -sinucleína se determinaron mediante un ELISA que mide la unión de un anticuerpo a péptidos lineales solapados que cubrían la secuencia completa de α -sinucleína. Se prepararon péptidos biotinilados en el extremo con secuencias de α -sinucleína (Mimotopes, San Diego, CA) como péptidos largos de 15 aminoácidos (aa) con un solapamiento de 12 residuos y una etapa de 3 residuos por péptido. Un total de 43 péptidos se utilizaron para toda la secuencia de 140 aa de α -sinucleína con el último péptido que tiene un solapamiento de 13 aa y una etapa de 2 aa. Además, se repitieron los últimos 3 péptidos, pero la biotinilación se produjo en el extremo N del péptido. Esto se hizo para mejorar el acceso al C-terminal de los péptidos por los anticuerpos y para permitir la identificación de anticuerpos específicos C-terminal libres. Además, se agregaron otras características a este ensayo para permitir un examen más completo de las interacciones entre los anticuerpos y la región del componente β (A β) no amiloide (NAC) (61-95) de α -sinucleína. Dado que el 21^{er} péptido en este ensayo ya contiene el N-terminal libre de la región de NAC, un péptido N-terminal adicional biotinilado que contiene el C-terminal libre de la región de NAC se añadió para completar el ensayo con un total de 47 péptidos
- 50
- 55
- 60
- [0238]** Para realizar el ensayo, estos péptidos biotinilados se recubrieron hacia abajo durante la noche a 5nM en placas de ELISA pre-recubiertas con estreptavidina (Pierce, Rockford, IL). Luego se lavaron las placas y se añadieron muestras de suero diluidas a un título equivalente de 6, para una incubación de 1 hora. Las muestras de suero con títulos inferiores a 5.000 se diluyeron 1:1000 para esta incubación. Después de otra etapa de lavado, los anticuerpos unidos se detectaron utilizando segundos anticuerpos específicos de la especie conjugados con HRP en un formato ELISA colorimétrico.
- 65
- [0239]** *Procesamiento de tejidos.* Los ratones se sacrificaron y se extrajeron los cerebros para un análisis

neuroquímico y neuropatológico detallado como se describe a continuación. Brevemente, el hemiserebro derecho se congeló y homogeneizó para las determinaciones de inmunoreactividad de α -sinucleína agregada y no agregada por transferencia Western (Masliah et al., 2000, supra). El hemiserebro izquierdo se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4% y se seccionó en serie con el vibratome (Leica, Wetzlar, Alemania) para inmunocitoquímica (ICC) y análisis ultraestructural.

[0240] *Preparaciones sinaptosómicas y análisis de inmunotransferencia.* Para determinar los efectos de la vacunación sobre la acumulación de α -sinucleína en el cerebro de ratones tg, las fracciones sinaptosomales se prepararon utilizando gradientes de sacarosa y se analizaron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida con trisacetato al 10% (NuPAGE™, Invitrogen). Las inmunotransferencias se ensayaron con anticuerpos primarios contra α -sinucleína (LB509, 1:1000, Transduction Laboratories, San Diego, CA) y sinaptofisina (1:20, Chemicon, Temecula, CA) y un IgG de cabra secundario marcado con HRP (1:5000, SantaCruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) y se visualiza mediante quimioluminiscencia mejorada y se analiza con un aparato de imágenes Versadoc XL (BioRad, Hercules, CA).

[0241] *Análisis neuropatológico e inmunocitoquímico.* Brevemente, como se describió anteriormente (Masliah et al., 2000), supra, para investigar los efectos de la vacunación en la acumulación de α -sinucleína, secciones de vibratome secadas en serie, flotadas libremente, codificadas a ciegas se incubaron durante la noche a 4°C con un anticuerpo específico de anti- α -sinucleína purificado por afinidad (72-10, policlonal de conejo, 1:500) preparado como se describió previamente (Masliah et al., 2000, supra) mediante la inmunización de conejos con péptidos de α -sinucleína sintéticos que consisten en aa 101-124. La incubación con el anticuerpo primario fue seguida de IgG anti-conejo de cabra biotinilada (1:100, Vector), Avidina D-HRP (1:200, A-B-C Elite, Vector), y se hizo reaccionar con clorhidrato de tetrahidrato de DAB que contenía 0,001% de H₂O₂. Las secciones se analizaron con el Quantimet 570C (Leica) con el fin de determinar el número de inclusiones inmunoreactivas de α -sinucleína en el neocórtex. Para cada caso, se analizaron tres secciones y los resultados se promediaron y expresaron como números por mm cuadrado. Se realizó un análisis inmunocitoquímico adicional mediante inmunoreacciones con anticuerpos contra marcadores gliales, incluidos CD45 (1:1.000, DakoCytomation, Carpinteria, CA) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP, 1:500, Chemicon).

[0242] Se realizó un análisis inmunocitoquímico doble como se describió anteriormente (Hashimoto et al., Neuron 32: 213-223 (2001)) para determinar los efectos de la vacunación en la densidad del terminal nervioso y la acumulación de α -sinucleína en las sinapsis. Para este fin, las secciones de vibratome se marcaron doble con un anticuerpo policlonal contra α -sinucleína (1:1.000) y con el anticuerpo monoclonal contra sinaptofisina (Chemicon). α -Sinucleína se detectó con Tyrami de Red (1:2000, Roche) y sinaptofisina con IgG anti-ratón de caballo marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para cada caso, las secciones se inmunomarcaron por duplicado y se analizaron con el microscopio confocal de barrido láser (LSCM) y el software NIH Image 1.43 para calcular el área porcentual del neuropil cubierto por terminales inmunoreactivos de sinaptofisina en el neocórtex (Mucke et al., J. Neurosci 20: 4050-4058 (2000)) y la proporción de terminales inmunoreactivos a la sinaptofisina que fueron positivos para la α -sinucleína. En la especificidad de los anticuerpos primarios, se realizaron experimentos de control donde las secciones se incubaron durante la noche en ausencia de anticuerpo primario (eliminado), con el anticuerpo primario preadsorbido durante 48 horas con un exceso de 20 veces del péptido correspondiente o con suero preimmune.

[0243] Todas las secciones se procesaron simultáneamente en las mismas condiciones y los experimentos se realizaron dos veces para evaluar la reproducibilidad de los resultados. Se tomaron imágenes de las secciones con un objetivo Zeiss 63X (NA 1.4) en un microscopio Axiovert 35 (Zeiss, Alemania) con un sistema MRC1024 LSCM adjunto (BioRad, Waltham, Reino Unido) (Masliah et al., 2000, supra).

[0244] *Análisis estadístico.* Las comparaciones estadísticas entre los grupos se realizaron utilizando la prueba t de Student no pareada de dos colas. Se realizó un análisis de regresión lineal para determinar la relación entre las variables. La corrección de Bonferroni se aplicó para tener en cuenta las comparaciones múltiples.

B. resultados

Caracterización de títulos de anticuerpos, afinidad y mapeo de epítomos.

[0245] Los títulos de anticuerpos fueron analizados a los 3 puntos de tiempo (2 semanas, 6 meses y 9 meses después de la vacunación) en ambos grupos experimentales. Las titulaciones de anticuerpos variaron considerablemente entre los ratones, en los animales pertenecientes al grupo I, las titulaciones de anticuerpos entre los ratones inmunizados con α -sinucleína oscilaron entre 200 y 20.000 (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los títulos de α -sinucleína y afinidad de inmunotransferencia (corregida por el título).

Grupo	Afinidad de anticuerpos por minitransferencia	Afinidad de anticuerpos a las sinapsis.	Afinidad de anticuerpos a las inclusiones	Títulos de anticuerpos (primer sangrado)	Títulos de anticuerpos (segundo sangrado)	Títulos de anticuerpos (tercer sangrado)
Grupo II \langle -syn	109147 \pm 62700	1,9 \pm 0,73	1,2 \pm 0,4	2332 \pm 500	2772 \pm 1176	3644 \pm 2365
Grupo II CFA	113 \pm 113	0,4 \pm 0,1	0	19 \pm 6,7	30 \pm 12	7 \pm 4
Grupo III \langle -syn	235747 \pm 74000	4,1 \pm 0,9	2,8 \pm 1,0	3813 \pm 1200	2926 \pm 976	1468 \pm 641
Grupo II/CFA	400 \pm 358	0,3 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	23 \pm 9	21 \pm 14	0,6 \pm 0,6

[0246] En este grupo los títulos promedio aumentaron ligeramente con el tiempo. De manera similar, para el grupo II, los animales inmunizados con α -sinucleína mostraron títulos que oscilaron entre 200 y 13.000 (Tabla 3). Sin embargo, los niveles promedio de títulos fueron más altos en la primera determinación y luego disminuyeron con el tiempo. El análisis de inmunotransferencia también mostró una variabilidad significativa de ratón a ratón en su capacidad para reconocer la α -sinucleína. En general, los niveles de afinidad relativa del anticuerpo fueron mayores en los ratones del grupo II en comparación con los ratones inmunizados del grupo I (Tabla 4).

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

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

Por ICC, los sueros de ratones vacunados con α -sinucleína mostraron marcado de neuronas, inclusiones intraneuronales y terminales presinápticos. Por el contrario, los ratones tratados con adyuvante solo mostraron una tinción suave difusa y no específica de los cuerpos celulares). Los sueros de ratones pertenecientes al grupo II mostraron una mayor afinidad en el reconocimiento de la α -sinucleína en las sinapsis y las neuronas en los ratones tg en comparación con los ratones inmunizados del grupo I (Tabla 4).

[0247] Los estudios de mapeo de epítomos mostraron que en ratones vacunados con α -sinucleína, los anticuerpos reconocen con mayor frecuencia epítomos peptídicos dentro de la región C-terminal de α -sinucleína (Figura 8). Además, los anticuerpos para epítomos adicionales también fueron reconocidos ocasionalmente. En contraste, no se detectaron reactivos ni epítomos de anticuerpos con los sueros de ratones tratados con CFA solo.

Inmunización reduce la acumulación de α -sinucleína y preserva la densidad sináptica en el cerebro de ratones tg

[0248] Para determinar los efectos de la inmunoterapia en acumulación α -sinucleína, las secciones se marcaron con anticuerpos contra el α -sinucleína y se analizaron por microscopía de campo brillante o por LSCM. En ratones

tg, se observó inmunorreactividad de α -sinucleína en el neuropil, así como en inclusiones intraneuronales. En comparación con los ratones tg tratados con CFA solo, los ratones de ambos grupos inmunizados mostraron una reducción comparable (aproximadamente un 25%) en el número de inclusiones en la corteza temporal (Figura 9A). Además, la inmunización dio lugar a una disminución de la inmunorreactividad de la α -sinucleína en el neuropil. Cuando se comparó con los ratones tg tratados con CFA solo, este efecto fue mayor en ratones del grupo II que en ratones del grupo I (Figura 9A). Para determinar si los efectos de la inmunización estaban realmente relacionados con la capacidad de los anticuerpos para reducir la acumulación neuronal de α -sinucleína o con los efectos de enmascaramiento, se realizaron experimentos de control comparando los niveles de inmunorreactividad de β -sinucleína entre CFA solo y ratones ta vacunados con α -sinucleína. Consistente con la distribución conocida de β -sinucleína, un homólogo cercano a la α -sinucleína (Iwai et al., Neuron 14: 467-475 (1994)), se observó una inmunoreactividad de β -sinucleína abundante en el neuropil en asociación con terminales presinápticos e inmunomarcaje leve en los cuerpos de las células neuronales, pero no en las inclusiones. Comparado con los ratones tg tratados con CFA solo, no se encontraron diferencias en los patrones y niveles de β -sinucleína en ratones inmunizados con α -sinucleína. Para investigar más la especificidad de los efectos de anticuerpos de α -sinucleína, los niveles de inmunorreactividad murina (m) α sinucleína se compararon entre el CFA solo y ratones tg vacunados con α -sinucleína. Similarmente a la α -sinucleína, la inmunorreactividad de la $m\alpha$ sinucleína fue abundante en el neuropil en asociación con los terminales nerviosos, pero estaba ausente en los cuerpos celulares neuronales y en las inclusiones. Tanto en los ratones inmunizados con CFA como con la α -sinucleína, los patrones y los niveles de $m\alpha$ sinucleína fueron comparables. En conjunto, estos estudios sugieren que la vacunación afecta específicamente a la α -sinucleína, pero no a otras moléculas sinápticas relacionadas.

[0249] Para determinar más a fondo los efectos de la inmunoterapia en la integridad neuropil, las secciones se inmunocentrieron con un anticuerpo contra la sinaptofisina o mediante la microscopía electrónica. En comparación con los ratones no transgénicos (no incluidos), los ratones tg tratados con CFA solo mostraron una disminución promedio del 20% en el número de terminales inmunotiquetados con sinaptofisina, y los niveles de inmunorreactividad de sinaptofisina por sinapsis se mantuvieron sin cambios (Figura 9B). En contraste, los ratones inmunizados de ambos grupos mostraron niveles de inmunorreactividad a la sinaptofisina comparables a los controles no tg (9B). Otros análisis inmunocitoquímicos con anticuerpos contra marcadores gliales como GFAP y CD45 mostraron una tendencia hacia un aumento de la inmunorreactividad en los cerebros de ratones tg vacunados con α -sinucleína (Figura 9C). De acuerdo con estos resultados, el análisis ultraestructural mostró que en los cerebros de ratones tg inmunizados con α -sinucleína, el neuropil estaba bien conservado, con terminales y dendritas presinápticas intactas y las terminales nerviosas contenían vesículas claras abundantes y densidades postsinápticas formadas. Sólo se identificaron agregados ocasionales electrodensos en los procesos neuríticos y, en general, las mitocondrias y la mielina estaban bien conservadas.

[0250] Para caracterizar mejor los efectos de la vacunación sobre la agregación de α -sinucleína en las sinapsis, se realizó un análisis inmunotintocitoquímico doble y transferencia Western con preparaciones sinaptosómicas. En condiciones fisiológicas, la α -sinucleína se localiza principalmente en los boutons presinápticos (Iwai et al., 1994, supra) y en ECL y en los ratones tg, el aumento de la acumulación de α -sinucleína en las sinapsis se asocia con déficits funcionales y la pérdida de sinapsis (Hashimoto et al., 2001, supra). Para determinar los efectos de la vacunación sobre la acumulación de α -sinucleína en los terminales nerviosos, se realizaron estudios de inmunomarcaje doble con anticuerpos contra el marcador presináptico terminal sinaptofisina y el análisis de α -sinucleína y WB con preparaciones sinaptosómicas. La imagen confocal de las secciones doble marcadas mostró que, en comparación con los ratones tg vacunados con α -sinucleína con CFA solo (Figura 9D), los que se inyectaron con α -sinucleína mostraron una acumulación disminuida de α -sinucleína en terminales nerviosos inmunoreactivos por sinaptofisina en la neocórtex (Figura 9D).

[0251] De acuerdo con los estudios inmunocitoquímicos, el análisis de inmunotransferencia mostró que en los ratones tg tratados con CFA solo, había abundantes bandas de peso molecular más alto, posiblemente reflejando la acumulación de inclusiones inmunoreactivas de α -sinucleína en la sinapsis (Figura 10). En los ratones inmunizados hubo una disminución considerable en la acumulación de bandas de peso molecular más alto de α -sinucleína y la banda nativa, pero no se observaron efectos sobre los niveles de $m\alpha$ -sinucleína. Además, en comparación con los ratones tg tratados con CFA solo, los niveles de inmunorreactividad a sinaptofisina fueron mayores en las preparaciones sinaptosomales de ratones inmunizados (Figura 10). Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que la inmunoterapia puede mejorar el daño neuronal en los cerebros de ratones tg al reducir la acumulación de oligómeros de α -sinucleína potencialmente tóxicos en las sinapsis.

Los efectos de la inmunización dependen de la afinidad relativa de los anticuerpos para reconocer los terminales sinápticos

[0252] Para comprender mejor qué factores predicen la efectividad de la inmunoterapia, se realizó un análisis de regresión lineal entre los marcadores neuropatológicos de la acumulación de α -sinucleína y los títulos de anticuerpos y la afinidad. Este análisis mostró una correlación significativa entre la afinidad de anticuerpos relativa por inmunotransferencia y los niveles de inmunorreactividad de α -sinucleína en las sinapsis, pero no con el número de inclusiones neuronales. De manera similar, la afinidad del anticuerpo para reconocer sinapsis por ICC se correlacionó inversamente con los niveles de α -sinucleína en las sinapsis y se correlacionaron directamente con el

porcentaje de área ocupada por las terminales nerviosas marcadas con sinaptofisina, pero no con los números de inclusiones neuronales. Los niveles de reactividad de anticuerpos por inmunotransferencia y ICC se correlacionaron fuertemente con los títulos de anticuerpos según lo determinado por ELISA. Los títulos de anticuerpos también se correlacionaron con el área de porcentaje del neuropil marcado con el anticuerpo anti-hα-sinucleína pero no con el número de inclusiones en las neuronas (Tabla 4). En conjunto, estos resultados sugieren que la reactividad de inmunotransferencia relativa de los anticuerpos α-sinucleína anti-humana y, en cierta medida, los títulos de ELISA de los anticuerpos se correlacionan con la reducción de la acumulación de α-sinucleína humana neuronal.

Los anticuerpos de anti-α-sinucleína humana se internalizan y se unen a las sinapsis y las neuronas que contienen inclusión en ratones tg

[0253] Para determinar si los anticuerpos de tráfico reconocen los sitios neuronales característicos donde la α-sinucleína humana se acumula en los cerebros de los ratones tg, se realizó un análisis inmunocitoquímico simple y doble con anticuerpos IgG anti-ratón de caballo. Estos anticuerpos reconocen supuestamente la α-sinucleína humana generada en los animales inmunizados pero no en los controles de CFA. La microscopía digital de campo brillante de las secciones inmunomarcadas mostró que en ratones inmunizados con hα-sinucleína, la biotina relacionó los cuerpos de células neuronales anti-IgG de ratón etiquetados de forma difusa y los procesos neuríticos en el neuropil. En animales tg tratados con CFA solo hubo un ligero marcaje de los vasos sanguíneos y células ocasionales que se parecen a la microglia. Los experimentos de doble inmunotinción confirmaron que en los ratones vacunados, los cuerpos de células neuronales marcados con una IgG anti-ratón marcada con FITC mostraron inmunoreactividad de hα-sinucleína. En comparación con los ratones tg tratados con CFA solo, en ratones vacunados con hα-sinucleína, en algunas neuronas, la IgG anti-ratón y la inmunoreactividad con hα-sinucleína colocalizaban en la periferia de los cuerpos celulares, en otras áreas se detectaron dos etiquetas en los procesos neuríticos y sinapsis. Además, en varias neuronas que contienen α-sinucleína humana se detectaron los dos marcadores en las estructuras subcelulares granulares con un promedio de tamaño 0,4-0,8 μm de diámetro. Experimentos adicionales de doble marcaje mostraron que estas estructuras granulares mostraban inmunoreactividad a la catepsina D, lo que sugiere que los anticuerpos anti-α-sinucleína internalizados reaccionaban con la sinucleína dentro de los lisosomas. De acuerdo con este hallazgo, el análisis ultraestructural demostró que en algunas de las neuronas de los ratones vacunados con α-sinucleína humana, se identificaron estructuras laminadas electrodensas sugestivas de lisosomas y fagolisosomas. En conjunto, estos resultados sugieren que la vacunación con α-sinucleína humana puede promover la degradación de esta molécula a través de la activación de una vía lisosomal.

EJEMPLO IX. Eliminación de los agregados de α-sinucleína *in vivo* mediante la administración de los anticuerpos de α-sinucleína

[0254] Este ejemplo demuestra el despeje de los agregados de α-sinucleína intraneuronal utilizando anticuerpos monoclonales anti-α-sinucleína que reconocen los extremos de la α-sinucleína. Los anticuerpos monoclonales se inyectaron en el neocórtex de ratones transgénicos que sobreexpresan la α-sinucleína humana y tienen agregados intraneuronales de la α-sinucleína intraneuronal. Los dos anticuerpos, uno dirigido contra el término N y el otro dirigido contra el término C de la α-sinucleína, redujeron el número de agregados de α-sinucleína intraneuronal hasta en un 80% en comparación con los anticuerpos de control irrelevantes (Fig. 11).

[0255] Métodos. Los anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítomos de la molécula de α-sinucleína y los anticuerpos de control coincidentes con el isotipo irrelevantes se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato estéril (Tabla 5) para inyección en ratones. Los animales utilizados fueron de 4 a 8 meses de edad de ratones transgénicos heterocigotos que sobreexpresan α-sinucleína humana salvaje en el cerebro bajo el control transcripcional del promotor PDGF. Se usaron de 4 a 6 ratones transgénicos diferentes para cada uno de los anticuerpos.

Tabla 5, Anticuerpos y controles de α-sinucleína utilizados para inyección intracerebral en un modelo transgénico de sinucleopatía neuronal.

Anticuerpo monoclonal	Epítomo/especificidad	Isotipo
11A5	α-sinucleína fospoSER ₁₂₉	IgG1
8A5	α-sinucleína C-terminal	IgG1
9G5	α-sinucleína 40-55	IgG1
23E8	α-sinucleína 40-54	IgG1
6H7	α-sinucleína N-terminal	IgG1
4B1	α-sinucleína C-terminal	IgG2a
5C ₁₂	α-sinucleína 109-120	IgG2b
27-1	control	IgG1
TY11-15	control	IgG2a
5B7	control	IgG2b

[0256] Para cada ratón, 2 µl de una solución de anticuerpo 2 mg/ml se inyectaron estereotácticamente bajo anestesia en las capas profundas de la corteza cerebral parietal del hemisferio cerebral derecho (lado ipsilateral). Los hemisferios izquierdos (lado contralateral) sirvieron como control de línea de base para cada ratón. Los puntos de inyección se suturaron y los ratones se monitorizaron hasta que se recuperaron de la anestesia. El investigador que realizó las inyecciones se cegó en cuanto a qué anticuerpo se inyectó cada vez. Dos semanas después de la inyección, los ratones se sometieron a eutanasia siguiendo las pautas institucionales. Sus cerebros se retiraron, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 48 h, y se cortan coronalmente a 40 µm de espesor usando un vibratome Leica. Se tiñeron dos secciones por animal (alrededor del lugar de la inyección) mediante tinción con inmunoperoxidasa con un anticuerpo policlonal de α-sinucleína (ELADW-47, que reconoce los aminoácidos de α-sinucleína 115-122). Para cada sección, los agregados de α-sinucleína intraneuronales se contaron en 4 campos microscópicos (objetivo 20x) alrededor del sitio de inyección en el hemisferio ipsilateral, y en 4 campos SD correspondientes en el hemisferio de control contralateral. Los recuentos agregados de α-sinucleína para dos secciones se sumaron para cada hemisferio. Finalmente, para cada animal, la diferencia entre el recuento total de agregados de α-sinucleína entre los dos hemisplantes aquí se calculó y se expresó como % de diferencia entre el hemisferio contralateral e ipsilateral, proporcionando así una medida del efecto de los anticuerpos de α-sinucleína en el despeje agregado para cada ratón individual. Las secciones se codificaron a ciegas y el código se rompió cuando se completó el análisis.

[0257] Los ratones se pueden categorizar en tres grupos en base a los anticuerpos inyectados:

Grupo 1: Ratones inyectados con 11A5, 8A5 o un control de IgG₁,

Grupo 2: Ratones inyectados con 9G5, 23E8, 6H7 o un control de IgG₁,

Grupo 3: Ratones inyectados con 4B1, 5C12, un control IgG_{2a} o un control IgG_{2b}.

[0258] Resultados. Los resultados del estudio se muestran en las Figs. 11 y 12, Los agregados de α-sinucleína intraneuronal fueron eliminados por dos anticuerpos monoclonales: 8A5 (también llamado JH4.8A5) y 6H7 (también llamado JH17.6H7), ambos descritos en la publicación de patente PCT WO 05047860A2 ("Antibodies to Alpha-Synuclein" presentada el 26 de mayo de 2005) y en la solicitud de patente pendiente de tramitación N° 10/984192. El MAb 6H7 se rasificó contra α-sinucleína humana recombinante expresada en E. coli y reconoce el amino-terminus de α-sinucleínas humanas y de ratón. reconoce un epítipo que incluye los tres primeros aminoácidos de la α-sinucleína. MA b 6H7 es capaz de reconocer proteínas de fusión de sinucleína en las que la proteína marcada se fusiona con el extremo N de la sinucleína, lo que sugiere que no se requiere un extremo amino libre (aunque puede ser preferible). El MAb 8A5 se generó contra sinucleínas bovinas purificadas (mezcla de α y β) y reconoce un epítipo en el extremo carboxi de las α-sinucleínas humanas y de ratón. El MAb 8A5 puede unirse a la sinucleína truncada que termina en el aminoácido 139. Los experimentos preliminares sugieren que el 8A5 tiene una preferencia de 4 a 5 veces para la sinucleína con un C-terminal libre comparado con un C-terminal conjugado con la biotina. Tanto el mAb 6H7 como el mAb 8A5 también reconocen la beta-sinucleína. El MAb 4B1 reconoce la región C-terminal de la sinucleína y se une a la sinucleína en las transferencias Western, pero no reconoce la sinucleína en la solución (es decir, el mAb 4B1 no inmunoprecipita la sinucleína). La Fig. 12 muestra secciones del lado contralateral (panel izquierdo; los puntos redondos de color marrón dentro de la sección son agregados de α-sinucleína) y el lado ipsilateral (panel derecho) de un ratón inyectado con 8A5. La diferencia entre los ratones inyectados con 8A5 y los controles inyectados con IgG₁ fue estadísticamente significativa (p <0,05 por Kruskal-Wallis no paramétrico seguido por la prueba post-hoc de Dunn). Estos resultados indican que la orientación del C-terminal de α-sinucleína y/o el N-terminal es terapéuticamente beneficiosa en las sinucleopatías como la EP y la DCL. La administración de otros anticuerpos anti-α-sinucleína ensayados (Tabla 5, Fig. 11) no dio como resultado la eliminación de los agregados.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0259]

<110> Elan Pharmaceuticals, Inc.

La Dirección de la Universidad de California

Schenk, Dale B.

Maslah, Eliezer

Buttini, Manuel

Chilcote, Tamie

Rockenstein, Edward

Games, Dora

<120> PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD SINUCLEINOPÁTICA

<130> 015270-008950PC

ES 2 705 586 T3

<140> WO 00/000,000
 <141> 2005-08-09

 5 <150> US 11/185,907
 <151> 2005-07-19

 <150> US 10/915,214
 <151> 2004-08-09

 10 <150> US 10/699,517
 <151> 2003-10-31

 <150> US 10/698,099
 <151> 2003-10-31

 15 <150> US 60/423,012
 <151> 2002-11-01

 <160> 57

 20 <170> Patente en versión 3.1

 <210> 1
 <211> 140
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 1

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

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

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

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

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

 55 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

 60 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
 65 <211> 35

ES 2 705 586 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

5

Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala

10

1 5 10 15

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

15

Gly Phe Val
35

20

<210> 3
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25

<400> 3

30

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr
1 5 10 15

35

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

40

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Influenza virus

45

<400> 4

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

50

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Plasmodium sp.

55

<400> 5

60

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

65

ES 2 705 586 T3

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
5 <213> Hepatitis B virus

<400> 6

10

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

<210> 7
<211> 19
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

25

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

30 Asn Glu Gly

<210> 8
<211> 14
35 <212> PRT
<213> Mycobacterium bovis

<400> 8

40

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

45

<210> 9
<211> 15
50 <212> PRT
<213> Clostridium tetani

<400> 9

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

<210> 10
60 <211> 21
<212> PRT
<213> Clostridium tetani

<400> 10

65

ES 2 705 586 T3

```

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

5      Ala Ser His Leu Glu
           20

10     <210> 11
        <211> 16
        <212> PRT
        <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

15     <400> 11

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

20     <210> 12
        <211> 13
        <212> PRT
        <213> Secuencia artificial

25     <220>
        <223> Proteína de fusión

30     <220>
        <221> MISC_FEATURE
        <222> (3)..(3)
        <223> X es preferiblemente ciclohexilalanina, tyrosine o fenilalanina

35     <400> 12

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

40     <210> 13
        <211> 14
        <212> PRT
        <213> Secuencia artificial

45     <220>
        <223> Proteína de fusión

50     <400> 13

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

55     <210> 14
        <211> 13
        <212> PRT
60     <213> Secuencia artificial

        <220>
        <223> Proteína de fusión

65     <400> 14

```

ES 2 705 586 T3

```

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

    <210> 15
    <211> 12
10    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Proteína de fusión

15    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (1)..(1)
    <223> X is ácido amino-heptanoico

20    <400> 15

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

    <210> 16
    <211> 16
30    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
35    <223> Proteína de fusión

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (1)..(1)
40    <223> X es péptido NAC

    <400> 16

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

50    <210> 17
    <211> 22
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

55    <220>
    <223> Proteína de fusión

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
60    <222> (1)..(1)
    <223> X = péptido NAC

    <400> 17

65

```

ES 2 705 586 T3

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

Ser Ala Ser His Leu Glu
20

10 <210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Proteína de fusión

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X = péptido NAC

25 <400> 18

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

35 <210> 19
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Proteína de fusión

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X= péptido NAC

50 <400> 19

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

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

60 Ala Ser His Leu Glu

65

35

ES 2 705 586 T3

<210> 20
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Proteína de fusión
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> X= péptido NAC
 20
 <400> 20
 25 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Xaa
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Proteína de fusión
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 40 <223> X = péptido NAC
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 45 <223> X= ciclohexilalanina, tirosina, o fenilalanina
 <400> 21
 50 Xaa Xaa Xaa Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Proteína de fusión
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 65 <223> X= ciclohexilalanina, tirosina, o fenilalanina

ES 2 705 586 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(17)
 5 <223> X=NAC peptide

 <400> 22

 10 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Xaa
 15

 <210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Proteína de fusión

 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = péptido NAC

 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X= ciclohexilalanina, tirosina, o fenilalanina

 35 <400> 23

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

 <210> 24
 <211> 18
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Proteína de fusión
 50

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X=NAC
 55

 <400> 24

 60 Xaa Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala
 1 5 10 15

 Gly Arg
 65

ES 2 705 586 T3

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Proteína de fusión
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(16)
 <223> X = péptido NAC
 <400> 25
 15
 Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 20
 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Proteína de fusión
 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X= péptido NAC
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> X= péptido NAC
 <400> 26
 40
 Xaa Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Xaa
 1 5 10 15
 45
 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Proteína de fusión
 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 <223> X = péptido NAC
 <400> 27
 60
 Xaa Xaa Xaa Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 65

ES 2 705 586 T3

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Proteína de fusión
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)
 <223> X = péptido NAC
 <400> 28
 15
 Xaa Xaa Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 20
 <210> 29
 <211> 106
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Proteína de fusión
 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(106)
 <223> X = péptido NAC
 <400> 29
 35
 Xaa Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Glu Lys
 1 5 10 15
 40
 Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Gln Tyr
 20 25 30
 45
 Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn
 35 40 45
 50
 Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His
 50 55 60
 55
 Leu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile
 65 70 75 80
 60
 Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg
 85 90 95
 65
 Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
 100 105

ES 2 705 586 T3

<210> 30
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Proteína de fusión
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(77)
 <223> X = péptido NAC
 <400> 30
 15
 Xaa Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15
 20 Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val
 20 25 30
 25 Ser Ala Ser His Leu Glu Xaa Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 35 40 45
 30 Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
 50 55 60
 35 Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Xaa
 65 70 75
 <210> 31
 <211> 16
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Proteína de fusión
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X = péptido NAC
 50 <400> 31
 55 Xaa Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15
 <210> 32
 <211> 26
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Proteína de fusión
 65

ES 2 705 586 T3

<400> 32

5 Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Ile Ser Gln Ala Val His Ala
 1 5 10 15

10 Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
 20 25

<210> 33

<211> 43

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

20 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

25 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

30 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
 35 40

<210> 34

35 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Conjugado

<400> 34

45 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 1 5 10 15

50 Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 20

<210> 35

55 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Conjugado

<400> 35

65

ES 2 705 586 T3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
 1 5 10 15
 5
 Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
 20 25
 10 <210> 36
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Conjugado
 <400> 36
 20
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 1 5 10 15
 25 Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
 20 25 30
 30 Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
 35 40
 35 <210> 37
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Conjugado
 <400> 37
 45 Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 1 5 10 15
 50 Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 20
 55 <210> 38
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Conjugado
 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X= ciclohexilalanina, tirosina, o fenilalanina
 65

ES 2 705 586 T3

<400> 38

5 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu
1 5 10 15

10 Phe Arg His Asp
20

<210> 39
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conjugado

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> X= ciclohexilalanina, tirosina, o fenilalanina

<400> 39

30 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

35 Glu Phe Arg His Asp Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala
20 25 30

40 Ala Ala

<210> 40
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X= ciclohexilalanina, tirosina, o fenilalanina

<400> 40

60

65

ES 2 705 586 T3

5 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Asp Ala Glu
1 5 10 15

Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg
20 25 30

10 His Asp

15 <210> 41
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Proteína de fusión

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X= ciclohexilalanina, tirosina, o fenilalanina

<400> 41

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

35 Lys Ala Ala Ala
20

40 <210> 42
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Proteína de fusión

<400> 42

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

55 Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

60 <210> 43
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Proteína de fusión

ES 2 705 586 T3

<400> 43

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

10 Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 44

<211> 24

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

20

<400> 44

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

30 Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 45

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Proteína de fusión

<400> 45

40

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu
1 5 10 15

45 Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg
20 25 30

50 His Asp

<210> 46

<211> 27

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión

60

<400> 46

65

ES 2 705 586 T3

5 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ala Thr Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
20 25

10

<210> 47
<211> 34
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

20 <400> 47

25 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu
20 25 30

30 Ala Thr

35 <210> 48
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Proteína de fusión

<400> 48

45 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys
1 5 10 15

50 Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
20 25

55 <210> 49
<211> 79
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Proteína de fusión

<400> 49

65

ES 2 705 586 T3

5 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu
1 5 10 15

10 Lys Leu Ala Thr Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser
20 25 30

15 Val Phe Asn Val Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile
35 40 45

20 Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro
50 55 60

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

30 <210> 50
<211> 56
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Proteína de fusión

40 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Asp Ala
1 5 10 15

45 Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly
20 25 30

50 Ile Thr Glu Leu Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro
35 40 45

55 Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
50 55

60 <210> 51
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Proteína de fusión

<400> 51

ES 2 705 586 T3

5 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
10 20 25 30

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

<210> 52
<211> 51
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

25 <400> 52

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
30 1 5 10 15

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
35 20 25 30

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

Arg His Asp
50

<210> 53
45 <211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Proteína de fusión

<400> 53

55

60

65

ES 2 705 586 T3

5 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
 1 5 10 15

10 Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 20

15 <210> 54
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54

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

25 <210> 55
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 55

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

40 <210> 56
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (1)..(1)
 <223> X = ácido amino-heptanoico
 <400> 56

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

55 <210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 65 <223> ACETILACIÓN X= Acetylated proline

ES 2 705 586 T3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

5 <223> X = Prolina acilada

<400> 57

10 Xaa Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Cys Ala
1 5 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de la alfa-sinucleína humana, siendo los residuos numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, para uso en terapia.
- 2.** El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la terapia está efectuando profilaxis o tratando una enfermedad **caracterizada por** cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro.
- 10 **3.** El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es un anticuerpo monoclonal.
- 4.** El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 3, que es un anticuerpo quimérico.
- 5.** El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 3, que es un anticuerpo humano.
- 15 **6.** El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 3, que es un anticuerpo humanizado.
- 7.** El anticuerpo para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que es un anticuerpo del isotipo IgG1 humano.
- 20 **8.** El anticuerpo para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que se administra con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica.
- 9.** El anticuerpo para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que se administra a una dosis de 1 a 10 mg/kg de anticuerpo de peso corporal.
- 25 **10.** El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que se administra en dosis múltiples durante al menos seis meses.
- 11.** El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que se administra por vía intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosa.
- 30 **12.** Un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de la alfa-sinucleína humana, y un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de la alfa-sinucleína humana, los números se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, para uso en terapia.
- 35 **13.** El primer anticuerpo y el segundo seudónimo de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la terapia afecta la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro.
- 40 **14.** El primer anticuerpo y el segundo anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el segundo anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana.
- 45 **15.** Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo quimérico o humanizado que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de alfa-sinucleína, los residuos se numeran según la SEQ ID NO: 1, y un vehículo farmacéutico, para uso en terapia.
- 50 **16.** La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la terapia es la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad **caracterizada por** cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro.
- 55 **17.** Una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de alfa-sinucleína humana, en donde el fragmento inmunogénico está libre de residuos 25-140 de alfa-sinucleína, siendo los números numerados de acuerdo con SEQ ID NO.1, uso en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad **caracterizada por** cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro.
- 60 **18.** El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el fragmento inmunogénico se selecciona del grupo que consiste en los residuos 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9 y 1-10 de alfa sinucleína.
- 19.** El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el que el fragmento inmunogénico está unido a un vehículo para formar un conjugado.
- 65 **20.** El efecto apolipeptídico de la inmunoglobulina induce la aparición de anticuerpos monodosa en los restos 1-10 de alfa-sinucleína humana y los anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 70-140 de la alfa-sinucleína humana en donde dicho polipéptido no induce una respuesta inmunogénica que comprenda el

anticuerpo que se une específicamente a un epítipo con residuos 25-69 de alfa-sinucleína humana, para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad **caracterizada por** cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, en donde el polipéptido carece al menos los residuos 25-69 de alfa-sinucleína humana, y en donde los residuos son numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

5
21. Una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de alfa-sinucleína humana, en donde el fragmento inmunogénico está libre de residuos 25-140 de alfa-sinucleína, y un polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína, dicho segundo fragmento eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, siendo los residuos numerados de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, para usar en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad caracterizada Por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro.

10
15
22. El anticuerpo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 12 a 14, la composición farmacéutica para uso de acuerdo con las reivindicaciones 15 y 16, el polipéptido para uso de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 20, los polipéptidos para su de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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

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

(SEQ ID NO:2) EQVTNVGGAVVTGVTA VAQKTVEGAGSIA AATGFV (residuos 61-95)

(SEQ ID NO:3) KEQVTNVGGAVVTGVTA VAQKTVEGAGS (residuos 60-87)

⁴**Residuo #** 115 120 125 130 135 140
 (SEQ ID NO:1) GILEDMPVDPDNEA YEMPS EEGYQDY EPE A (residuos 1-140)

Fig. 1

Immunización de α -sinucleína reduce las inclusiones de formación SYN (+)

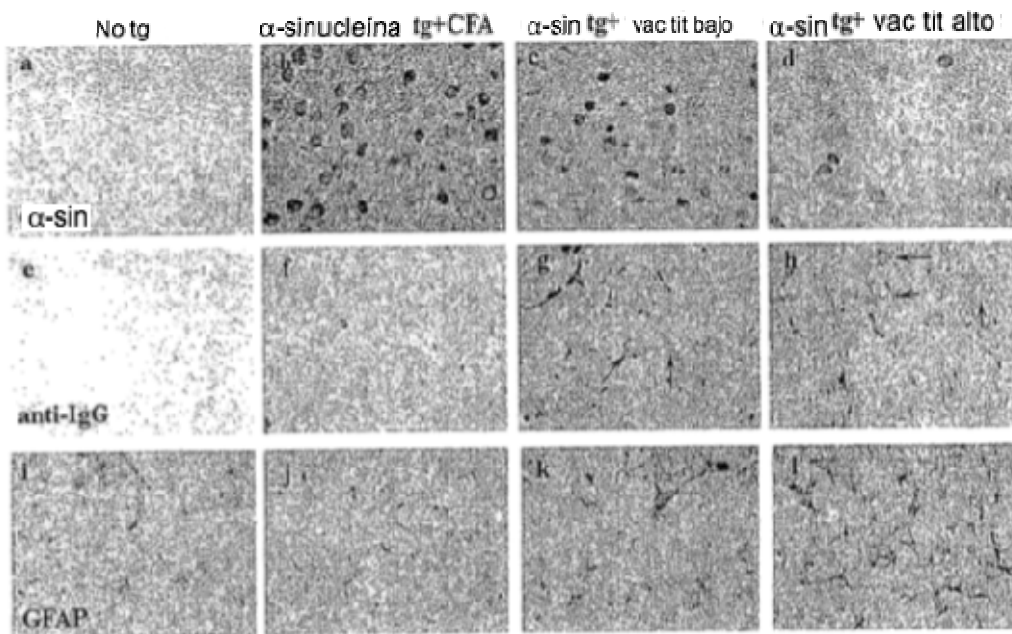


Fig. 2

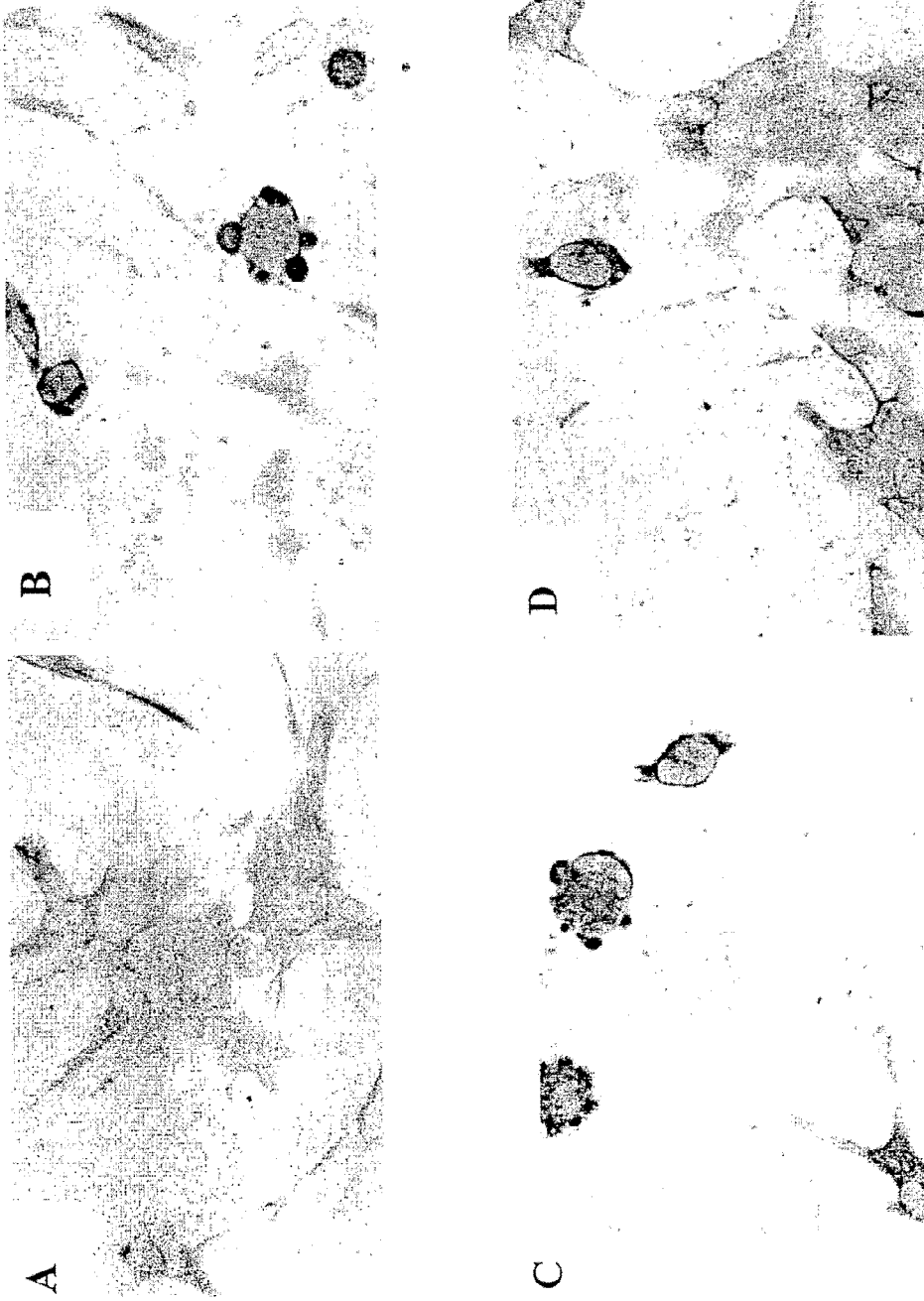
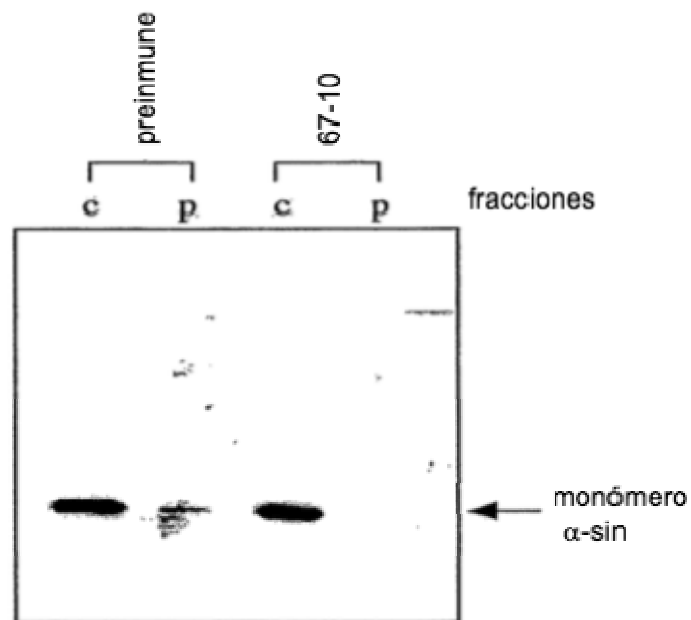


Fig. 3



Células que sobreexpresan GT1-7 α -sin fueron incubadas con suero α -sin anti-ratón o suero preimmune (1:50) durante 48 horas.

-Resultado-

1. La proliferación celular se suprimió ligeramente en las células tratadas con suero α -sin anti-ratón (67-10) en comparación con las células tratadas con el suero preimmune (no mostradas).
2. En las células tratadas con el suero α -sin anti-ratón, la inmunoreactividad de α -sin se redució en la fracción particulada.

Fig. 4

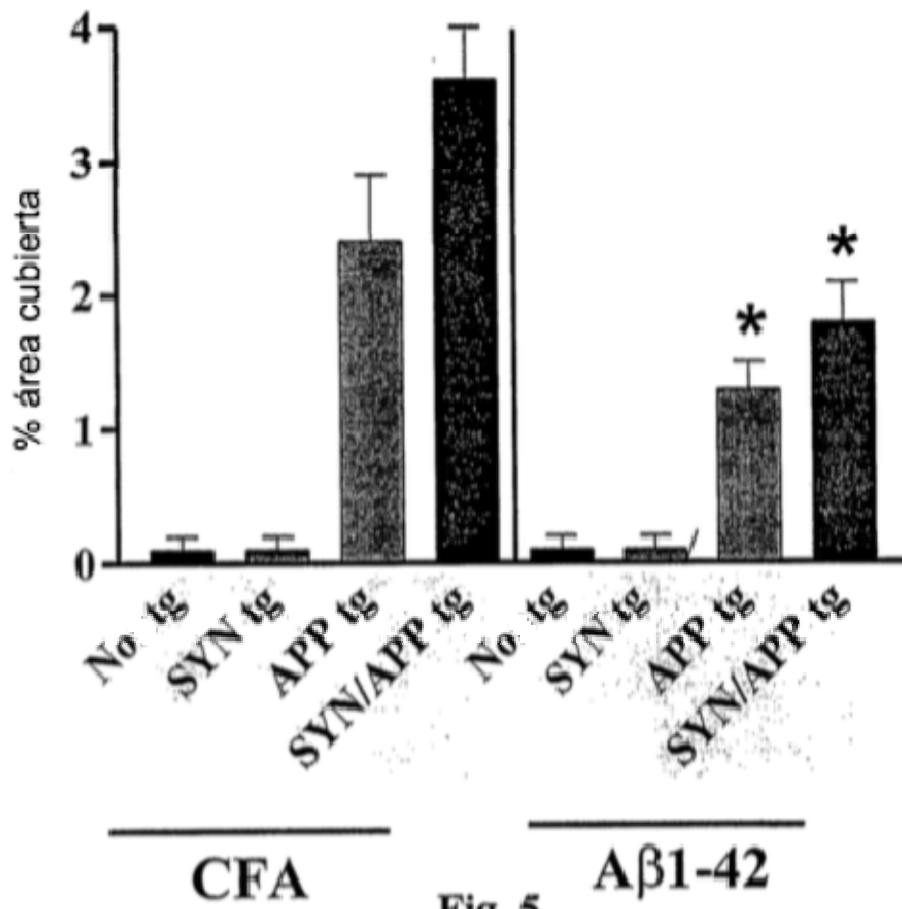


Fig. 5

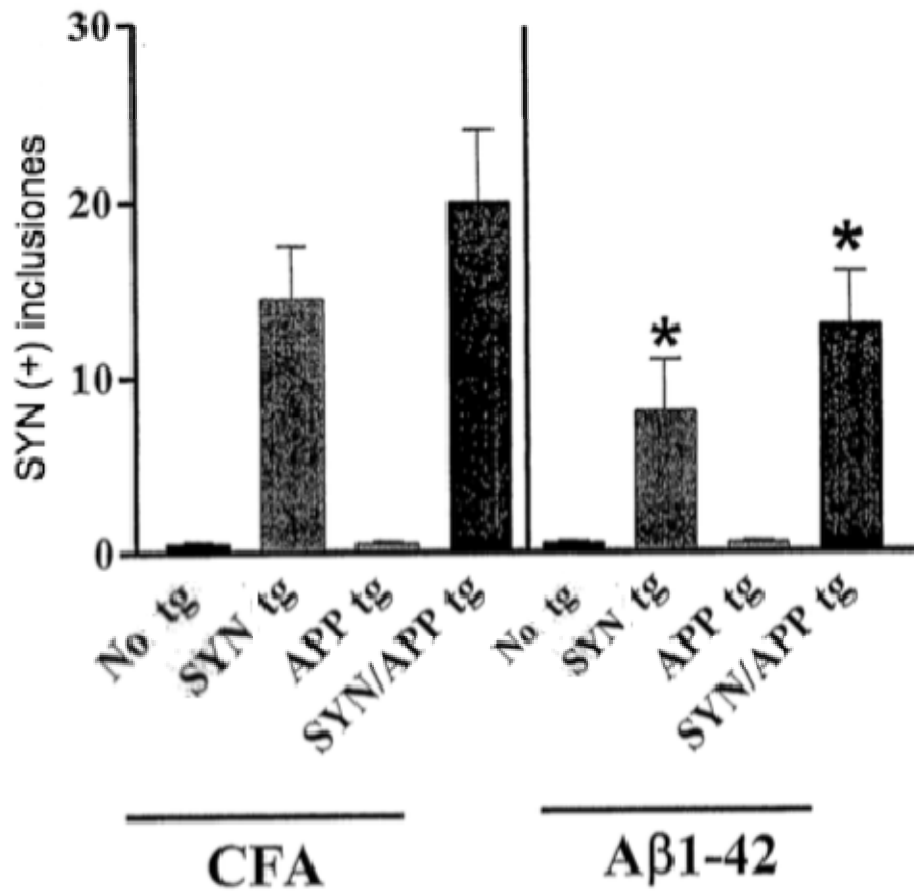


Fig. 6

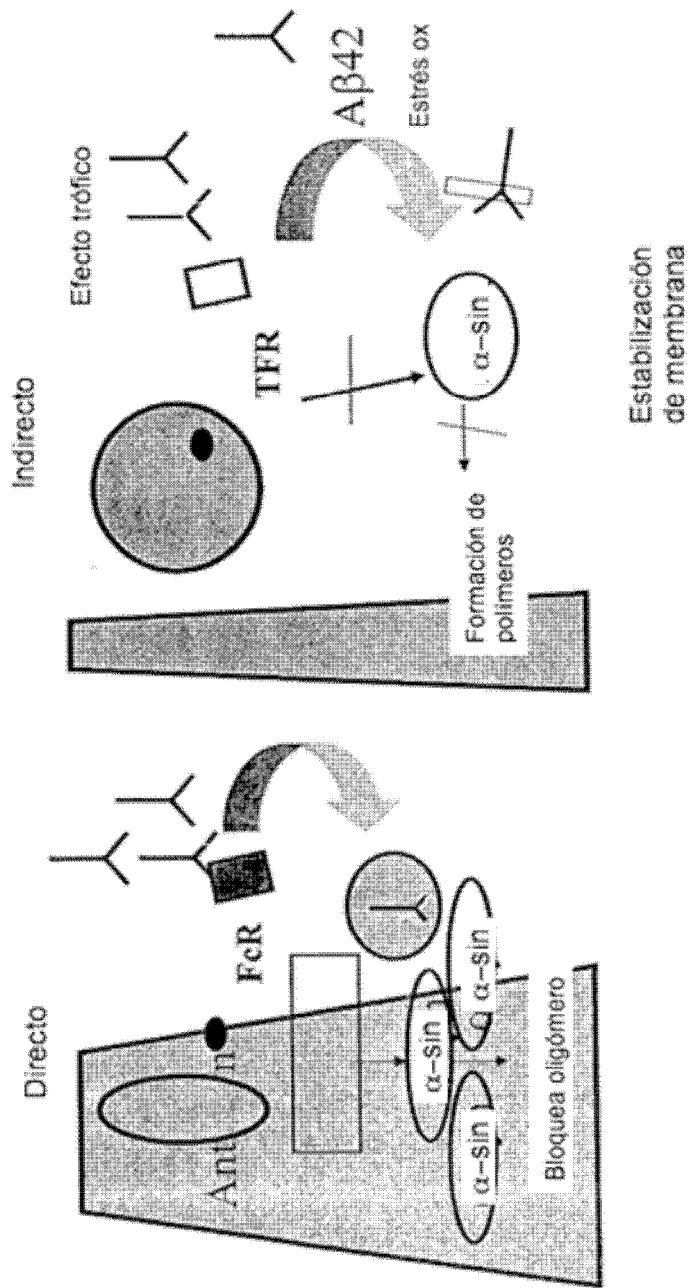


Fig. 7

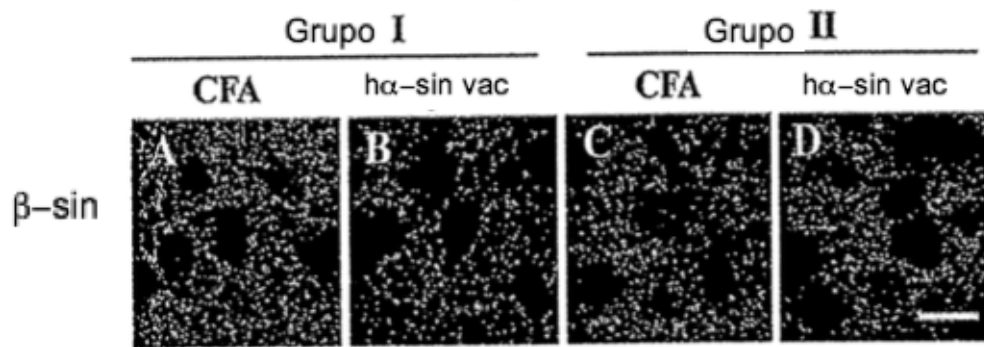


Fig. 9

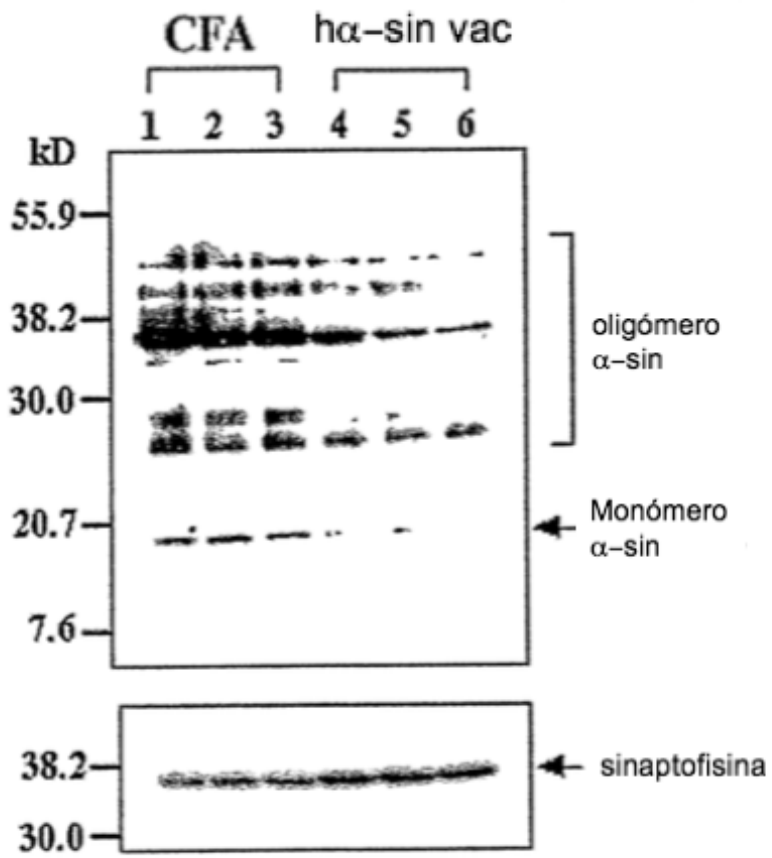


Fig. 10

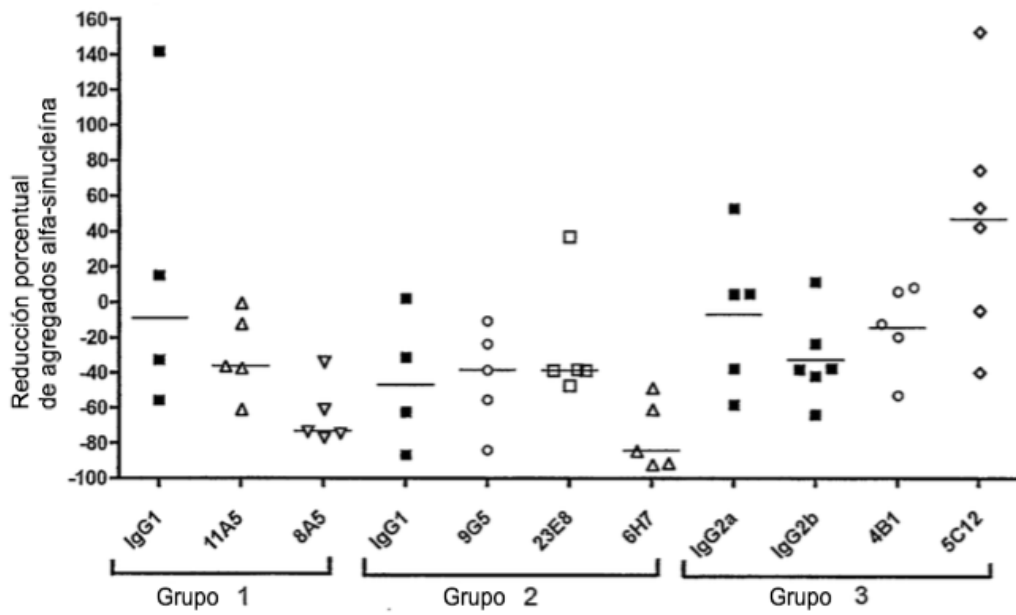


Figura 11

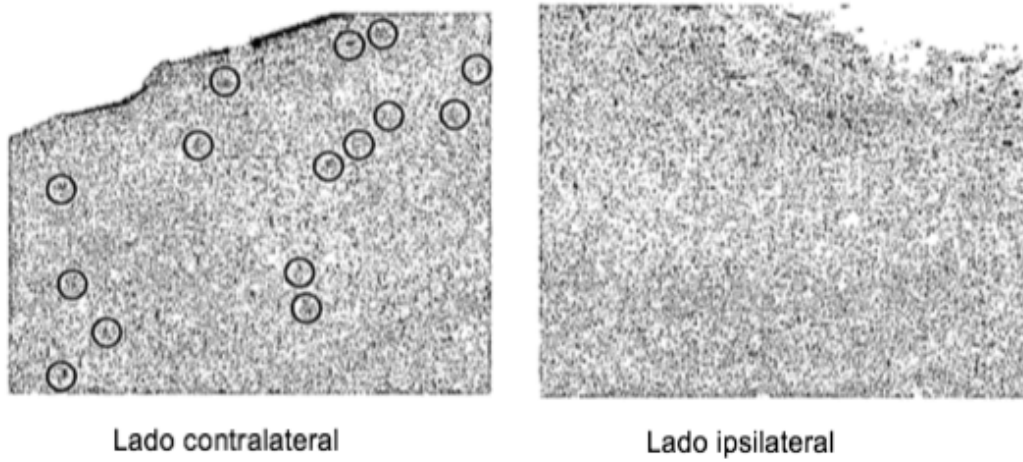


Figura 12