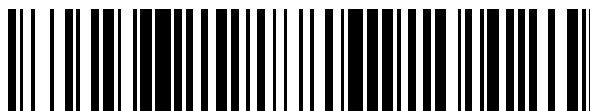


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 048**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2009 PCT/IB2009/051731**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09133521**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2009 E 09738534 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2282758**

54 Título: **Anticuerpos y vacunas para su uso en métodos terapéuticos y diagnósticos para trastornos relacionados con alfasinucleína**

30 Prioridad:
29.04.2008 US 48865 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.04.2019

73 Titular/es:
**BIOARCTIC AB (100.0%)
 Warfvinges väg 35
 112 51 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:
**LANNFELT, LARS;
 BERGSTRÖM, JOAKIM;
 INGELSSON, MARTIN y
 GELLERFORS, PÅR**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 709 048 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos y vacunas para su uso en métodos terapéuticos y diagnósticos para trastornos relacionados con alfa-sinucleína

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos y su uso en los métodos terapéuticos y diagnósticos para trastornos relacionados con α -sinucleína, es decir, α -sinucleinopatías en donde la acumulación de α -sinucleína insoluble agregada en la forma de cuerpos de Lewy y/o neuritas de Lewy está presente en el cerebro. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia sistémica múltiple y otros trastornos neurodegenerativos con patología de α -sinucleína.

10

Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos que se unen a α -sinucleína soluble estabilizada. Los oligómeros de α -sinucleína solubles estabilizados tienen una tasa de formación a una forma agregada no soluble inferior que un oligómero no estabilizado de la α -sinucleína. El oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado puede estar en forma de, por ejemplo, un oligómero mayor, referido como protofibrilla.

15

La invención también está dirigida a métodos *in vitro* de detección de α -sinucleína, y a métodos para retrasar una aparición de, tratamiento, o prevención de un trastorno relacionado con α -sinucleína tal como, pero no limitado a, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, y atrofia sistémica múltiple.

20

25 Antecedentes de la invención

La enfermedad de Parkinson (EP) y la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) son los dos ejemplos más dominantes de los trastornos neurodegenerativos con patología cerebral de α -sinucleína.

30

La EP es el trastorno de movimiento más común y se caracteriza por rigidez, hipoquinesia, temblor e inestabilidad postural. Se cree que EP afecta a aproximadamente cuatro a seis millones de personas en todo el mundo.

DCL representa el 5 a 15 % de toda la demencia. Además de los olvidos y otros síntomas de demencia que con frecuencia fluctúan, los pacientes con DCL generalmente sufren de caídas recurrentes y alucinaciones visuales.

35

La acumulación intraneuronal de α -sinucleína da como resultado o bien la formación de cuerpos de Lewy, inclusiones de hialina eosinófilas largas de alrededor de 10 a 20 μm , o neuritas de Lewy, axones y dendritas distróficas tipo hilo alargadas. En el cerebro con EP, la deposición de los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy se limita a las neuronas que conectan el estriato con la sustancia negra. Estas células son cruciales para la ejecución del movimiento y las funciones posturales, explicando la naturaleza de los síntomas de EP. En el cerebro con DCL, se encuentran deposiciones extendidas de cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy tanto en áreas del mesencéfalo como corticales.

40

La alfa-sinucleína es una proteína que principalmente se encuentra intraneuronalmente. Dentro de la neurona, la α -sinucleína está de manera predominante localizada presinápticamente y por lo tanto se ha especulado que juega un papel en la regulación de la actividad sináptica. Se han identificado tres isoformas principales de α -sinucleína, de las cuales la forma más larga y la más común comprende 140 aminoácidos.

45

Además de α -sinucleína, los cuerpos de Lewy consisten en un amplio rango de moléculas, una de las cuales es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), un hidroxi-alquenal α,β -insaturado (Qin y col., 2007). Se ha demostrado *in vitro* que HNE puede modificar α -sinucleína y de ese modo facilitar la oligomerización de α -sinucleína. En particular, se ha demostrado que HNE incrementa y estabiliza la formación de protofibrillas, es decir, formas oligoméricas más largas solubles de α -sinucleína (Qin y col., 2007). Igualmente, se ha demostrado también que el alquenal α,β -insaturado 4-oxo-2-nonenal (ONE) modifica la α -sinucleína y de ese modo induce la oligomerización de la α -sinucleína (Näsström y col., 2009). Trostchansky y col., *Biochem. J.* 393:343-349, 2006, incubaron α -sinucleína con el 4-HNE y concluyeron que la asociación de α -sinucleína con membranas biológicas protege la proteína de la oxidación y la nitración y por tanto disminuye la formación de moléculas proteicas capaces de formar agregados. Trostchansky y col. también concluyeron que los productos de peroxidación de lípido también pueden modificar la α -sinucleína, generando nuevos aductos proteicos que podrían servir como biomarcadores para documentar los procesos oxidativos en seres humanos así como modelos animales y celulares de la agregación y patología de α -sinucleína. También se ha demostrado *in vitro* que los agentes de nitración pueden facilitar la oligomerización de α -sinucleína induciendo el entrecruzamiento de la ditirosina, lo cual puede tener relevancia *in vivo* (Souza y col., *J. Biol. Chem.* 275(4):18.344-18.349, 2000).

55

60

HNE reacciona y modifica las cadenas laterales de la cisteína, histidina y lisina, mientras que ONE reacciona y modifica las cadenas laterales de la cisteína, histidina, lisina y arginina. Tanto HNE como ONE alteran

sustancialmente la estructura y las propiedades físicas de estas cadenas laterales. Por lo tanto, HNE y ONE pueden reaccionar o bien con el carbono C-3 o con el grupo aldehído o por combinaciones de los mismos. Por lo tanto, HNE puede modificar covalentemente las proteínas, o bien inter- o intramolecularmente.

- 5 El estrés oxidativo ha estado implicado en un número de trastornos neurodegenerativos caracterizados por la acumulación patológica de α -sinucleína mal plegada. Diversas especies de oxígeno reactivo pueden inducir la peroxidación de lípidos tales como membranas celular o lipoproteínas y también dan como resultado la generación de aldehídos altamente reactivos a partir de ácidos grasos poliinsaturados (Yoritaka y col., 1996).
- 10 La patología cerebral indicativa de la enfermedad de Alzheimer (EA), es decir, placas amiloides y ovillos neurofibrilares, se ven en aproximadamente el 50 % de los casos con DCL. No está claro si la existencia de patologías paralelas implica dos enfermedades diferentes o representa una variante de cada respectivo trastorno. Algunos de los casos con tal copatología se describen como que tienen una variante de cuerpo de Lewy de la EA (Hansen y col., 1990).
- 15 Formas heredadas de manera dominante raras de EP y DCL pueden estar causadas por mutaciones puntuales o duplicaciones del gen α -sinucleína. Se ha descrito que las mutaciones patogénicas A30P y A53T (Kruger y col., 1998) (Polymeropoulos y col., 1998) y la duplicación del gen (Chartier-Harlin y col., 2004) causan EP hereditario, mientras que se ha informado que otra mutación más de α -sinucleína, E46K (Zarranz y col., 2004) así como la triplicación del gen α -sinucleína (Singleton y col., 2003) causan o bien EP o DCL.

- 20 Las consecuencias patógenas de las mutaciones de α -sinucleína solamente se entienden de manera parcial. Sin embargo, los datos *in vitro* han demostrado que las mutaciones A30P y A53T incrementan la tasa de agregación (Conway y col., 2000). Un amplio rango de especies de α -sinucleína diferentemente compuestas se forman en el proceso de agregación, todas las cuales pueden tener diferentes propiedades tóxicas. Aparte de los cambios neuropatológicos en las α -sinucleinopatías, los niveles de la proteína α -sinucleína en general se incrementan en las regiones cerebrales afectadas (Klucken y col., 2006).

- Hay una necesidad de herramientas y métodos diagnósticos mejorados para identificar un riesgo de y/o fases tempranas de una enfermedad neurodegenerativa con patología de α -sinucleína. Actualmente, no hay un método bioquímico para ayudar a un diagnóstico médico de un paciente antes de que sea evidente una fase de enfermedad sintomática más avanzada, cuando el daño importante al cerebro ya ha ocurrido. La importancia de pruebas diagnósticas precisas llegará a ser incluso mayor a medida que surjan nuevas posibilidades terapéuticas de fase temprana. Actualmente, solamente el tratamiento sintomático (por ejemplo, sustituyendo la pérdida de dopamina activa en el cerebro) está disponible para pacientes con EP. Para DCL, están disponibles incluso menos opciones terapéuticas. Sin embargo, los médicos frecuentemente están evaluando posibles efectos beneficiosos sobre los pacientes con DCL con el tratamiento estándar para EA, es decir, inhibidores de colinesterasas, pero comúnmente no se puede ver mejora sustancial. Ninguna de las estrategias de tratamiento existentes para las α -sinucleinopatías están dirigidas a los respectivos procesos subyacentes de la enfermedad. Además, también hay una necesidad de hacer un seguimiento del progreso de la enfermedad y de los efectos del tratamiento. Los documentos WO 2004/041067 y WO 2006/020581 enseñan el uso de la vacunación con α -sinucleína o un fragmento de la misma, o inmunización pasiva usando un anticuerpo para α -sinucleína, en el tratamiento de trastornos con patología cerebral de α -sinucleína. Los documentos WO 2004/041067 y WO 2006/020581 también enseñan que los trastornos con patología cerebral de α -sinucleína alternativamente se pueden tratar por vacunación con amiloide- β o un fragmento del mismo, o inmunización pasiva usando un anticuerpo para amiloide- β . El documento WO 2005/047860 proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a α -sinucleína, y se puede usar en la detección de α -sinucleína en una muestra, por ejemplo, por ELISA. El documento WO 00/02053 enseña el uso de anticuerpos que se unen a α -sinucleína en el diagnóstico de enfermedades con patología cerebral de α -sinucleína usando los anticuerpos para detectar la presencia de α -sinucleína en el fluido cerebroespinal. Sin embargo, como se describe más adelante, los anticuerpos producidos a partir de α -sinucleína estabilizada son particularmente ventajosos para el tratamiento de trastornos con patología cerebral de α -sinucleína y no se han descrito previamente.

Sumario de la invención

- Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención proporcionar anticuerpos para su uso en los métodos terapéuticos y/o diagnósticos para los trastornos relacionados con α -sinucleína, es decir, α -sinucleinopatías en donde la acumulación de α -sinucleína insoluble agregada en forma de cuerpos de Lewy y/o neuritas de Lewy está presente en el cerebro. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, uno o más trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia sistémica múltiple y otros trastornos neurodegenerativos con patología de α -sinucleína.

En una realización, la invención está dirigida a un medicamento para su uso en el tratamiento de y/o para retrasar la aparición de un trastorno relacionado con α -sinucleína en un individuo, en donde el trastorno relacionado con α -sinucleína se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y/o

neuritas de Lewy, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, atrofia sistémica múltiple (ASM), otras enfermedades con patología de cuerpos de Lewy, síndrome de la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, kuru, insomnio hereditario mortal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y enfermedades tipo esquizofrenia, comprendiendo el medicamento un anticuerpo producido a partir de un oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, y capaz de unirse a un oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, teniendo el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado una tasa de formación a una forma agregada no soluble inferior que un oligómero soluble no estabilizado de la α -sinucleína, en donde el oligómero de α -sinucleína comprende α -sinucleína de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:1 a 8, y en donde el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado se estabiliza mediante entrecruzamiento con un agente de entrecruzamiento proteico o uniéndose a un agente estabilizante.

En otra realización, la invención está dirigida a un anticuerpo capaz de unirse a un oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, teniendo el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado una tasa de formación a una forma agregada no soluble inferior que un oligómero soluble no estabilizado de la α -sinucleína, en donde el anticuerpo se produce a partir del oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, en donde el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado comprende α -sinucleína de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:1 a 8, y en donde el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado se estabiliza mediante entrecruzamiento con un agente de entrecruzamiento proteico o por un agente estabilizante.

En otra realización, la invención está dirigida a un método de producción de un anticuerpo para retrasar una aparición de o para el tratamiento de un trastorno relacionado con α -sinucleína en un individuo, en donde el trastorno relacionado con α -sinucleína se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y/o neuritas de Lewy, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, atrofia sistémica múltiple (ASM), otras enfermedades con patología de cuerpos de Lewy, síndrome de la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, kuru, insomnio hereditario mortal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y enfermedades tipo esquizofrenia, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, teniendo el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado una tasa de formación a una forma agregada no soluble inferior que un oligómero soluble no estabilizado de la α -sinucleína. El método comprende administrar un antígeno a un animal no humano; y recoger el anticuerpo formado frente al antígeno, comprendiendo el antígeno un oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado que tiene una tasa de formación a una forma agregada no soluble inferior que un oligómero no estabilizado de la α -sinucleína, en donde el oligómero de α -sinucleína comprende α -sinucleína de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:1 a 8, y en donde el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado se estabiliza mediante entrecruzamiento con un agente de entrecruzamiento proteico o uniéndose a un agente estabilizante.

El anticuerpo de la invención se puede proporcionar en forma de una composición de anticuerpo, que comprende un anticuerpo según la invención y uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en agentes antibacterianos, adyuvantes, tampones, sales, reguladores del pH, detergentes, y cualquier combinación de los mismos, que son farmacéuticamente aceptables para seres humanos y/o uso veterinario.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar en los métodos de detección. En una realización, la invención proporciona un método de detección de α -sinucleína *in vitro*, que comprende añadir un anticuerpo según la invención a una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende α -sinucleína soluble; y detectar y medir una concentración de cualquier complejo formado entre el anticuerpo y la α -sinucleína soluble. Los oligómeros de α -sinucleína se pueden detectar *in vivo* administrando a un individuo sospechoso de portar α -sinucleína soluble un anticuerpo según la invención, estando el anticuerpo marcado con un marcador detectable; y detectando la presencia de cualquier complejo formado entre el anticuerpo y la α -sinucleína soluble mediante detección del marcador.

Los anticuerpos y los métodos de la invención son ventajosos para técnicas diagnósticas y terapéuticas dirigidas a trastornos relacionados con α -sinucleína. Realizaciones y aspectos adicionales de la invención se exponen en la "Descripción detallada", y a partir de los mismos estarán claras las ventajas adicionales de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describe además con referencia a los dibujos, en los que:

La Figura 1 muestra una comparación de las tasas de agregación de las formas tipo silvestre y mutadas de α -sinucleína medidas por un ensayo de ThT (Tioflavina T), como se describe en el Ejemplo 1. La Tioflavina T es un reactivo que se une a formas agregadas de α -sinucleína, es decir, a estructuras de β -lámina. Las diferentes especies de α -sinucleína describen la siguiente tendencia de agregación: E46K>A30P/A53T>A53T>wt (tipo

silvestre)>A30P. Las especies de α -sinucleína de agregación más rápida es por tanto EK, mientras que el mutante A30P presenta una tasa de agregación incluso más lenta que para la α -sinucleína tipo silvestre.

La Figura 2A muestra una supervivencia disminuida entre células de riñón embrionario humano (HEK-293) que se han tratado con preparaciones de α -sinucleína E46K incubadas durante 24 y 41 horas. La preparación de α -sinucleína E46K incubada durante aproximadamente 24 horas mostró la mayor toxicidad. Cuando se añadió α -sinucleína no incubada (tiempo cero) a células HEK293, no se observó efecto tóxico. La Figura 2B muestra que la preparación de α -sinucleína E46K presentaba señales de ThT moderadas después de 24 horas de incubación, es decir, el grado de formación de fibrillas es moderada. Por el contrario, las muestras incubadas durante 41 horas que contenían formas fibrilares de α -sinucleína y que presentaban una alta señal de ThT, casi no mostraron efecto tóxico.

La Figura 3 muestra una supervivencia disminuida entre células de riñón embrionario humano (HEK-293) que se han tratado con protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína wt estabilizados con ONE y HNE que se añadieron exógenamente a las células y se incubaron durante 48 h. Como porcentaje de controles, se detectó un descenso significativo en la supervivencia celular para células tratadas con α -sinucleína modificada con ONE 3 μ M ($p < 0,001$) y células tratadas con α -sinucleína modificada con HNE 3 μ M ($p < 0,0001$). Los datos se expresan como porcentaje del vehículo control y representan el valor medio \pm EEM para tres experimentos separados.

La Figura 4 muestra un cromatograma de SEC-HPLC de una preparación de α -sinucleína modificada con HNE incubada a 37 °C durante 20 horas usando una estequiometría entre HNE y α -sinucleína de 30:1. El pico principal, eluyendo a 19 min (P/O), corresponde a protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína solubles. El segundo pico, eluyendo a 37 min (M), corresponde a α -sinucleína monomérica.

La Figura 5 muestra un cromatograma de SEC-HPLC de α -sinucleína tipo silvestre modificada con ONE incubada a 37 °C durante 20 horas usando una estequiometría entre ONE y α -sinucleína de 30:1. Se observa un pico principal (P/O) a 19 min y corresponde a protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína solubles. Se observa un pico adicional, eluyendo a 37 min (M) y que corresponde a monómeros de α -sinucleína.

La Figura 6 muestra una imagen por microscopia de fuerza atómica (AFM) de protofibrilla/oligómero de α -sinucleína soluble aislado modificado con HNE. Por ejemplo, se observan protofibrillas/oligómeros que presentan una estructura tipo anillo que tiene un centro hueco y un diámetro de aproximadamente 50 a 300 nm. La barra de escala representa 100 nm.

La Figura 7 muestra un análisis por AFM de protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína solubles aislados modificados con ONE. En una muestra típica, se observan protofibrillas/oligómeros con una apariencia amorfa y un diámetro de aproximadamente 30 a 150 nm. La barra de escala representa 100 nm.

La Figura 8 muestra un ELISA sobre el suero (dilución 1/10.000-1/270.000) de un ratón inmunizado con una preparación de protofibrilla/oligómero soluble de α -sinucleína humana tipo silvestre modificada con HNE. Los anticuerpos que reconocen las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína modificada con HNE se detectan en el suero.

La Figura 9 muestra un ELISA indirecto sobre suero (dilución 1/10.000-1/300.000) de un ratón inmunizado con protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína humana tipo silvestre modificada con ONE solubles. Los anticuerpos que reconocen las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína se detectan en el suero.

La Figura 10 muestra un ELISA de un anticuerpo monoclonal reactivo a protofibrilla de α -sinucleína. Se obtuvo una señal positiva con todas las tres diluciones (1/9, 1/27 y 1/82) del medio celular de hibridoma 40:2 cuando las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína tipo silvestre modificada con ONE se usaron como antígeno. La señal fondo se ha deducido a partir de los valores de DO.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos (inmunización pasiva) para su uso en diversos métodos para diagnosticar y combatir (incluyendo retrasar la aparición de, tratamiento de y/o prevención de) trastornos relacionados con α -sinucleína tales como uno o más de la enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia sistémica múltiple (ASM) y otros trastornos neurodegenerativos con patología de α -sinucleína. Además, se pueden usar los anticuerpos en el retraso de la aparición de, tratamiento y/o prevención de otros trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, insomnio hereditario mortal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y/o trastornos tipo esquizofrenia. Los anticuerpos también se pueden usar en métodos de detección para, entre otros, fines diagnósticos, de seguimiento o terapia.

La patología principal en α -sinucleinopatías es intracelular, lo cual representa un reto al planteamiento terapéutico inmune. Sin embargo, es probable que una fracción de anticuerpos activamente inducidos o pasivamente administrados se puedan unir a sus antígenos diana también intraneuronamente. Además, la identificación de α -sinucleína en tanto plasma como fluido cerebroespinal (El-Agnaf y col., 2006) ilustra que la proteína no se encuentra exclusivamente dentro de las neuronas. Sin estar unido a teoría alguna, reducir α -sinucleína extracelular puede mover el equilibrio entre los grupos proteicos intracelulares y extracelulares y da como resultado también α -sinucleína intracelular disminuida. La evidencia sugiere que la α -sinucleína en solución pueda penetrar las bicapas lipídicas en

las membranas celulares y de ese modo llegar a estar internalizada o exportada fuera de la célula. Finalmente, no se puede descartar que la α -sinucleína también pueda ejercer efectos tóxicos en el espacio extracelular.

5 La presente invención se basa en el uso de oligómeros solubles estabilizados de α -sinucleína. El peso molecular de los monómeros de α -sinucleína humana es de 14 kDa. Dos o más monómeros de α -sinucleína pueden agregarse y formar protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína solubles con un amplio intervalo de pesos moleculares. Un oligómero dominante tiene un peso molecular alrededor de 2.000 kD y se refiere como protofibrilla. Sin embargo estas formas de α -sinucleína solubles son inestables y se polimerizan espontáneamente a fibrillas insolubles. La presente invención estabiliza formas oligoméricas solubles de α -sinucleína y aísla los oligómeros solubles estabilizados, preferiblemente en forma altamente purificada, para el desarrollo el anticuerpo. Los oligómeros de α -sinucleína solubles estabilizados según la presente invención presentan una tasa de formación a una forma agregada no soluble, es decir, fibrillas, inferior que un oligómero no estabilizado de la α -sinucleína. Estas formas son de particular interés puesto que presentan una alta toxicidad.

15 La invención usa diversas formas de α -sinucleína. Los oligómeros de α -sinucleína usados en la invención comprenden o bien α -sinucleína humana sintética o de tipo silvestre (SEQ ID NO:1), o su(s) forma(s) mutada(s) cuyas secuencias se exponen en las SEQ ID NO:2 a 8. Estas formas mutadas de α -sinucleína humana tienen las respectivas mutaciones A30P (SEQ ID NO:2), E46K (SEQ ID NO:3), A53T (SEQ ID NO:4), A30P/E46K (SEQ ID NO:5), A30P/A53T (SEQ ID NO:6), E46K/A53T (SEQ ID NO:7) y A30P/E46K/A53T (SEQ ID NO:8).

20 SEQ ID NO:1

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH
 GVATVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

SEQ ID NO:2

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAP GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH
 GVATVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

25 SEQ ID NO:3

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKKGVVH
 GVATVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

SEQ ID NO:4

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH
 GVTTVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

SEQ ID NO:5

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAP GKTKEGVLYV GSKTKKGVVH
 GVATVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

30 SEQ ID NO:6

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAP GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH
 GVTTVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

SEQ ID NO:7

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKKGVVH
 GVTTVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

35 SEQ ID NO:8

MDVFMKGLSK AKEGVVAAA E KTKQGVAAEAP GKTKEGVLYV GSKTKKGVVH
 GVTTVAEKTK EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
 GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

Además, se pueden utilizar otras formas de α -sinucleína, con secuencias que se desvían de la secuencia tipo silvestre. Por ejemplo, una α -sinucleína tipo silvestre se puede modificar reemplazando Ser/Ala con Cys, por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio. Un ejemplo de tales es expuesto por Chang, documento US 2006/0018918 A1.

Además, los fragmentos, del terminal N, parte media y/o terminal C de la proteína α -sinucleína, se pueden usar para producir también los oligómeros de α -sinucleína estabilizados. Además, los fragmentos de α -sinucleína tipo silvestre o mutante, con una longitud de 1-10, 1-25, 1-35, 1-45, 1-79 o 1-95 aminoácidos se pueden usar en cualquier combinación para producir los oligómeros. Tales péptidos pueden corresponder, pero no se limitan, a la siguiente secuencia de número de aminoácidos 1-95, 61-140, 95-140, 95-130, 95-120, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130 y 130-140. Los fragmentos también se pueden combinar con α -sinucleína de longitud completa. Los fragmentos también se pueden ramificar o hacer circulares antes de producir los oligómeros.

Además de usar proteína recombinante o péptidos sintéticos, la α -sinucleína puede ser derivada directamente de cuerpos de Lewy presentes en el tejido cerebral humano de autopsia *post mortem* de casos con α -sinucleinopatías. Se purifican tanto fracciones de α -sinucleína solubles (es decir, preparaciones solubles en solución salina tamponada con Tris) e insolubles (es decir, preparaciones insolubles en solución salina tamponada con Tris). Estas preparaciones muestras o bien se inyectan tal cual en ratones, o se separan en fracciones por métodos cromatográficos antes de la inyección. Los anticuerpos generados se usan para el tratamiento de pacientes en un esquema de vacunación pasiva o en inmunoensayos diagnósticos como se describen a más detalle en el presente documento.

Alternativamente, la α -sinucleína se puede aislar mediante la combinación de inmunohistoquímica y microscopía de captura por láser por las cuales los cuerpos de Lewy se visualizan y se dirigen. Por ejemplo, las neuronas que contienen cuerpo de Lewy se adquieren de tejido cerebral *post mortem* que contiene α -sinucleína mediante el uso combinado de microscopía de captura por láser y sistemas de gel no desnaturalizantes. Para esta aplicación, las especies de α -sinucleína se extraen del gel de poli(acrilamida) (véase Ejemplo 3). Más específicamente, usando métodos cromatográficos y sistemas de gel no desnaturalizantes, la α -sinucleína se purifica del material de tejido capturado y se usa como preparaciones antigénicas que se inyectan en ratones para la producción de anticuerpos monoclonales. Con este planteamiento, se obtiene una respuesta inmunogénica muy diversa en los ratones, generando anticuerpos con muchas diferentes afinidades y especificidades a antígeno. A pesar de la respuesta diversa cuando se usa el último método, este planteamiento puede ser ventajoso cuando se dirige una conformación de oligómero de α -sinucleína que existe en el cerebro de pacientes con Parkinson (cuerpos de Lewy), el cual no sería tan probable de dirigir con anticuerpos dirigidos frente a α -sinucleína sintética. Estos ratones se pueden usar para obtener anticuerpos monoclonales específicos a α -sinucleína oligomérica.

Además, la α -sinucleína a usar para la inmunización de ratones y el desarrollo de anticuerpo monoclonal también se puede aislar de tejidos biológicos o fluidos tales como sangre, el fluido cerebroespinal, la orina o la saliva de individuos sanos o pacientes con α -sinucleinopatías.

La estabilización de α -sinucleína en forma oligomérica soluble se consigue por modificación estructural, o bien por entrecruzamiento del oligómero de α -sinucleína con un agente de entrecruzamiento proteico o uniendo el oligómero de α -sinucleína a un agente estabilizante. El agente estabilizante estabiliza la forma oligomérica soluble de modo que se previene la agregación adicional a la conformación de fibrilla no soluble. En una realización específica, el oligómero soluble es una protofibrilla, y en una realización más específica, la protofibrilla tiene un peso molecular de aproximadamente 2.000 kD o más.

En una realización específica, el agente estabilizante es un agente orgánico hidrófobo. En diversas realizaciones, el agente orgánico hidrófobo comprende un ácido graso saturado, insaturado, o poliinsaturado, o sus derivados, o cualquier combinación de los mismos, es decir, una combinación de dos cualquiera o más de los mismos. En realizaciones adicionales, el agente orgánico hidrófobo comprende un aldehído reactivo. El aldehído puede ser, por ejemplo, un alquenal, tal como un aldehído α,β -insaturado. Los aldehídos reactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, 4-hidroxi-2-nonenal, 4-oxo-2-nonenal (ONE), malondialdehído y acroleína. El aldehído también puede ser un dialdehído que tiene una cadena de carbono mono o poliinsaturada de 2 a 25 átomos de carbono que conectan los grupos aldehído. El agente orgánico hidrófobo estabiliza la conformación de oligómero soluble, de modo que se previene la agregación adicional a la conformación de fibrilla no soluble.

En una realización adicional, la α -sinucleína se puede modificar por detergentes hidrófobos tales como, pero no se limitan a, detergentes no iónicos y zwitteriónicos. Ejemplos de tales detergentes incluyen, pero no se limitan a, detergentes no iónicos tales como Triton X-100 (polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-feniléter), Tween-20 (monolaurato de sorbitan polioxietileno (20)), Tween-80 (monooleato de sorbitan polioxietileno (20)), y

detergentes Brij (éteres de polioxietileno de alcoholes grasos), y detergentes zwitteriónicos tales como CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato).

5 Otros agentes estabilizantes adecuados incluyen derivados de ácidos biliares, ejemplos de los cuales incluyen pero no se limitan a, colato, deoxicolato y taurocolato, y cualquier combinación de los mismos.

10 El agente estabilizante también se puede seleccionar del grupo de moléculas biológicas naturales, ejemplos de las cuales incluyen, pero no se limitan a, triglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, gangliósidos, colesterol, ésteres de colesterol, alcoholes de cadena larga (por ejemplo, que contienen aproximadamente 6 a 30 átomos de carbono), y cualquier combinación de los anteriores agentes.

15 La estabilización también se puede conseguir usando agentes de entrecruzamiento proteico tales como, pero no se limitan a, tartrato de disuccinimidilo, suberimidato de bis-sulfosuccinimidilo, propionato de 3,3-ditiobis-sulfosuccinimidilo, y cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado comprende 1-alfa-hidroxi-secosterol como agente estabilizante.

20 Los agentes estabilizantes se pueden unir a, incluyendo por entrecruzamiento, monómeros y/u oligómeros de α -sinucleína, o combinaciones de los mismos, para formar los oligómeros solubles estabilizados. Por ejemplo, un aldehído reactivo tal como HNE y/o ONE, puede unirse a los oligómeros por medio del grupo de aldehído o un enlace doble, o ambos. Lo último entonces da como resultado entrecruzamiento de los oligómeros. HNE, por ejemplo, puede unirse covalentemente a histidinas y lisinas de los oligómeros. Igualmente, ONE se puede unir covalentemente a histidinas y lisinas. Los aldehídos se pueden unir a lisina por una base Schiff, o una histidina se puede unir por un ataque nucleofílico sobre el átomo de carbono de un enlace doble en una cadena de carbono insaturada. La estequiometría entre el agente estabilizante, por ejemplo, un aldehído reactivo, tal como HNE y ONE, y la α -sinucleína se puede variar dentro de un intervalo amplio de 2:1 a 50:1 o mayor. En una realización específica, los valores de modificación de HNE por encima de 20:1, por ejemplo, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, e incluso mayores, proporcionan un producto con deseablemente alta formación de protofibrilla. Además, con ONE, se puede usar una relación incluso menor, por ejemplo, de 5:1, por ejemplo, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, e incluso mayor.

35 Si no se indica lo contrario, todos los agentes estabilizantes anteriormente mencionados imparten su efecto estabilizante uniéndose a α -sinucleína y se puede conducir la reacción estabilizante, por ejemplo, por incubación, como se ilustra en los ejemplos. Los agentes estabilizantes también se pueden usar en combinaciones de dos o más como se desee.

40 En otra realización más de la invención, los oligómeros de α -sinucleína solubles estabilizados pueden incluir uno o más de β -amiloide (A β), tau o fosfo-tau. Estos oligómeros de α -sinucleína se pueden producir combinando oligómeros de α -sinucleína con oligómeros de β -amiloide (A β), por ejemplo, protofibrillas, producidos a partir de A β 40 y/o A β 42. En otra realización más de la invención, estos oligómeros de α -sinucleína se pueden producir combinando oligómeros de α -sinucleína con protofibrillas de β -amiloide y tau y/o fosfo-tau en cualquier combinación. En otra realización, estos oligómeros de α -sinucleína se producen combinando cualquier combinación de los monómeros individuales de α -sinucleína, A β 40, A β 42, tau y/o fosfo-tau, combinando estas proteínas en sus formas de oligómero en cualquier combinación, o combinando cualquier oligómero con monómeros. Estas mezclas son ventajosas ya que los componentes adicionales se encuentran en pacientes con demencia, por ejemplo, pero no se limitan a, la variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, y por lo tanto proporcionarán neo-epítomos terapéuticamente importantes para el tratamiento con anticuerpo o vacuna de estos trastornos (Tsigelny y col., 2008). Otra ventaja es que los componentes adicionales incrementarán la estabilidad de las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína.

50 El término aislado como se usa en el presente documento se refiere al oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado que se ha separado de los medios de preparación, reactivos y similares, incluyendo el monómero de α -sinucleína y el agente estabilizante no reaccionado.

55 La invención se dirige a anticuerpos que se unen a oligómeros de α -sinucleína solubles estabilizados. El oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado se usa como antígeno para producir tales anticuerpos y optimizar el desarrollo de anticuerpos específicos frente a formas tóxicas de α -sinucleína. En estos métodos, el antígeno se administra a un animal no humano y se recogen los anticuerpos producidos frente a dicho antígeno. Para maximizar el efecto terapéutico, los anticuerpos generados frente el antígeno de α -sinucleína estabilizada según la presente invención tienen ventajosamente una alta reactividad frente a las formas naturales de α -sinucleína soluble presentes en el cuerpo, en particular las formas solubles agregadas, incluyendo protofibrillas, pero también frente al monómero de α -sinucleína soluble. Un modo de seleccionar tales anticuerpos es primero cribar los anticuerpos que se unen bien a α -sinucleína modificada y estabilizada (en particular oligómeros y específicamente protofibrillas) y, posteriormente, cribar entre estos anticuerpos los anticuerpos que se unen bien a α -sinucleína tipo silvestre.

Los anticuerpos resultantes pueden ser anticuerpos monoclonales y policlonales, o sus fragmentos activos, que se unen a oligómeros de α -sinucleína solubles estabilizados, y particularmente a α -sinucleína soluble antes de que la α -sinucleína se pueda agregar a fibrillas. En realizaciones específicas, el antígeno de oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado se puede usar en métodos tales como tecnología de hibridoma, presentación en fago, presentación en ribosoma, presentación en célula mamífera, presentación bacteriana, para producir y/o evolucionar anticuerpos monoclonales o policlonales, o fragmentos activos de los mismos. Más específicamente, para la generación de anticuerpos de α -sinucleína monoclonales, se puede emplear una técnica convencional, tal como la técnica de hibridoma y/o presentación en fago, presentación en ribosoma, presentación en célula mamífera o presentación bacteriana. Tales anticuerpos se pueden producir en roedores tales como ratón, hámster o rata. Una vez generados, los clones se aíslan y se criban por su respectiva especificidad a antígeno. Para el cribado, se usan dos principios. Primero, los anticuerpos se investigan frente a monómeros de α -sinucleína purificados, protofibrillas/oligómeros y fibrillas. Estas diferentes formas conformacionales de α -sinucleína se pueden producir incubando oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, por ejemplo, α -sinucleína modificada con HNE y/o modificada con ONE, y posteriormente separado en fracciones por HPLC o usando un dispositivo de filtro centrífugo. Las fibrillas se pueden aislar por centrifugación de la mezcla de incubación a por encima de 5.000xg (véase Ejemplo 1). El cribado se puede hacer por un ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzima (ELISA) o por métodos similares. Segundo, los anticuerpos se evalúan sobre lonchas de tejido de animales transgénicos de α -sinucleína y/o secciones de tejido cerebral humano patológico, que contienen cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy.

En realizaciones adicionales, los anticuerpos reaccionan con α -sinucleína tanto modificada como estabilizada, así como no modificada, en forma mutada o tipo silvestre de α -sinucleína soluble monomérica o agregada, o cualquier combinación de las mismas.

En una realización, el anticuerpo según la invención tiene mayor fuerza de unión a oligómeros de α -sinucleína solubles, y, en una realización más específica, a protofibrillas de α -sinucleína, particularmente en comparación con la fuerza de unión a monómeros de α -sinucleína y fibrillas insolubles. En una realización más específica, la fuerza de unión (IC_{50}) para protofibrillas de alfa-sinucleína comparadas con monómeros de α -sinucleína está, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1:50 a 2.000. En otra realización específica, la fuerza de unión (IC_{50}) para las protofibrillas de α -sinucleína comparadas con las fibrillas de alfa-sinucleína está, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1:2 a 2.000.

El anticuerpo puede ser humano, humanizado, o modificado para reducir la antigenicidad en pacientes humanos. La reducción de la antigenicidad se puede producir, por ejemplo, modificando o eliminando los epítomos de linfocito T del anticuerpo. En una realización, el anticuerpo se selecciona de la clase de IgG, o más preferiblemente de la subclase de IgG1 o IgG4 (anticuerpo humano).

En realizaciones adicionales, el anticuerpo también puede tener la actividad complemento reducida y/o las propiedades de unión al receptor de Fc alteradas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mutando la parte Fc del anticuerpo en las posiciones 297, 322 o 331 de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (humana), o los correspondientes aminoácidos en, por ejemplo, IgG de ratón. La actividad complemento reducida también se puede conseguir por desglucosilación del anticuerpo enzimáticamente o por otros medios, de acuerdo con las técnicas conocidas en la técnica. Las propiedades de unión a receptor Fc alteradas del anticuerpo se pueden conseguir alterando las estructuras de oligosacárido unidas a la glucoproteína (Jeffries, *Nature*, 2009, 8:226-234). El anticuerpo puede ser un fragmento Fab, por ejemplo, seleccionado de F(ab), F(ab)₂, y DiFabody, o un anticuerpo de cadena única, por ejemplo, seleccionado de scFv-Fc y scFab, por ejemplo, para mejorar la penetrancia de la barrera cerebral sanguínea y la absorción celular neuronal. Por lo tanto está claro que el anticuerpo como se usa en el presente documento se refiere a una proteína de longitud completa generada por el antígeno o un fragmento activo del mismo.

En realizaciones más específicas, el antígeno de oligómero de α -sinucleína se separa en fracciones y se aísla por SEC-HPLC. Las fracciones se valoran para su respectiva toxicidad en modelos de cultivo celular y las fracciones de antígeno con la toxicidad más fuerte se seleccionan como antígenos para la producción de anticuerpo o como antígenos para la inmunización activa. Las preparaciones muestras también se pueden usar directamente para valorar la toxicidad y las muestras que muestran la toxicidad más pronunciada se pueden usar ventajosamente como antígeno para la selección y/o producción de anticuerpo o como antígenos para la inmunización activa.

Los anticuerpos de α -sinucleína se pueden formar como respuesta a la administración del oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado según la presente invención a un roedor, por ejemplo, un ratón o un conejo, para generar los anticuerpos monoclonales o policlonales frente al antígeno, los cuales se aplican en un protocolo de inmunización pasiva para tratar los trastornos neurodegenerativos con patología de α -sinucleína, por ejemplo, EP y DCL, por mencionar algunos. Los anticuerpos se pueden humanizar antes de administrarse a un paciente humano.

La toxicidad de las formas agregadas de α -sinucleína se pueden determinar por diversos ensayos de toxicidad celular (véase las Figuras 2 a 3 y el Ejemplo 5). En resumen, un modelo de cultivo celular se basa en la valoración de MTT, una medida de la disfunción mitocondrial. También se pueden usar otros ensayos de toxicidad, por ejemplo, medir la muerte celular o los marcadores apoptóticos. Ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, análisis de adenilato quinasa, análisis de lactato deshidrogenasa, tinción con anexina-V, actividad de la caspasa, escisión de PARP y escalonamiento de ADN.

Después de un protocolo de inmunización pasiva, los anticuerpos monoclonales o policlonales frente a especies de α -sinucleína con toxicidad pronunciada, en particular α -sinucleína protofibrilar soluble y otra oligomérica y monómero de α -sinucleína, ejercen su efecto sobre las inyecciones repetidas de los anticuerpos.

En una realización alterna, el anticuerpo que se une a α -sinucleína soluble puede ser anticuerpos monoclonales anti- α -sinucleína humanos derivados de glóbulos blancos de sujetos humanos control o pacientes con α -sinucleinopatías. Los hibridomas se pueden producir a partir de glóbulos blancos según las técnicas establecidas y cribados para aglutinantes a α -sinucleína y α -sinucleína estabilizada (por ejemplo, oligómeros solubles). Los anticuerpos monoclonales anti- α -sinucleína humanos también se pueden obtener por cribado de una genoteca de anticuerpo humano para la unión a α -sinucleína estabilizada (por ejemplo, oligómeros solubles). Los autoanticuerpos frente a α -sinucleína soluble o protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína presentes en la sangre de sujetos control humanos o pacientes con α -sinucleinopatías también se pueden aislar para su uso. Estos autoanticuerpos se pueden secuenciar y producir por tecnología de ADN recombinante en, por ejemplo, células CHO para mejorar la producción y la economía.

En una realización específica, el anticuerpo descrito se proporciona en una composición, por ejemplo, adecuada para la administración. Tales composiciones pueden comprender un anticuerpo como se describe en el presente documento y uno o más excipientes convencionalmente empleados en las composiciones farmacéuticas. El anticuerpo se incluirá en una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización específica, las composiciones comprenden el anticuerpo en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg, o más específicamente, aproximadamente 0,5 a 2 mg/kg, de peso corporal del receptor deseado.

Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, uno o más agentes antibacterianos, adyuvantes, tampones, sales, reguladores de pH, detergentes, o cualquier combinación de los mismos, siempre y cuando tales excipientes sean farmacéuticamente aceptables para uso humano y/o veterinario, dependiendo del receptor deseado. La composición se puede liofilizar, por ejemplo, solo o junto con un excipiente para incrementar la estabilidad del anticuerpo durante y/o después de la liofilización. El manitol y/o la trehalosa son ejemplos no limitantes de excipientes adecuados para la liofilización.

Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar en uno o más métodos para prevenir, retrasar una aparición de, o tratar un trastorno relacionado con α -sinucleína en un individuo. Tales métodos comprenden administrar un anticuerpo o vacuna como se describe en el presente documento al individuo. El individuo es, por ejemplo, un sujeto sospechoso de haber adquirido o tener un riesgo incrementado de adquirir un trastorno relacionado con α -sinucleína. Un sujeto podría ser sospechoso de tener tal trastorno al presentar cualquiera de las siguientes características: síntomas de enfermedad prematuros, resultados de escaneo cerebral positivos, y/o niveles incrementados de α -sinucleína u oligómeros de α -sinucleína (por ejemplo, determinado utilizando los anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo, en un método de detección como se describe en el presente documento). Ejemplos de métodos de escaneo cerebral incluyen, pero no se limitan a, DaTscan (^{123}I -ioflupano), o escaneo por tomografía de emisión de positrón (PET) usando un anticuerpo monoclonal como se describe en el presente documento.

Al identificar los sujetos en riesgo de o sospechosos de tener un trastorno relacionado con α -sinucleína, se previene el desarrollo adicional del trastorno o se retrasa la aparición o progresión mediante los tratamientos inventivos descritos en el presente documento, es decir, usando inmunización pasiva con los anticuerpos de la invención. El trastorno relacionado con α -sinucleína puede ser la enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia sistémica múltiple (ASM) u otro trastorno neurodegenerativo con patología de α -sinucleína, incluyendo otros trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, insomnio hereditario mortal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y trastornos tipo esquizofrenia.

Los anticuerpos de la invención descritos en el presente documento también se pueden usar en métodos de detección, un ejemplo específico de los cuales incluye inmunoensayos diagnósticos en los que los anticuerpos se usan para detectar niveles alterados de las especies de α -sinucleína *in vitro* o *in vivo*. Los niveles de las formas dirigidas de α -sinucleína se pueden cambiar específicamente en diferentes tejidos y fluidos corporales de pacientes con diferentes α -sinucleinopatías u otros trastornos neurodegenerativos y así servir como marcadores bioquímicos prematuros para la enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante de cuerpo de Lewy de la

enfermedad de Alzheimer, atrofia sistémica múltiple (ASM) u otros trastornos neurodegenerativos con patología de α -sinucleína.

5 Más específicamente, un método de detección de oligómeros de α -sinucleína *in vitro* comprende añadir el anticuerpo según la invención a una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende α -sinucleína soluble, y detectar y medir una concentración de cualquier complejo formado entre el anticuerpo y la α -sinucleína soluble. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, plasma, fluido cerebroespinal (FCE) o una biopsia de cerebro. Un método de detección de oligómeros de α -sinucleína *in vivo* comprende administrar un anticuerpo según la presente invención, estando dicho anticuerpo marcado con un marcador detectable, a un individuo sospechoso de portar niveles
10 oligoméricos o especies de α -sinucleína solubles enfermos en el cerebro, y detectar la presencia de cualquier complejo formado entre el anticuerpo y la α -sinucleína soluble mediante la detección del marcador.

15 Para la marcación del anticuerpo específico a oligómero, un experto en la técnica reconocerá que se pueden usar diversas técnicas alternativas, dependiendo de la elección del método de detección, por ejemplo, ligandos radioactivos tales como ^{131}I , ^{14}C , ^3H o ^{58}Ga , por mencionar algunos. En particular, se cree que PET con un anticuerpo específico a oligómero radiomarcado es de mayor importancia para diagnóstico, seguimiento de terapia, y/o similares. Por consiguiente, la invención proporciona anticuerpos que se marcan fácilmente por un experto en la técnica usando técnicas convencionales, para su uso en diversos métodos para diagnóstico y seguimiento de terapia.

20 De acuerdo con los métodos y las técnicas descritas, se pueden evaluar el potencial terapéutico de los antígenos y los anticuerpos descritos en el presente documento en modelos de cultivo celular y/o modelos de animal transgénico para patología de α -sinucleína. Se pueden usar ejemplos de dos modelos de cultivo celular para α -sinucleinopatía. En primer lugar, las formas tipo silvestre o mutantes del ADN de α -sinucleína se someten a transfección a células de neuroblastoma o neuroglioma. Las transfecciones tanto transitorias como estables se realizan sobre células que están diferenciadas a una morfología tipo neurona por ácido retinoico. De este modo, es posible inducir la formación de agregados de α -sinucleína intracelulares. En segundo lugar, un virus lenti- y/o adenoasociado (VAA) que porta vector de ADN de α -sinucleína se somete a transducción sobre cultivos de neuroblastoma, neuroglioma y/o cultivos de célula de riñón embrionario. La transducción con vectores víricos es ventajosa para las técnicas de transfección tradicionales ya que es generalmente más eficaz, permitiendo que más células formen agregados de α -sinucleína.

25 Los anticuerpos de α -sinucleína generados también se pueden utilizar en ensayos inmunobasados para la medición de los niveles de α -sinucleína (en particular protofibrilla/oligómero) en muestras de paciente para diagnosticar EP, DCL u otras α -sinucleinopatías. Los métodos de detección aplicados en la prueba diagnóstica se basan principalmente en inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzima (ELISA) y/o transferencia Western.
30 Se investigan los niveles de protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína, u otras formas de α -sinucleína soluble conformacionalmente alterada en un amplio rango de tejidos de pacientes con señales prematuras de α -sinucleinopatía o individuos con un alto riesgo de desarrollar estos trastornos. Tales tejidos incluyen, pero no se limitan a, plasma, fluido cerebroespinal (FCE) y biopsias cerebrales.

40 Diversos aspectos de la invención se ilustran en los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

45 Ejemplo 1. Cinéticas de agregación de formas tipo silvestre y mutadas de α -sinucleína

El efecto de las diferentes mutaciones de α -sinucleína se investiga *in vitro*. Además de la α -sinucleína tipo silvestre, se estudian los siguientes mutantes: A30P, E46K, A53T y A30P/A53T, A30P/E46K, E46K/A53T y A30P/E46K/A53T. La α -sinucleína recombinante se expresa usando el sistema IMPACT (Purificación mediada por inteína con un marcador de unión a quitina por afinidad, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), según las instrucciones del fabricante. Todas las proteínas recombinantes se disuelven en tampón Tris, o tampón fosfato, oscilando en
50 concentración entre 10 mM y 50 mM con o sin NaCl oscilando en concentración entre 0,05 M y 0,3 M. Todas las proteínas de α -sinucleína recombinantes se almacenan a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ antes de su uso.

55 Para estudios adicionales, las proteínas recombinantes se disuelven en tampón de acetato de sodio o de citrato dentro del intervalo de pH de 3 a 6, con o sin NaCl en la concentración entre 0,05 M y 0,3 M. Las concentraciones proteicas iniciales varían de 35 μM a 750 μM y son similares para todos los tipos de especies de α -sinucleína en cada experimento. En algunos experimentos, se añade tioflavina T (5 a 20 μM) a la mezcla de reacción inicial con una concentración de α -sinucleína final de 10 μM .

60 Cuando se estudia las cinéticas de agregación, las preparaciones de α -sinucleína se guardan en una placa de 96 pocillos de polipropileno de fondo plano o redondo (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania), o una placa de 96 pocillos de poliestireno de no unión de fondo plano (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) y se incuban entre 4 $^\circ\text{C}$ y 65 $^\circ\text{C}$ con o sin agitación. En los mismos experimentos, los microtubos de polipropileno (500 a 2.000 μl), no cubiertos o cubiertos con silicio, se incuban entre 4 $^\circ\text{C}$ y 65 $^\circ\text{C}$ con o sin agitación. Para estudios cuando se usa

agitación, se incuban o bien una placa de 96 pocillos de polipropileno, o un microtubo colocado horizontalmente (500 a 2.000 μ l) en un agitador orbital P4 Labnet (Labnet, Edison, NJ, USA) o un Titramax 101 (Heidolph Instruments GMBH & Co.KG, Schwabach, Alemania) con la velocidad que varía entre 300 rpm y 900 rpm. En todos los estudios de agregación se usa un volumen final de 100 a 300 μ l por pocillo. En los experimentos de agregación en los que se usa un microtubo, el volumen final oscila de 100 a 2.000 μ l. Para las mediciones de ThT, la placas de 96 pocillos de poliestireno o polipropileno se leen en un Wallac Victor 2 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), equipado con un filtro de excitación de 445 nm y un filtro de emisión de 485 nm. Los resultados de α -sinucleína que presentan algunas de estas mutaciones se muestran en la Figura 1.

10 Ejemplo 2. Síntesis de protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína

Para producir antígeno protofibrilar/oligomérico de α -sinucleína (es decir, protofibrillas y otros oligómeros que contienen el antígeno), se usa la respectiva α -sinucleína tipo silvestre, mutada o fragmentada, como se describió anteriormente, en una concentración de 35 a 750 μ M. En muestras en las que la α -sinucleína se ha conjugado con HNE y/o ONE (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), estos compuestos se usan a una concentración de 0,01 a 65 nM. En un experimento típico, la relación molar entre HNE y/o ONE y α -sinucleína oscila entre 1:1 y 100:1, pero la proporción de los respectivos compuestos no está limitada a esta estequiometría. En ciertos experimentos, el borohidruro de sodio (NaBH_4) se usa a concentración de 0,1 a 100 mM para reducir las muestras modificadas con HNE y/o modificadas con ONE. En algunos casos, el aminoácido de α -sinucleína puede contener aminoácidos (tales como lisina) que durante las modificaciones con HNE forman una base Schiff inestable y reversible que se une con HNE. En otro caso, el aminoácido de α -sinucleína puede contener aminoácidos (tales como lisina) que durante la modificación con ONE forman una base Schiff inestable y reversible que se une con ONE. La reducción de borohidruro de sodio estabiliza la unión de la base Schiff. Las muestras se incuban a 37 °C con o sin agitación durante 30 minutos hasta 30 días. Para verificar la composición molecular de las muestras, se utilizan varios métodos. La α -sinucleína no modificada o la α -sinucleína modificada con HNE y/o modificada con ONE o α -sinucleína modificada con otros aldehídos reactivos, se centrifugan a 16.900xg durante cinco min a 21 °C para separar cualquier fibrilla insoluble. Posteriormente el sobrenadante se separa en fracciones usando un sistema de SEC-HPLC con detección UV entre 214 nm y 280 nm (descrito en detalle más adelante) para aislar los oligómeros y monómeros de protofibrilla de α -sinucleína. En otro experimento, las protofibrillas/oligómeros y monómeros de α -sinucleína se separan usando un dispositivo de filtro centrífugo con un corte molecular entre 5 a 1.000 kDa. En un experimento típico, las muestras, 500 μ l de α -sinucleína modificada con HNE y/o ONE, se centrifugan usando o bien un dispositivo de filtro centrífugo Microcon (Millipore, Billerica, MA) o un dispositivo centrífugo Vivaspin500 (Sartorius, Goettingen, Alemania) con un valor de corte de 100 kDa. Las muestras se centrifugan a una velocidad que varía entre 1.000 a 15.000xg durante 5 a 30 min y se recoge el retenido y contiene la mayoría de las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína.

α -sinucleína modificada con HNE

En un experimento típico se incubaba α -sinucleína tipo silvestre humana 140 μ M con HNE 5,6 mM (es decir, con una relación de 40:1 entre HNE y α -sinucleína) durante 20 horas a 37 °C después de lo cual el exceso de HNE no unido se separa usando o bien columnas de centrifugación desalación Zeba (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), dispositivo centrífugo Vivaspin500 (Sartorius, Goettingen, Alemania) o un dispositivo de filtro centrífugo Microcon (Millipore, Billerica, MA) según las instrucciones del fabricante. Después de esta etapa de modificación con HNE inicial, las muestras se analizan directamente. Antes del análisis con SEC-HPLC, todas las muestras se someten a centrifugación a 16.900xg durante 5 min a 22 °C y solamente la fracción soluble se analiza por SEC-HPLC usando una columna Superose 6 PC3.2/30. Las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína eluyen en un pico a 19 min mientras que los monómeros de α -sinucleína eluyen a 37 min. (Figura 4).

α -sinucleína modificada con ONE

En un experimento típico se incubaba α -sinucleína tipo silvestre humana (140 μ M) con ONE 4,2 mM (es decir, con una relación de 40:1 entre ONE y α -sinucleína) durante 20 horas a 37 °C y el exceso de ONE no unido se separa usando o bien columnas de centrifugación desalación Zeba (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), dispositivo centrífugo Vivaspin500 (Sartorius, Goettingen, Alemania) o un dispositivo de filtro centrífugo Microcon (Millipore, Billerica, MA) según las instrucciones del fabricante. Antes del análisis con SEC-HPLC, todas las muestras se someten a centrifugación a 16.900xg durante 5 min a 22 °C y solamente la fracción soluble se analiza por SEC-HPLC usando una columna Superose 6 PC3.2/30. Las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína eluyen como el pico principal a 20 min mientras que los monómeros de α -sinucleína eluyen a 37 min. (Figura 5).

α -sinucleína modificada con HNE y ONE

En un experimento típico se incubaba α -sinucleína tipo silvestre humana (140 μ M) con HNE 4,2 mM y ONE 4,2 mM durante 20 horas a 37 °C y el exceso de HNE y ONE no unido se separa usando columnas de centrifugación desalación Zeba (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), dispositivo centrífugo Vivaspin500 (Sartorius, Goettingen, Alemania) o un dispositivo de filtro centrífugo Microcon (Millipore, Billerica, MA) según las instrucciones del fabricante. Todas las

muestras se someten a centrifugación a 16.900xg durante 5 min a 22 °C y solamente la fracción soluble se analiza por SEC-HPLC usando una columna Superose 6 PC3.2/30.

Ejemplo 3. Separación por HPLC de especies de α -sinucleína

5 Para aislar las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína, monómeros y fibrillas, la α -sinucleína se incubaba como se describió anteriormente. Se usa un sistema de HPLC Merck Hitachi D-7000 LaChrom, que tiene un modelo detector de matriz de diodo L-7455, un automuestreador modelo L-7200 y una bomba modelo L-7100, acoplado a una columna Superdex 75 PC3.2/30, Superdex 200 PC3.2/30 o Superose 6 PC3.2/30 (GE Healthcare, Uppsala, Suiza), para la separación cromatográfica y análisis de pureza. Las muestras se eluyen a caudales que varían entre 0,02 ml/min y 0,08 ml/min usando o bien Tris 20 a 50 mM pH 6,0 a 8,0, NaCl 0,15 M o fosfato de sodio 20 a 50 mM pH 6,0 a 8,0, NaCl 0,15 M. Alternativamente, se usa un sistema de HPLC Hitachi LaChrome Elite, que tiene una bomba modelo L-2130, un detector de matriz de diodo modelo L-7450, un automuestreador L-2200, acoplado a una Superose 6 10/300 GL, una Superdex 200 100/300 GL o una Superdex 75 100/300 GL. Las muestras se eluyen a caudales que varían entre 0,1 ml/min y 0,5 ml/min usando o bien Tris 20 a 50 mM pH 6,0 a 8,0, NaCl 0,15 M o fosfato de sodio 20 a 50 mM pH 6,0 a 8,0, NaCl 0,15 M. Además, las muestras se pueden eluir con un tampón de acetato de sodio o tampón de citrato de sodio con un pH entre 3 y 6 con NaCl 0,15 M. En algunos análisis por SEC-HPLC, se añade Tween-20 al 0,1 % a 2,0 % o Tween-80 al tampón de elución para reducir la adherencia no específica de oligómeros de protofibrilla de α -sinucleína a la matriz de la columna. Los cromatogramas se obtienen midiendo la absorbancia de UV entre 214 nm y 280 nm. Las fracciones de 20 a 100 μ l se recogen sobre un Advantec SF-3120 (Advantec, Kashiwa, Japón), colector de fracción. Las fracciones de 50 a 500 μ l también se pueden recoger sobre un colector de fracción Bio-Rad modelo 2128 (Bio-Rad, Hercules, CA). Los patrones de peso molecular globular se usan para obtener una curva patrón, a partir de la cual se correlacionan los tiempos de retención de las diversas especies de α -sinucleína con el peso molecular.

Ejemplo 4. Caracterización de protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína

Para caracterizar más la morfología de las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína aislados, se realizan microscopía de crioelectrones y microscopía de fuerza atómica (AFM). Las alícuotas proteicas de 1 a 100 μ l se diluyen a una concentración final que varía entre 10 μ M y 350 μ M, se añaden a una superficie de mica o una superficie HOPG (Veeco instruments SAS, Dourdan cedex, Francia) y se analizan según los protocolos estándar. El análisis por AFM de las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína modificada con HNE revela una población heterogénea de estructuras tanto de tipo anillo como más lineales y redondas que varían en diámetro entre 50 a 300 nm. Por ejemplo, se pueden observar especies moleculares anulares con una estructura tipo anillo con un diámetro entre 50 a 300 nm (Figura 6). El análisis por AFM de α -sinucleína modificada con ONE revela estructuras amorfas con un diámetro de aproximadamente 30 a 150 nm de ancho (Figura 7).

Ejemplo 5. Evaluación de toxicidad de α -sinucleína

40 El efecto de la α -sinucleína no modificada agregada *in vitro* y el oligómero de α -sinucleína modificada con HNE y/o ONE se analiza sobre un modelo de cultivo celular utilizando el ensayo de viabilidad por MTT comúnmente usado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los tipos celulares usados en el estudio incluyen células HEK-293, SH-SY5Y y células H4. Otros ensayos que miden la muerte celular y los marcadores apoptóticos usados en el estudio incluyen ToxiLight (Lonza, Basel, Suiza) y el ensayo de lactato deshidrogenasa (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). La α -sinucleína tipo silvestre se compara con los siguientes mutantes: A30P, E46K, A53T, A30P/E46K, A30P/A53T, A30P/E46K y A30P/E46K/A53T. Las células se cultivan en DMEM (Invitrogen, La Jolla, CA, USA) complementado con 10 % de suero bovino fetal (Cambrex, Charles City, IA, USA). En un tipo de experimento, las células se guardan en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 %. El día antes de empezar el ensayo de toxicidad, se siembran las células HEK-293 en placas cubiertas con poliestireno de 96 pocillos (Sarstedt, NC, USA) con una densidad de 10.000 células/pocillo. A continuación, los medios celulares se separan y las células se tratan con formas agregadas de α -sinucleína no modificada diluida en medios acondicionados frescos a una concentración final que oscila de 3 μ M a 6 μ M. En otro conjunto de experimentos el oligómero de α -sinucleína modificada con ONE y/o HNE se diluye en medios acondicionados frescos a una concentración final que oscila de 3 μ M a 6 μ M. Después de 48 horas de incubación, MTT, diluido en solución salina tamponada con fosfato (Invitrogen, La Jolla, CA, USA), se añade a células a una concentración final de 35 μ M. Después de 4,5 horas de incubación, las células se tratan con una mezcla de DMF al 50 % y SDS al 20 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y la mezcla se incubaba durante unas 24 horas adicionales. Finalmente, para la medición del sustrato metabolizado, se usa un espectrofotómetro Spectra Max 190 (Molecular Devices Corporation, CA, USA) y la detección se lleva a cabo a 570 nm.

Ejemplo 6. Anticuerpos de α -sinucleína en ratones inmunizados con protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína

Inmunización/Anticuerpos policlonales

En el esquema de inmunización se utilizan ratones Balb/C. Para la primera inmunización, los ratones se inyectan con 50 μ l de adyuvante completo de Freund y 50 μ l de preparaciones protofibrilares/de oligómero de α -sinucleína

modificada con HNE y/o modificada con ONE (concentración final 35 μ M). Para las inmunizaciones iniciales (por ejemplo, 3 a 6 veces) los ratones se inyectan con 50 μ l de adyuvante incompleto de Freund y 50 μ l de preparaciones protofibrilares/de oligómero de α -sinucleína modificada con HNE y/o modificada con ONE (concentración final de 35 μ M). Para posteriores inmunizaciones (por ejemplo, 1 a 3 veces) los ratones se inyectan con 50 μ l de preparaciones protofibrilares/de oligómero de α -sinucleína modificada con HNE y/o modificada con ONE (concentración final 35 μ M) diluidas en solución salina tamponada con Tris o solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Dos inyecciones de refuerzo, que contienen 50 μ l de preparaciones protofibrilares/oligoméricas de α -sinucleína modificada con HNE y/o modificada con ONE (concentración final 70 μ M), se llevan a cabo antes de que se sacrifiquen los ratones.

Se analiza la reactividad hacia protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína modificada con HNE (Figura 8) y modificada con ONE (Figura 9) en la sangre de los ratones inmunizados. La especificidad de la respuesta del anticuerpo policlonal se analiza por ELISA. En un experimento típico, se cubre una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de alta unión de fondo plano con α -sinucleína monomérica (no modificada o modificada con HNE y/o ONE, u otros aldehídos), α -sinucleína protofibrilar/oligomérica (no modificada o modificada con HNE y/o ONE, u otros aldehídos) o α -sinucleína fibrilar a una concentración final de 400 ng/pocillo. Los pocillos se bloquean con BSA al 2 %, se lavan con Tween-20 /PBS al 0,05 % y los sobrenadantes de los medios celulares (no diluidos o diluidos 1:1 con solución salina tamponada con fosfato) de los anticuerpos policlonales investigados se añaden a los pocillos como anticuerpos primarios. Se usa anticuerpo de cabra anti-IgG/IgM de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) como el anticuerpo secundario a una dilución de 1/1.000. La inmunoreactividad se visualiza usando p-nitrofenil-fosfato (Sigma-Aldrich, MO, USA).

En el suero, se detectan los anticuerpos que reconocen específicamente las protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína (Figuras 8 y 9).

Hibridoma/anticuerpos monoclonales

Se aíslan células de bazo y se muelen en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) y se centrifugan a 1.200xg durante 10 min para recoger un sedimento rico en célula. Además las células se lavan con PBS y se centrifugan a 1.200xg durante 10 min. El sedimento celular se resuspende en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM, Invitrogen, La Jolla, CA, USA) complementado con antibióticos al 1 %. Las células de bazo se mezclan a una relación de 1:1 con células Sp2/0 (línea celular de mieloma de ratón) en DMEM. Para facilitar la fusión celular, se añade 1 ml de polietilenglicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a la mezcla celular y la reacción se para con la adición de DMEM. Las células se recogen y el sedimento se resuspende en DMEM complementado con suero fetal bovino al 10 % (v/v) (Cambrex, Charles City, IA, USA) y que también que contiene piruvato de sodio al 1 % (v/v) (Cambrex, Charles City, IA, USA), antibióticos al 1 % (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y L-glutamina al 1 % (v/v) (Cambrex, Charles City, IA, USA). Después de la centrifugación, se resuspende el sedimento celular final. Para investigar los anticuerpos producidos por los hibridomas generados, se usa un protocolo ELISA. En un experimento típico, se cubre una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de alta unión de fondo plano con α -sinucleína monomérica (no modificada o modificada con HNE y/o ONE, u otros aldehídos), α -sinucleína oligomérica/protofibrilar (no modificada o modificada con HNE y/o ONE, u otros aldehídos) o α -sinucleína fibrilar a una concentración final de 400 ng/pocillo. Los pocillos se bloquean con BSA al 2 %, se lavan con Tween-20/PBS al 0,05 % y los sobrenadantes de los medios celulares (no diluidos o diluidos 1:1 con solución salina tamponada con fosfato) del hibridoma investigado se añaden a los pocillos como anticuerpos primarios. Se usa anticuerpo de cabra anti-IgG/IgM de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) como el anticuerpo secundario a una dilución de 1/5.000. La inmunoreactividad se visualiza usando un sustrato K-Blue® aumentado (TMB) y la reacción se para con H₂SO₄ 2 M. El DMEM complementado con suero fetal bovino al 10 % y que también contiene medios de la condición BM al 5 % (v/v) (Roche Diagnostics Scandinavia, Bromma, Suecia) y complemento de medios HAT al 2 % (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y las células se colocan en placas de cultivo celular de 96 pocillos.

Los hibridomas se generaron inyectando preparaciones protofibrilares/de oligómero de α -sinucleína modifica con ONE como se describió previamente. Específicamente, el hibridoma 40:2 reconoció una preparación protofibrilar/de oligómero de α -sinucleína modificada con ONE en un protocolo de ELISA. Se diluyó el sobrenadante de los medios celulares del hibridoma 40:2 a 1/9, 1/27 y 1/82 y se analizó como se describió anteriormente sobre una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de alta unión de fondo plano cubierta con 400 ng/pocillo de protofibrillas/oligómeros de α -sinucleína modificada con ONE (Figura 10).

Los ejemplos específicos y realizaciones descritos en el presente documento son solamente ilustrativos de por sí y no pretenden ser limitantes de la invención definida por las reivindicaciones. Realizaciones y ejemplos adicionales, y ventajas de los mismos, serán aparentes para un experto en la técnica en vista de esta memoria y están dentro del alcance de la invención reivindicada.

Referencias

- Bieschke, J., y col. 2006. "Small molecule oxidation products trigger disease-associated protein misfolding". *Acc. Chem. Res.* 39, 611-619.
- 5 Chartier-Harlin, MC., y col. 2004. "Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease". *Lancet* 1, 364,1.167-9.
- Conway, K., y col., 2000. "Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 571-576.
- 10 El-Agnaf, O.M., y col., 2006. "Detection of oligomeric forms of α -synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease". *Faseb J.* 20, 419-425.
- Hansen, L, y col., 1990. "The Lewy body variant of Alzheimer's disease. A clinical and pathologic entity". *Neurology* 40, 1-8.
- Jeffries, R. 2009 "Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics". *Nature* 8, 226-234.
- 15 Klucken, J., y col., 2006. "Clinical and biochemical correlates of insoluble α -synuclein in dementia with Lewy bodies". *Acta Neuropathol (Berl)* 111, 101-108.
- Kruger, R. y col, 1998. "Ala30Pro mutation in the gene encoding a α -synuclein in Parkinson's disease". *Nat. Genet.* 18, 106-108.
- Näsström, T y col., 2009. "The lipid peroxidation metabolite 4-oxo-2-nonenal cross-links α -synuclein causing rapid formation of stable oligomers". *Biochem. Biophys. Res. Commun* 378, 872-876.
- 20 Polymeropoulos, M.H., y col., 1997. "Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease". *Science* 276, 2045-47.
- Qin, Z., y col., 2007. "Effect of 4-hydroxy-2-nonenal modification on α -synuclein aggregation". *J. Biol. Chem.* 282, 5.862-5.870.
- 25 Shamoto-Nagai, M., y col., 2007. "In parkinsonian substantia nigra, α -synuclein is modified by acrolein, a lipidperoxidation product, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome activity". *J. Neural. Transm* 144, 1.559-1.567.
- Singleton, AB., y col., 2003. "alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease". *Science* 302:841.
- Tsigelny, IF., y col., ."Mechanism of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's Diseases."
- 30 *PloS ONE* Septiembre 2008, vol. 3 artículo 9, e3135, p1-15 www.plosone.org
- Yoritaka, A., y col., 1996. "Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2.696-2.701.
- Zarranz, J., y col., 2004. "The new mutation, E46K, of α -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia". *Ann. Neurol.* 55, 164-173.
- 35

Listado de secuencias

- 40 <110> HioArlie AH
- <120> Anticuerpos y vacunas para su uso en métodos terapéuticos y diagnósticos para trastornos relacionados con alfa-sinucleína
- 45 <130> 4007579-178274
- <150> US 61/048,865
- <151> 29-04-2008
- 50 <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 140
- 55 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 709 048 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 140
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

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

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

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

10

ES 2 709 048 T3

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 140
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 4
<211> 140
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 4

ES 2 709 048 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 140
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

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

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Pro Gly Lys

5

10

ES 2 709 048 T3

20 25 30
 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Lys Gly Val
 35 40 45
 Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
 50 55 60
 Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
 65 70 75 80
 Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
 85 90 95
 Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
 100 105 110
 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
 115 120 125
 Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 130 135 140

<210> 6
 <211> 140
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

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

10

ES 2 709 048 T3

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

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

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

5 <210> 7
<211> 140
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

15 <210> 8
<211> 140
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

ES 2 709 048 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un medicamento para su uso en el tratamiento de y/o para retrasar la aparición de un trastorno relacionado con α -sinucleína en un individuo, en donde el trastorno relacionado con α -sinucleína se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y/o neuritas de Lewy, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, atrofia sistémica múltiple (ASM), otras enfermedades con patología de cuerpos de Lewy, síndrome de la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, kuru, insomnio hereditario mortal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y enfermedades tipo esquizofrenia, comprendiendo el medicamento un anticuerpo producido a partir de un oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, y capaz de unirse a un oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, teniendo el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado una tasa de formación a una forma agregada no soluble inferior que un oligómero soluble no estabilizado de la α -sinucleína, en donde el oligómero de α -sinucleína comprende α -sinucleína de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:1 a 8, y en donde el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado se estabiliza mediante entrecruzamiento con un agente de entrecruzamiento proteico o uniéndose a un agente estabilizante.
2. El medicamento para su uso según la reivindicación 1, en donde el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado comprende protofibrilla de α -sinucleína soluble estabilizada.
3. El medicamento para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el trastorno relacionado con α -sinucleína se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y/o neuritas de Lewy, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, atrofia sistémica múltiple (ASM), otras enfermedades con patología de cuerpos de Lewy, y síndrome de enfermedad de Alzheimer.
4. El medicamento para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el trastorno relacionado con α -sinucleína es la enfermedad de Parkinson.
5. El medicamento para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo es capaz de unirse a oligómeros de α -sinucleína solubles tipo silvestre.
6. El medicamento para su uso según la reivindicación 5, en donde el anticuerpo tiene mayor fuerza de unión a oligómeros de α -sinucleína solubles en comparación con la fuerza de unión a monómeros de α -sinucleína y fibrillas insolubles.
7. El medicamento para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se ha recogido de un animal no humano al cual se ha administrado el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado.
8. El medicamento para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se ha producido por tecnología de hibridoma, presentación en fago, presentación en ribosoma, presentación en célula mamífera o presentación bacteriana.
9. El medicamento para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo es monoclonal.
10. El medicamento para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo es humano, humanizado o modificado para reducir antigenicidad en seres humanos.
11. El medicamento para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado comprende una protofibrilla de α -sinucleína modificada con un agente orgánico hidrófobo que comprende un aldehído, un ácido graso saturado, insaturado o poliinsaturado, o una combinación de los mismos, un detergente no iónico o un detergente zwitteriónico, o cualquier combinación de los mismos, al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en triglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, gangliósidos, colesterol, ésteres de colesterol, alcoholes de cadena larga, y cualquier combinación de los mismos, o un derivado de ácido biliar seleccionado del grupo que consiste en deoxicolato, colato y taurocolato, y cualquier combinación de los mismos, o la protofibrilla de α -sinucleína estabilizada comprende una protofibrilla de α -sinucleína modificada con 1- α -hidroxiseosterol o entrecruzada con al menos un agente de entrecruzamiento proteico seleccionado del grupo que consiste en tartrato de disuccinimidilo, suberimidato de bis-sulfosuccinimidilo y propionato de 3,3-ditiobis-sulfosuccinimidilo, y cualquier combinación de los mismos.
12. Un anticuerpo, capaz de unirse a un oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, teniendo el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado una tasa de formación a una forma agregada no soluble inferior que un oligómero soluble no estabilizado de la α -sinucleína, en donde el anticuerpo se produce del oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, en donde el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado comprende α -sinucleína de una secuencia

seleccionada de las SEQ ID NO:1 a 8, y en donde el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado se estabiliza por entrecruzamiento con un agente de entrecruzamiento proteico o por unión a un agente estabilizante.

5 13. El medicamento para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el anticuerpo de la reivindicación 12, en donde el anticuerpo es capaz de unirse a una protofibrilla de α -sinucleína estabilizada que tiene un peso molecular de 2.000 Da.

10 14. El medicamento para su uso según la reivindicación 11 o la reivindicación 13, o el anticuerpo según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde la protofibrilla de α -sinucleína estabilizada comprende una protofibrilla de α -sinucleína modificada con un agente orgánico hidrófobo seleccionado del grupo que consiste en 4-hidroxi-2-nonenal, malondialdehído, 4-oxo-2-nonenal y acroleína, y cualquier combinación de los mismos.

15 15. Un método de detección de α -sinucleína soluble *in vitro*, que comprende añadir el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 a una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende α -sinucleína soluble; y detectar y medir una concentración de cualquier complejo formado entre el anticuerpo y la α -sinucleína soluble.

20 16. Un método de producción de un anticuerpo para retrasar una aparición de o para el tratamiento de un trastorno relacionado con α -sinucleína en un individuo, en donde el trastorno relacionado con α -sinucleína se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y/o neuritas de Lewy, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, atrofia sistémica múltiple (ASM), otras enfermedades con patología de cuerpos de Lewy, síndrome de la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, enfermedad de Huntington, enfermedad priónica, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, kuru, insomnio hereditario mortal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y trastornos tipo esquizofrenia, y en donde el anticuerpo o su fragmento se une a un oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado, teniendo el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado una tasa de formación a una forma agregada no soluble inferior que un oligómero soluble no estabilizado de la α -sinucleína, comprendiendo el método administrar un antígeno a un animal no humano; y recoger el anticuerpo formado frente al antígeno, comprendiendo el antígeno un oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado que tiene una tasa de formación a una forma agregada no soluble inferior que un oligómero soluble no estabilizado de la α -sinucleína, en donde el oligómero de α -sinucleína comprende α -sinucleína de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:1 a 8, y en donde el oligómero de α -sinucleína soluble estabilizado se estabiliza mediante entrecruzamiento con un agente de entrecruzamiento proteico o uniéndose a un agente estabilizante.

30

Fig. 1

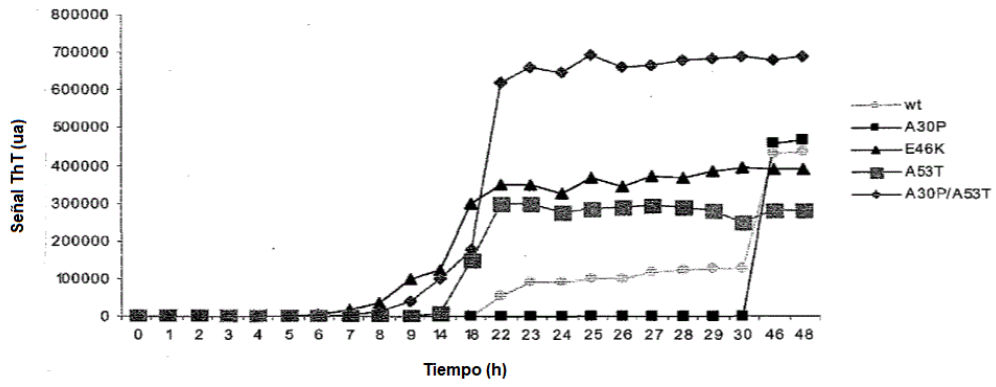


Fig. 2A

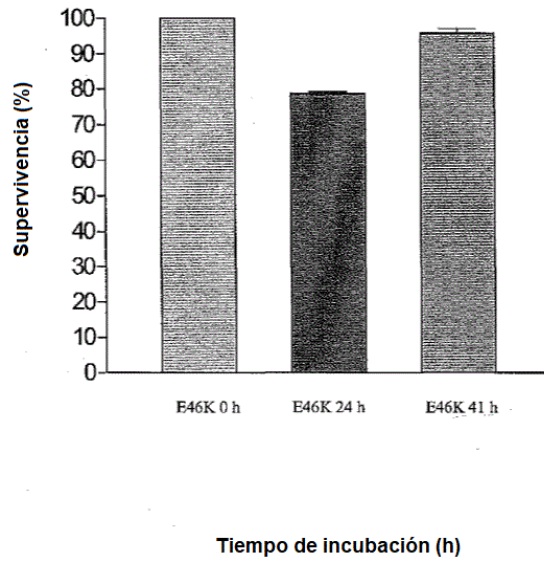


Fig. 2B

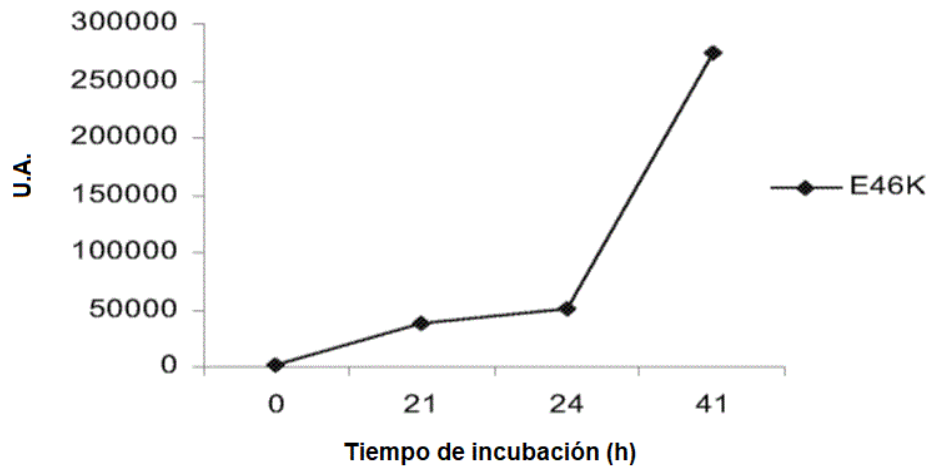


Fig. 3

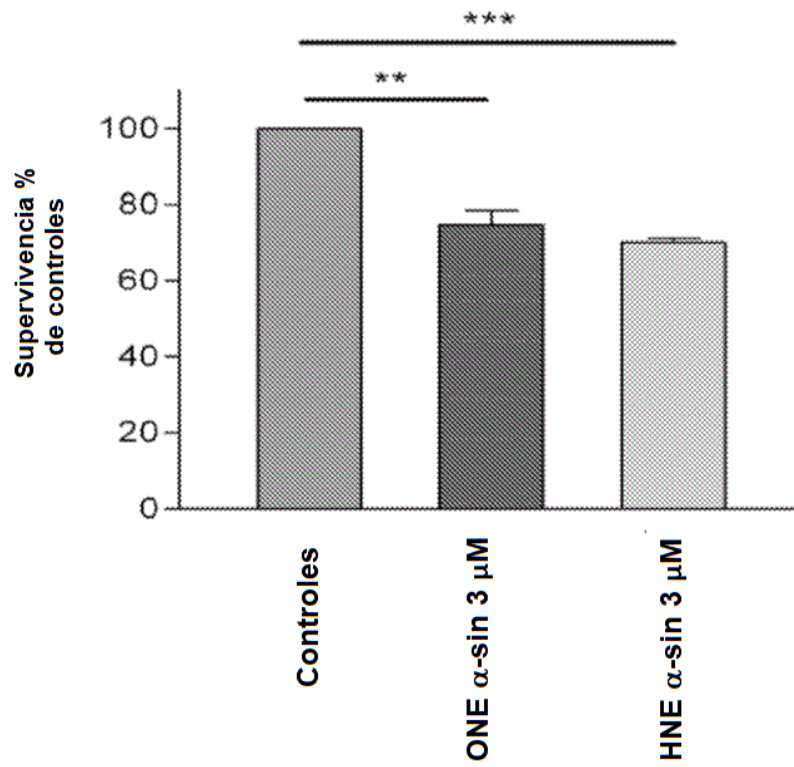


Fig. 4

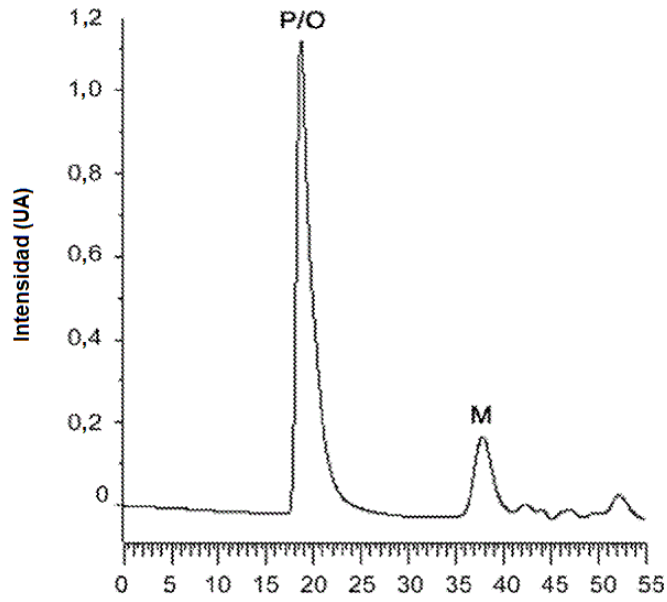


Fig. 5

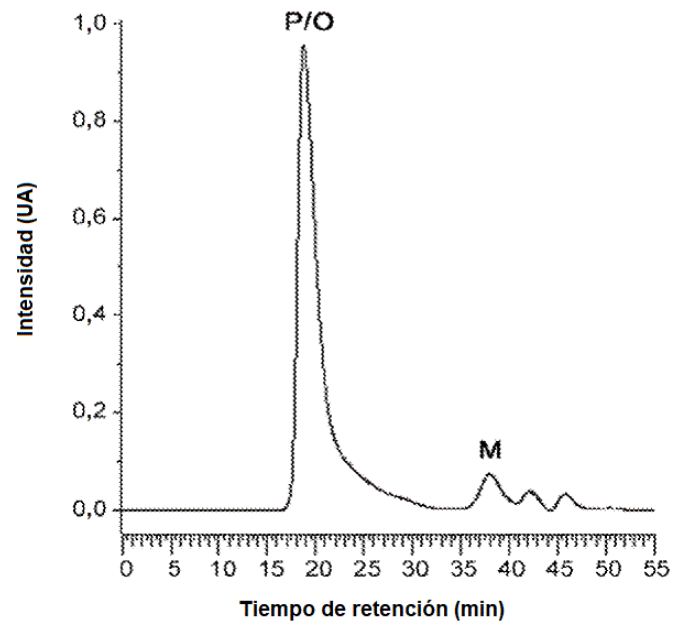


Fig. 6

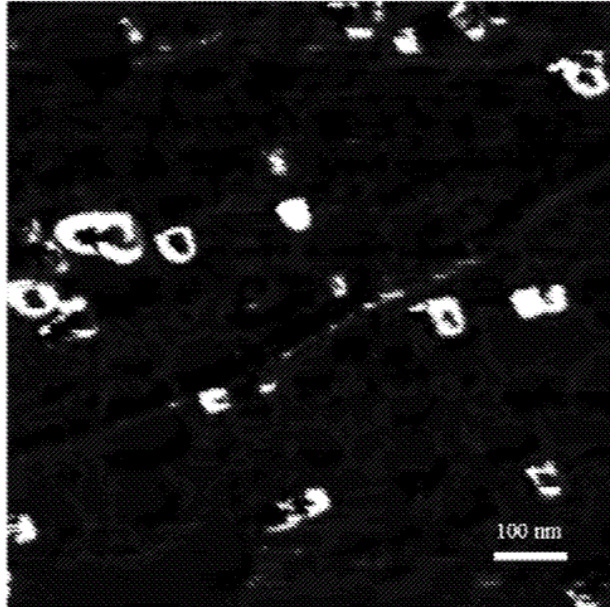


Fig. 7

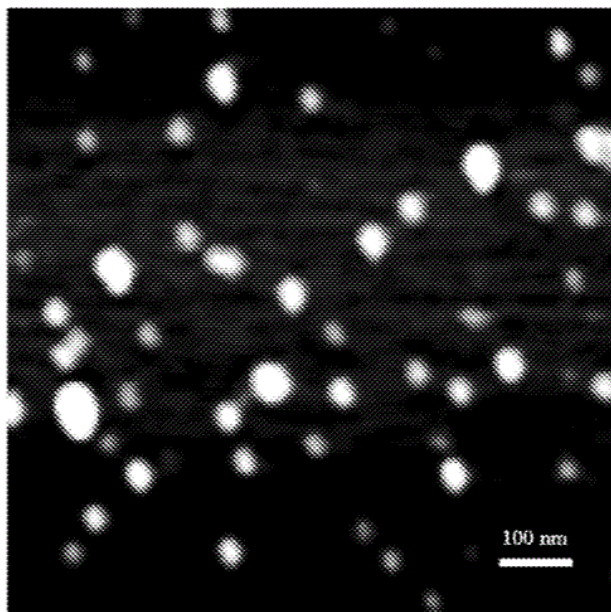


Fig. 8

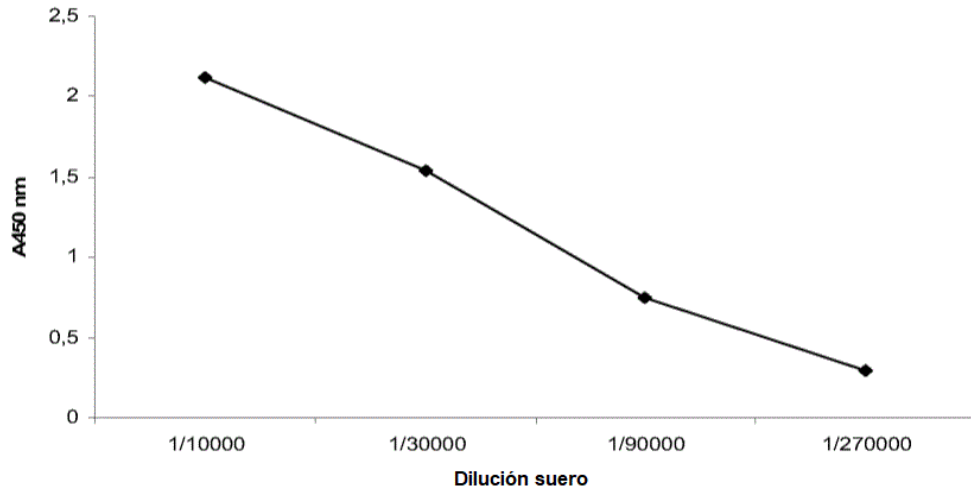


Fig. 9

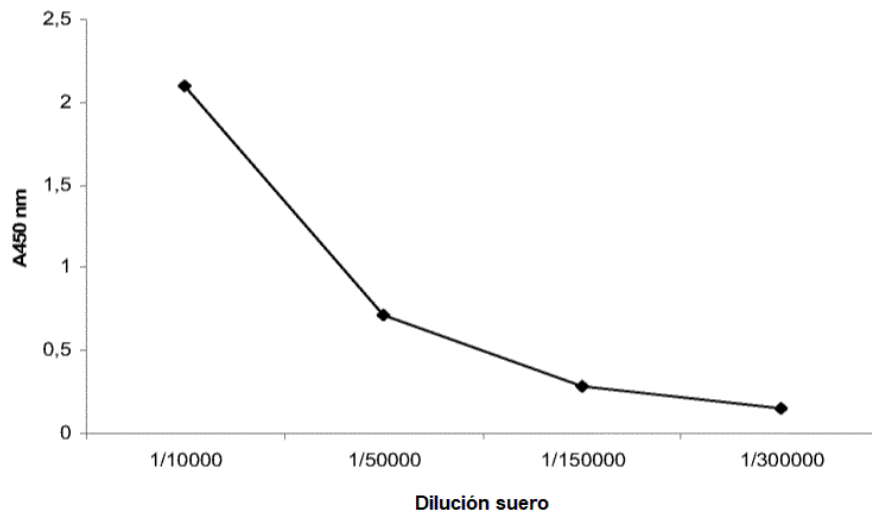


Fig. 10

