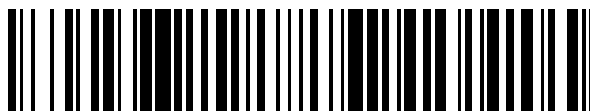


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 073**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2009** **E 15166032 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** **EP 2949666**

54 Título: **Anticuerpos anti-alfa-sinucleína humanos**

30 Prioridad:

**19.12.2008 EP 08022188**  
**19.12.2008 US 139253 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.04.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WEIHOFEN, ANDREAS;**  
**GRIMM, JAN;**  
**NITSCH, ROGER y**  
**HOCK, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 711 073 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 anti-alfa-sinucleína humanos

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a moléculas de unión específicas de  $\alpha$ -sinucleína novedosas, particularmente anticuerpos humanos así como fragmentos, derivados y variantes de los mismos, que reconocen  $\alpha$ -sinucleína y formas agregadas de  $\alpha$ -sinucleína, respectivamente. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden tales moléculas de unión, anticuerpos y miméticos de los mismos valiosos tanto como herramientas de diagnóstico para identificar especies tóxicas de  $\alpha$ -sinucleína en plasma y LCR como en estrategias de vacunación pasiva para tratar trastornos relacionados con agregados de  $\alpha$ -sinucleína tales como enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras enfermedades sinucleinopáticas.

15

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El mal plegamiento y agregación de proteínas son aspectos patológicos de numerosas enfermedades neurodegenerativas. Los agregados de  $\alpha$ -sinucleína son los componentes principales de los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy asociados con la enfermedad de Parkinson (EP). Una proteína nativamente no plegada,  $\alpha$ -sinucleína, puede adoptar diferentes morfologías agregadas, incluyendo oligómeros, protofibrillas y fibrillas. Los agregados oligoméricos pequeños han mostrado ser particularmente tóxicos.

20

Se han detectado autoanticuerpos de origen natural contra  $\alpha$ -sinucleína en personas sanas y los niveles alterados en pacientes estaban asociados con trastornos neurodegenerativos particulares; véase para revisión Neff y col., *Autoimmun. Rev.* 7 (2008), 501-507. Por tanto, los anticuerpos de origen natural en pacientes que padecen enfermedad de Parkinson, espontáneamente o tras vacunación, en particular en pacientes sanos, pueden servir para un papel protector con respecto a la agregación de  $\alpha$ -sinucleína; véase, p. ej. Woulfe y col., *Neurology* 58 (2002), 1435-1436 y Papachroni y col., *J. Neurochem.* 101 (2007), 749-756. Hasta ahora, la significación terapéutica de los autoanticuerpos había sido difícil de valorar. Esto es debido principalmente a la falta de enfoques experimentales directos para su aislamiento y posterior caracterización *in vitro*.

25

30

Recientemente, se han reseñado especies oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína extracelulares en plasma y LCR (El-Agnaf y col., *FASEB J.* 20 (2006), 419-425) y los estudios de inmunización en modelos de ratón de EP muestran que los anticuerpos monoclonales de ratón extracelulares contra  $\alpha$ -sinucleína pueden reducir la acumulación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína intracelulares (Masliah y col., *Neuron*, 46 (2005), 857-868) apoyando la idea de que los anticuerpos que neutralizan los agregados neurotóxicos sin interferir con las funciones beneficiosas de la  $\alpha$ -sinucleína monomérica pueden ser terapias útiles. Sin embargo, la utilidad terapéutica de los anticuerpos basados en murinos en seres humanos está obstaculizada por la respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) en vista de su origen no humano.

35

40

Emadi y col. en *J. Mol. Biol.* 368 (2007), 1132-1144, describen el aislamiento de fragmentos de anticuerpo monocatenarios (scFv) de una colección de anticuerpos presentados en fagos basada en secuencias humanas contra  $\alpha$ -sinucleína, que se unen solo a una forma oligomérica de  $\alpha$ -sinucleína e inhiben tanto la agregación como la toxicidad de  $\alpha$ -sinucleína *in vitro*. Sin embargo, aunque la generación de scFv de presentación en fagos es bastante simple, esta técnica tiene graves inconvenientes, puesto que los anticuerpos así producidos corren el riesgo de reactividad cruzada indeseada contra autoantígenos y carecen de las características de los anticuerpos humanos naturales optimizados evolutivamente producidos por el sistema inmunitario humano. Además, tales anticuerpos pueden no ser suficientemente específicos debido a la reactividad cruzada con otras proteínas y/o con la proteína diana en el contexto de un entorno y función fisiológicos normales. En el caso de enfermedad de Parkinson, por ejemplo, los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada también con derivados fisiológicos de  $\alpha$ -sinucleína presentan el potencial de causar efectos secundarios relacionados con las funciones normales de las estructuras diana fisiológicas. A este respecto, se induciría una enfermedad autoinmunitaria indeseada flagrante, un riesgo apenas calculable también en el diseño conceptual de experimentos de inmunización activa que emplean estructuras proteicas que, en forma variante, aparecen también fisiológicamente.

45

50

55

Más recientemente, Seitz y col. (81. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie Hamburg 10-13/09/2008), reseñaron el aislamiento de un autoanticuerpo policlonal anti- $\alpha$ -sinucleína a partir de diferentes soluciones de inmunoglobulina y muestras de donantes de sangre únicos mediante cromatografía de afinidad. Sin embargo, aparte del hecho de que este enfoque proporciona solamente cantidades limitadas del

60

anticuerpo deseado, los anticuerpos policlonales son solo de uso limitado para aplicación terapéutica, por ejemplo debido a su heterogeneidad y al riesgo de contaminarse con otras moléculas asociadas de  $\alpha$ -sinucleína que tengan efectos secundarios indeseados. Igualmente, el valor de diagnóstico de los anticuerpos policlonales es reducido, puesto que la variabilidad de la composición de los anticuerpos influirá en la especificidad y reactividad globales. Esto es todavía más cierto para anticuerpos contra proteínas sujetas a agregación y deposición debido al mal plegamiento.

Por tanto, existe la necesidad de superar las limitaciones anteriormente descritas y proporcionar un anticuerpo contra  $\alpha$ -sinucleína humano terapéutico y de diagnóstico.

## 10 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y hace uso de la respuesta inmunitaria específica de  $\alpha$ -sinucleína de sujetos de control sanos ancianos y pacientes con enfermedad neurológica para el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos específicos de  $\alpha$ -sinucleína naturales. En particular, los experimentos efectuados de acuerdo con la presente invención fueron exitosos en el aislamiento de anticuerpos monoclonales específicos de  $\alpha$ -sinucleína de un grupo de sujetos de edad avanzada sin signos de parkinsonismo.

Por tanto, la presente invención se dirige a anticuerpos humanos, fragmentos de unión al antígeno y moléculas de unión al antígeno similares que son capaces de reconocer específicamente  $\alpha$ -sinucleína. Se entiende por «reconocer específicamente  $\alpha$ -sinucleína», «anticuerpo específico de  $\alpha$ -sinucleína» y «anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína» específica, general y colectivamente anticuerpos de la forma nativa de  $\alpha$ -sinucleína, o  $\alpha$ -sinucleína mal plegada u oligomérica o agregada o modificada postraduccionalmente. Se proporcionan en el presente documento anticuerpos humanos selectivos de las formas monomérica nativa, de longitud completa, truncada y agregada.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el anticuerpo humano o fragmento de unión al antígeno del mismo demuestra las características de unión inmunológicas de un anticuerpo caracterizado por las regiones variables  $V_H$  y/o  $V_L$  como se expone en la Fig. 1B.

El fragmento de unión al antígeno del anticuerpo puede ser un fragmento  $F_v$  monocatenario, un fragmento  $F(ab')$ , un fragmento  $F(ab)$  y un fragmento  $F(ab')_2$ , o cualquier otro fragmento de unión al antígeno.

En una realización específica, más adelante, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo de isotipo IgG humano. Como alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico humano-murino o murinizado, siendo el último particularmente útil para procedimientos de diagnóstico y estudios en animales.

Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo de la presente invención, o fragmentos activos del mismo, o agonistas y moléculas cognadas o, como alternativa, antagonistas del mismo y a procedimientos inmunoterapéuticos e inmunodiagnósticos que usan tales composiciones en la prevención, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad sinucleinopática, donde se administra una cantidad efectiva de la composición a un paciente necesitado de ello.

La presente invención se refiere también a polinucleótidos que codifican al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Preferentemente, dicha región variable comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de  $V_H$  y/o  $V_L$  de la región variable como se expone en la Figura 1B.

Por consiguiente, la presente invención también incluye vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células huésped transformadas con los mismos, así como su uso para la producción de un anticuerpo y moléculas de unión equivalentes que son específicas para  $\alpha$ -sinucleína. Son conocidos en la técnica medios y procedimientos para la producción recombinante de anticuerpos y miméticos de los mismos, así como procedimientos de cribado de moléculas de unión competitivas que pueden ser o no anticuerpos. Sin embargo, como se describe en el presente documento, en particular con respecto a las aplicaciones terapéuticas en seres humanos, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano en el sentido de que la aplicación de dicho anticuerpo está sustancialmente libre de una respuesta HAMA observada de otro modo para anticuerpos quiméricos e incluso humanizados.

Además, se divulgan en el presente documento composiciones y procedimientos que pueden usarse para identificar  $\alpha$ -sinucleína en muestras. Los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína divulgados pueden usarse para cribar en sangre, LCR y orina humanos la presencia de  $\alpha$ -sinucleína en muestras, por ejemplo, usando un ensayo basado en ELISA o adaptado a la superficie. Los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento pueden ayudar en enfermedades sinucleinopáticas tales como el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson y pueden usarse para monitorizar la progresión de la enfermedad y la eficacia terapéutica.

Como se demuestra en el Ejemplo 4, el anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína de la presente invención es capaz de mejorar el rendimiento motor y el comportamiento en el laberinto en cruz elevado en un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Parkinson. Estos resultados confirman el valor terapéutico esperado de los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína derivados de seres humanos de la presente invención.

Por ello, es un objetivo particular de la presente invención proporcionar procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad sinucleinopática tal como enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante con cuerpos de Lewy de enfermedad de Alzheimer (VCLEA), atrofia sistémica múltiple (ASM), insuficiencia autonómica pura (IAP), neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo 1 (NACH-I), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, distrofia neuroaxonal generalizada de inicio juvenil (enfermedad de Hallervorden-Spatz), esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática y síndrome de Down. Los procedimientos comprenden administrar una concentración efectiva de un anticuerpo humano o derivado de anticuerpo al sujeto donde se orienta la  $\alpha$ -sinucleína.

Realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción y los Ejemplos a continuación.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20

#### Fig. 1:

Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable, es decir, cadena pesada y cadena ligera kappa/lambda de los anticuerpos humanos NI-202.3G12 (A), NI-202.12F4 (B) y NI-202.3D8 (C). Para el anticuerpo humano NI-202.3D8, se han clonado dos secuencias variables de cadena ligera VK $\lambda$ 1 (C) y VK $\lambda$ 2 (D), cada una de las cuales puede emparejarse con la secuencia variable de cadena pesada VHE1 (C). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y marco (FR) se indican con las CDR subrayadas. La región de unión a la cadena pesada (JH) y la región de unión a la cadena ligera (JK) se indican también. Debido a la estrategia de clonación, la secuencia de aminoácidos en el extremo N-terminal de la cadena pesada y la cadena ligera puede contener potencialmente alteraciones inducidas por cebadores en FR1 que, sin embargo, no afectan sustancialmente a la actividad biológica del anticuerpo. Para poder proporcionar un anticuerpo humano consenso, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del clon original se alinearon y se ajustaron de acuerdo con las secuencias de región variable de línea germinal humana pertinentes en la base de datos; véase, por ejemplo, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) alojada por el MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido). Estos aminoácidos, que se considera que se desvían potencialmente de la secuencia de línea germinal de consenso y, por lo tanto, podrían deberse al cebador de PCR, se indican en negrita.

#### Fig. 2:

Los anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína humanos recombinantes están dirigidos contra distintos epítomos. Se recubrió  $\alpha$ -sinucleína de longitud completa y truncada recombinante sobre placas ELISA a igual concentración de recubrimiento (20  $\mu$ g/ml). (A) El anticuerpo de  $\alpha$ -sinucleína humano recombinante NI-202.3G12 se une a  $\alpha$ -sinucleína de longitud completa pero no a truncamientos de  $\alpha$ -sinucleína en un ELISA directo, apuntando a un epítomo de reconocimiento estructural de NI-202.3G12. (B) NI-202.12F4 recombinante se une a  $\alpha$ -sinucleína de longitud completa y a truncamientos de  $\alpha$ -sinucleína que contienen los aminoácidos (aa) 1-60 en un ELISA directo, apuntando a un epítomo de NI-202.12F4 en la región de repetición anfipática N-terminal de la alfa-sinucleína. (C) El anticuerpo LB509 se une a fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína C-terminales, confirmando el epítomo anteriormente determinado (aa 115-122). Los valores son medias  $\pm$  EEM (n= 2-3).

#### Fig. 3:

Los anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína humana recombinante se unen a  $\alpha$ -sinucleína pero no a  $\beta$  y  $\gamma$ -sinucleína en un ELISA directo. Se incubaron las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -sinucleínas recombinantes recubiertas sobre placas ELISA a igual concentración de recubrimiento (2  $\mu$ g/ml) con anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína humanos recombinantes o con un pananticuerpo de sinucleína. (A) El último detecta las tres proteínas sinucleínas, mientras que los anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína humanos recombinantes (B) NI-202.3G12 y (C) NI-202.12F4 se unen selectivamente a  $\alpha$ -sinucleína. Los valores son medias  $\pm$  EEM (n= 2-3).

55

#### Fig. 4:

El anticuerpo NI-202.12F4 de  $\alpha$ -sinucleína humano recombinante se une a  $\alpha$ -sinucleína pero no a  $\beta$  y  $\gamma$ -sinucleína en análisis de transferencia Western. Se sometieron  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -sinucleína (750 ng cada una) a PAGE-SDS y posteriormente a análisis de transferencia Western. (A) La tinción con Coomassie revela igual concentración de proteína en PAGE-SDS. (B) NI-202.12F4 interacciona fuertemente con  $\alpha$ -sinucleína pero no con beta o gamma-sinucleína. (C) No se

60

detectó señal sin anticuerpo primario.

**Fig. 5:**

(A) El análisis de inmunotransferencia de NI-202.12F4 de extractos cerebrales de ratones transgénicos de alfa-sinucleína humana y no transgénicos muestra unión preferencial por  $\alpha$ -sinucleína humana. Se analizaron extractos cerebrales de ratones de tipo silvestre y transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína humana por inmunotransferencia con anticuerpo LB509 humano específico de  $\alpha$ -sinucleína y los anticuerpos reactivos con  $\alpha$ -sinucleína humana y de ratón clon 42 y NI202.12F4. Aunque el clon 42 detecta las bandas destacadas correspondientes a  $\alpha$ -sinucleína de ratón y humana, LB509 y NI-202.12F4 muestran una fuerte preferencia por  $\alpha$ -sinucleína humana. (B) El análisis de inmunotransferencia de NI-202.12F4 de extractos cerebrales muestra unión preferencial a agregados de  $\alpha$ -sinucleína humana. Se analizaron por transferencia Western extractos cerebrales corticales de un sujeto de control sano y un paciente con demencia con cuerpos de Lewy (DCL) así como extractos cerebrales de ratones de tipo silvestre y ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A30P humana. NI-202.12F4 detecta las formas oligomérica y fibrilar de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en extracto cerebral de DCL y transgénico de  $\alpha$ -sinucleína A30P con alta sensibilidad. Se observa una unión mínima a formas monoméricas de  $\alpha$ -sinucleína en tejidos humanos o de ratón de tipo silvestre y una unión moderada en extractos cerebrales transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A30P de alta sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína. En contraposición, el anticuerpo clon 42 detecta formas monoméricas y fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína con una alta sensibilidad y se une mal a especies de  $\alpha$ -sinucleína agregadas.

**Fig. 6:**

NI-202.12F4 recombinante muestra una alta afinidad de unión a  $\alpha$ -sinucleína humana de tipo silvestre y mutantes causantes de enfermedad. Se recubrieron  $\alpha$ -sinucleínas humanas de tipo silvestre ( $\bullet$ ), A53T ( $\blacksquare$ ), A30P ( $\ast$ ) y E64K ( $\diamond$ ) recombinantes sobre placas ELISA (2  $\mu$ g/ml) y se sondearon con diversas concentraciones de NI202.12F4. Las concentraciones semimáximas efectivas (CE50) fueron 321 pM para  $\alpha$ -sinucleína de tipo silvestre, 293 pM para  $\alpha$ -sinucleína humana mutante A53T, 228 pM para A30P y 483 pM para E64K.

**Fig. 7:**

Análisis de unión inmunohistoquímica de NI-202.12F4. NI-202.12F4 muestra una destacada tinción de la patología de  $\alpha$ -sinucleína, incluyendo cuerpos de Lewy e inclusión de tipo neurita de Lewy, así como pequeñas acumulaciones de  $\alpha$ -sinucleína somatodendrítica y sináptica en secciones flotantes de ratones transgénicos que expresan  $\alpha$ -sinucleína A53T (A) o A30P (B) humana así como en tejidos cerebrales humanos de enfermedad de Parkinson (C) y demencia con cuerpos de Lewy (D). El anticuerpo Syn211 detecta  $\alpha$ -sinucleína sináptica fisiológica con una alta sensibilidad en ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A30P (E), mientras que NI-202.12F4 se une preferentemente a agregados de  $\alpha$ -sinucleína patológicos (B). La unión de NI-202.12F4 está prácticamente ausente de secciones cerebrales de ratones de tipo silvestre (F) comparable a tinción de control solo con anticuerpo secundario (G), mientras que el anticuerpo clon 42 muestra una tinción sináptica destacada de proteína  $\alpha$ -sinucleína de ratón (H).

**Fig. 8:**

NI-202.12F4 recombinante muestra unión preferente por  $\alpha$ -sinucleína recubierta de alta densidad. Se recubrieron  $\alpha$ -sinucleínas de longitud completa o truncadas recombinantes sobre placas ELISA a las concentraciones indicadas y se sondearon con diversas concentraciones de anticuerpos NI-202.12F4 o Syn211 por ELISA directo ( $\circ$  20  $\mu$ g/ml;  $\blacktriangle$  2  $\mu$ g/ml;  $\blacktriangledown$  1  $\mu$ g/ml;  $\blacklozenge$  250 ng/ml;  $\square$  concentración de recubrimiento 100 ng/ml de  $\alpha$ -sinucleína de longitud completa o 1-60 recombinante). Se determinó la concentración semimáxima efectiva (CE50) que indica la potencia de los anticuerpos. (A) La unión de alta afinidad de NI-202.12F4 recombinante con  $\alpha$ -sinucleína requiere altas densidades de recubrimiento de proteína  $\alpha$ -sinucleína. Aunque se observa una CE50 de 111 pM para  $\alpha$ -sinucleína recubierta a concentración 20  $\mu$ g/ml, los valores de CE50 aumentan bruscamente al disminuir las concentraciones de recubrimiento, demostrando una pérdida drástica de afinidad a menores concentraciones de recubrimiento de  $\alpha$ -sinucleína. Estos rasgos apuntan a un epítipo conformacional de NI-202.12F4 que se forma preferentemente a altas concentraciones de recubrimiento de  $\alpha$ -sinucleína. (B) La unión de Syn211 no se afecta por la concentración de recubrimiento. No se observa disminución de la afinidad del anticuerpo Syn211 comercialmente disponible a menores concentraciones de recubrimiento, con CE50 oscilando de 335 pM para 20  $\mu$ g/ml a 99 pM para 100 ng/ml de densidad de recubrimiento de  $\alpha$ -sinucleína, sugiriendo unión a un epítipo no conformacional lineal. (C) La alta afinidad de unión de NI-202.12F4 recombinante al fragmento de  $\alpha$ -sinucleína N-terminal que comprende los aminoácidos 1-60 requiere altas densidades de recubrimiento. NI-202.12F4 muestra una unión equivalente y dependiente de la concentración de recubrimiento a  $\alpha$ -sinucleína de longitud completa así como truncada, apuntando a un epítipo conformacional de NI-202.12F4 que está contenido en los aminoácidos 1-60 de la proteína  $\alpha$ -sinucleína. (D) Se recubrieron péptidos biotinilados que comprenden fragmentos de 20 aminoácidos superpuestos que cubren los 60 aminoácidos N-terminales de  $\alpha$ -sinucleína sobre placas de avidina y se sondearon con NI-202.12F4 o un pananticuerpo de control de sinucleína que detecta un epítipo en los aa 21-40. Por consiguiente, el anticuerpo de control se une fuertemente al péptido 21-40 y en menor medida a los péptidos 11-30 y 31-50. En contraposición, no se observa unión para NI-

202.12F4 a ninguno de los péptidos ensayados, sugiriendo que ninguno de los fragmentos N-terminales es suficiente como epítipo de NI-202.12F4 y puede requerirse un fragmento mayor para unión óptima y formación del epítipo de NI-202.12F4 estructural.

**5 Fig. 9:**

El tratamiento crónico con NI-202.12F4 mejora el rendimiento motor en ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T. Se trataron ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T de 10,5 meses de edad semanalmente con NI-202.12F4 o PBS (5 mg/kg; aplicación intraperitoneal). Se valoró el rendimiento motor después de dos meses de tratamiento en la prueba del poste. (A) Los animales tratados con NI-202.12F4 requerían significativamente menos tiempo para girarse hacia abajo (t-giro;  $1,7 \pm 0,3$  frente a  $4,6 \pm 0,6$  s,  $p = 0,0002$ , prueba de t de Student de dos colas). (B) Los animales tratados con NI-202.12F4 usaban también significativamente menos tiempo (t-total) para descender a la jaula hogar ( $7,3 \pm 0,9$  frente a  $10,4 \pm 0,7$  s,  $p = 0,012$ , prueba de t de Student de dos colas).

**Fig. 10:**

15 El tratamiento crónico de ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T con NI-202.12F4 conduce a la recuperación del comportamiento de laberinto en cruz elevado. Se trataron ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T de 10,5 meses de edad semanalmente i.p. con NI-202.12F4 5 mg/kg o PBS. Después de dos meses de tratamiento, se ensayó en los animales el comportamiento de laberinto en cruz elevado. Los animales tratados con NI-202.12F4 gastaban significativamente menos tiempo y cubrían una distancia significativamente menor en los brazos abiertos en comparación con los animales de control tratados con vehículo, indicando una recuperación del comportamiento normal.

**Fig. 11:**

25 El tratamiento crónico de ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T con NI-202-12F4 da como resultado niveles plasmáticos elevados de  $\alpha$ -sinucleína A53T humana. Se prepararon muestras de plasma de ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T de 12,5 meses de edad que se habían tratado semanalmente i.p. durante 2 meses con NI-202.12F4 5 mg/kg o PBS. Se tomó sangre 24 h después de la última aplicación. (A) Se determinaron los niveles de NI-202.12F4 en plasma usando un ELISA directo de  $\alpha$ -sinucleína. (B) Se determinaron los niveles de  $\alpha$ -sinucleína A53T humana en plasma usando un ELISA de sándwich de  $\alpha$ -sinucleína específico humano. Los animales tratados con NI-202.12F4 tienen niveles significativamente elevados de  $\alpha$ -sinucleína humana en plasma en comparación con los animales de control ( $24,9 \pm 4,1$  frente a  $1,9 \pm 1,2$  ng/ml,  $p = 0,0002$ ).

**LISTADO DE SECUENCIAS**

35 <110> Biogen International Neuroscience GmbH  
Universidad de Zúrich

<120> Anticuerpos anti-alfa-sinucleína humanos

<130> NE30A27/P-EPD1/WO

<150>US 61/139.253

40 <151> 19-12-2008

<150>EP 08022188.0

<151> 19-12-2008

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

50 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(140)

<223> Secuencia aminoacídica de alfa-sinucleína; véase, p. ej., Ueda y col, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993), 1282-1286; GenBank swissprot: locus SYUA\_HUMAN, número de acceso P37840

55 <400> 1

ES 2 711 073 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 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

```

- 5 <210> 2
- <211> 363
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <221> CDS
- <222> (1)..(363)
- <223> NI-202.3G12-VHB1 secuencia variable de cadena pesada (VH)
- <220>
- <221> Región\_V
- 15 <222> (91)..(105)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1
- <220>
- <221> Región\_V
- <222> (148)..(198)
- 20 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2
- <220>
- <221> Región\_V
- <222> (295)..(330)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) CDRH3
- 25 <220>
- <221> Región\_V
- <222> (295)..(330)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
- 30 <400> 2

ES 2 711 073 T3

gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gct	gag	gtg	aag	aag	ccg	ggg	gcc	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tca	gtg	aga	ctc	tcc	tgt	agg	gct	tct	gga	tac	aac	ttc	atc	gac	ttc	96
Ser	Val	Arg	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Phe	Ile	Asp	Phe	
			20					25					30			
cat	ata	cac	tgg	gtg	cga	cag	gcc	cct	gga	gag	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
His	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
ggc	tgg	agt	aat	cct	caa	agt	ggc	aac	tca	agt	tct	gca	cag	agg	ttt	192
Gly	Trp	Ser	Asn	Pro	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Ser	Ser	Ala	Gln	Arg	Phe	
	50					55					60					
cag	ggc	cgg	gtc	acc	atg	acc	acg	gac	acg	tcc	atg	tcc	gcg	gcc	tac	240
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Met	Ser	Ala	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
atg	gac	ctg	aac	tgg	ctg	aca	ctt	gac	gac	acg	gcc	gtg	tat	tac	tgt	288
Met	Asp	Leu	Asn	Trp	Leu	Thr	Leu	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
acg	aga	ccc	cat	gat	ggc	gca	gga	aac	tac	cga	ttt	gac	acc	tgg	ggc	336
Thr	Arg	Pro	His	Asp	Gly	Ala	Gly	Asn	Tyr	Arg	Phe	Asp	Thr	Trp	Gly	
			100					105					110			
cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tcg								363
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120									

5

- <210> 3
- <211> 121
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

10

- <400> 3



ES 2 711 073 T3

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

- <210> 4
- <211> 121
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(121)
- 10 <223> NI-202.3G12-VHB1-GL secuencia variable de cadena pesada (VH) alineada con la secuencia de línea germinal (GL)
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (31)..(35)
- 15 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (50)..(66)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (99)..(110)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
- 25 <400> 4

ES 2 711 073 T3

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

Ser Val Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Asp Phe  
 20 25 30

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

Gly Trp Ser Asn Pro Gln Ser Gly Asn Ser Ser Ser Ala Gln Arg Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Met Ser Ala Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Asp Leu Asn Trp Leu Thr Leu Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Pro His Asp Gly Ala Gly Asn Tyr Arg Phe Asp Thr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

- <210> 5
- <211> 324
- 5 <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(324)
- 10 <223> NI-202.3G12-VLc1 secuencia variable de cadena ligera (VL)
- <220>
- <221> Región\_V
- <222> (67)..(99)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
- 15 <220>
- <221> Región\_V
- <222> (145)..(165)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
- <220>
- 20 <221> Región\_V
- <222> (262)..(294)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
- <400> 5
- 25

ES 2 711 073 T3

```

cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tcg gtg tca gtg gcc cca gga cag      48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1          5          10          15

acg gcc agg atc acc tgc tct ggt gat gcc ttg cca aaa cac tat gct      96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys His Tyr Ala
          20          25          30

cat tgg tac cag cag aag cca ggc cag gtc cct ata gtg gtc atc tat      144
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ile Val Val Ile Tyr
          35          40          45

aaa gac act gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggt tcc      192
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

acc tca ggg aca aca gtc acc ctg acc atc agt ggc gtc cag gca gag      240
Thr Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65          70          75          80

gac gag gct cat tat tat tgt caa tca gca gac gtc agt tca act tat      288
Asp Glu Ala His Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Val Ser Ser Thr Tyr
          85          90          95

gtt gtg ttt ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta      324
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 6  
 <211> 108  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys His Tyr Ala
          20          25          30

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

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

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

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

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

```

10

<210> 7  
 <211> 108

ES 2 711 073 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 5 <222> (1)..(108)  
 <223> NI-202.3G12-V-Lc1-GL secuencia variable de cadena ligera (VL) alineada con la secuencia de línea germinal (GL)  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (23)..(33)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (49)..(55)  
 15 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (88)..(98)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3  
 20  
 <400> 7

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

<210> 8  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 30 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(339)  
 <223> NI-202.12F4-VHA1b secuencia variable de cadena pesada (VH)  
 35 <220>  
 <221> Región\_V  
 <222> (91)..(105)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1  
 <220>  
 40 <221> Región\_V

ES 2 711 073 T3

<222> (147)..(204)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>

<221> Región\_Vn

5 <222> (301)..(306)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<220>

<221> misc\_feature

<222> (319)..(339)

10 <223> La secuencia nucleotídica en posiciones 319 a 339 puede leerse como alternativa «tcc cgg gtc acc gtc gcc tca» y codificar los aminoácidos «Ser Arg Val Thr Val Ala Ser»

<400> 8

```
gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggt ctg gtc gag ccg ggg ggg      48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
1          5          10          15
```

```
tcc cta aga ctc tcc tgt gca gtc tcc gga ttc gat ttc gaa aaa gcc      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Phe Glu Lys Ala
          20          25          30
```

```
tgg atg agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg cag ggg cta cag tgg gtt      144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Val
          35          40          45
```

```
gcc cgt atc aag agc aca gct gat ggt ggg aca aca agc tac gcc gcc      192
Ala Arg Ile Lys Ser Thr Ala Asp Gly Gly Thr Thr Ser Tyr Ala Ala
          50          55          60
```

```
ccc gtg gaa ggc agg ttc atc atc tca aga gat gat tcg aga aac atg      240
Pro Val Glu Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Met
65          70          75          80
```

15

```
ctt tat ctg caa atg aac agt ctg aaa act gaa gac aca gcc gtc tat      288
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
          85          90          95
```

```
tat tgt aca tca gcc cac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc      336
Tyr Cys Thr Ser Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
          100          105          110
```

```
tcg      339
Ser
```

<210> 9

20 <211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

25

ES 2 711 073 T3

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

Ser

- <210> 10
- <211> 113
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(113)
- 10 <223> NI-202.12F4-VHA1b-GL secuencia variable de cadena pesada (VH) alineada con la secuencia de línea germinal (GL)
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (31)..(35)
- 15 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (50)..(68)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (101)..(102)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
- <220>
- 25 <221> MISC\_FEATURE
- <222> (107)..(113)
- <223> La secuencia aminoacídica en posiciones 107 a 113 puede leerse como alternativa «Ser Arg Val Thr Val Ala Ser»
- 30 <400> 10

ES 2 711 073 T3

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

Ser

- <210> 11
- <211> 324
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(324)
- 10 <223> NI-202.12F4-V-La1 secuencia variable de cadena ligera (VL)
- <220>
- <221> Región\_V
- <222> (67)..(99)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
- 15 <220>
- <221> Región\_V
- <222> (145)..(165)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
- <220>
- 20 <221> Región\_V
- <222> (262)..(294)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
- <400> 11
- 25

ES 2 711 073 T3

```

cag tct gtg ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag      48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15

acg gcc agg atc acc tgc tct gga gaa gca ttg cca atg caa ttt gct      96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Met Gln Phe Ala
          20          25          30

cat tgg tac caa cag agg cca ggc aag gcc cca gtg ata gtg gtg tac      144
His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Val Ile Val Val Tyr
          35          40          45

aaa gac agt gag aga ccg tca ggt gtc cct gag cga ttc tct ggc tcc      192
Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

agc tca ggg aca aca gcc acg ttg acc atc act gga gtc cag gca gaa      240
Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu
65          70          75          80

gat gag gct gac tat tac tgc cag tcg cca gac agc act aac act tat      288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Pro Asp Ser Thr Asn Thr Tyr
          85          90          95

gaa gtc ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta      324
Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 12

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 13

15 <211> 108

<212> PRT



ES 2 711 073 T3

- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(108)
- 5 <223> NI-202.12F4-V-La1-GL secuencia variable de cadena ligera (VL) alineada con la secuencia de línea germinal (GL)
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (23)..(33)
- 10 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (49)..(55)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (88)..(98)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
- 20 <400> 13

```

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

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

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

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

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

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

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

```

- 25 <210> 14
- <211> 369
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 30 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(369)
- <223> NI-202.3D8-VHE1 secuencia variable de cadena pesada (VH)
- <220>
- 35 <221> Región\_V
- <222> (91)..(105)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1
- <220>

ES 2 711 073 T3

<221> Región\_V  
 <222> (148)..(198)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2  
 <220>

5 <221> Región\_V  
 <222> (295)..(336)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 14

10

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg 1 5 10 15	48
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt acc tat Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr 20 25 30	96
gcc att tcc tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45	144
gca att att tca aat gat gga agt cgt aaa tat tat gca gac tcc gtg Ala Ile Ile Ser Asn Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60	192
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc agg gac acg ctg gat Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asp Thr Leu Asp 65 70 75 80	240
ctg gaa atg aac agc ctg aga gat gag gac acg gct gtg tat tac tgt Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
gcg aaa aaa cga ggg acg tat gcc agc agg tgc aaa gcc ttt gac ttc Ala Lys Lys Arg Gly Thr Tyr Ala Ser Arg Cys Lys Ala Phe Asp Phe 100 105 110	336
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120	369

15 <210> 15  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 15

ES 2 711 073 T3

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

- <210> 16
- <211> 123
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(123)
- 10 <223> NI-202.3D8-VHE1-GL secuencia variable de cadena pesada (VH) alineada con la secuencia de línea germinal (GL)
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (31)..(35)
- 15 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (50)..(66)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (99)..(112)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
- 25 <400> 16

ES 2 711 073 T3

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

- <210> 17
- <211> 318
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(318)
- 10 <223> NI-202.3D8-VKa1 secuencia variable de cadena ligera (VL)
- <220>
- <221> Región\_V
- <222> (70)..(102)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
- 15 <220>
- <221> Región\_V
- <222> (148)..(168)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
- <220>
- 20 <221> Región\_V
- <222> (265)..(288)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
- <400> 17
- 25

ES 2 711 073 T3

```

gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt ggc tgg      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Trp
           20           25           30

ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

tat gat gcc tcc aat ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc      192
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

gat gat ttt gca act tat tat tgc caa cag tat gat aat tat tgg acg      288
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Trp Thr
           85           90           95

ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa      318
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105

```

<210> 18

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Trp
           20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Trp Thr
           85           90           95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105

```

<210> 19

15 <211> 106

<212> PRT

ES 2 711 073 T3

<213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(106)  
 5 <223> NI-202.3D8-VKa1-GL secuencia variable de cadena ligera (VL) alineada con la secuencia de línea germinal (GL)  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(34)  
 10 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50)..(56)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (89)..(96)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3  
 20 <400> 19

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

25 <210> 20  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 30 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)  
 <223> NI-202.3D8-VKc1 secuencia variable de cadena ligera (VL)  
 <220>  
 35 <221> Región\_V  
 <222> (70)..(102)  
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1  
 <220>  
 <221> Región\_V  
 40 <222> (148)..(168)

ES 2 711 073 T3

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

<220>

<221> Región\_V

<222> (265)..(291)

5 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

<400> 20

<p>gaa att gtg atg acg cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct att gga          Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly          1 5 10 15</p>	<p>48</p>
<p>gac aga gtc acc ttc act tgt cgg gcg agt cac gac att agc aat tat          Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr          20 25 30</p>	<p>96</p>
<p>tta gcc tgg ttt cgg cag caa cca ggg aaa gcc cct aag tcc ctg atc          Leu Ala Trp Phe Arg Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile          35 40 45</p>	<p>144</p>
<p>tat gct gca tct agt ctg caa agt ggg gtc cca tca aga ttc agc gcc          Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala          50 55 60</p>	<p>192</p>
<p>agt gga tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag ccc          Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro          65 70 75 80</p>	<p>240</p>
<p>gaa gat ttt gca act tat tat tgt gtt caa tat agg act tac ccc ctc          Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Arg Thr Tyr Pro Leu          85 90 95</p>	<p>288</p>
<p>acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa          Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys          100 105</p>	<p>321</p>

10

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 21

ES 2 711 073 T3

```

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

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

Leu Ala Trp Phe Arg Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35           40           45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Arg Thr Tyr Pro Leu
          85           90           95

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

```

- <210> 22
- <211> 107
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(107)
- 10 <223> NI-202.3D8-VKc1-GL secuencia variable de cadena ligera (VL) alineada con la secuencia de línea germinal (GL)
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (24)..(34)
- 15 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (50)..(56)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (89)..(97)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
- 25 <400> 22

```

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

```



ES 2 711 073 T3

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

Leu Ala Trp Phe Arg Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Arg Thr Tyr Pro Leu  
85 90 95

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

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La materia en cuestión de la presente invención se caracteriza en las reivindicaciones.

**5 I. Definiciones**

Las enfermedades sinucleinopáticas o sinucleinopatías son un grupo diverso de trastornos neurodegenerativos que comparten una lesión patológica común compuesta por agregados de proteína  $\alpha$ -sinucleína insolubles en poblaciones selectivamente vulnerables de neuronas y glía. Estos trastornos incluyen enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), distrofia neuroaxonal generalizada de inicio juvenil (enfermedad de Hallervorden-Spatz), insuficiencia autonómica pura (IAP), atrofia sistémica múltiple (ASM) y neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo 1 (NACH-I). Clínicamente, se caracterizan por un declive crónico y progresivo de funciones motoras, cognitivas, de comportamiento y autonómicas, dependiendo de la distribución de las lesiones.

15 La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa dependiente de la edad de etiología desconocida. Se cree que la enfermedad de Parkinson esporádica es el resultado una combinación de vulnerabilidad genética y ataques ambientales. Se cree además que la enfermedad de Parkinson (EP), aunque desencadenada por mecanismos dispares, sigue una ruta patofisiológica compartida. Es un nodo compartido la implicación de  $\alpha$ -sinucleína.  
 20 El nexo de esta proteína con la patogénesis de la enfermedad de Parkinson se ha establecido mediante la identificación tanto de mutaciones puntuales como de la triplicación del gen en casos familiares, la localización de  $\alpha$ -sinucleína en cuerpos de Lewy, uno de los rasgos patológicos distintivos de la enfermedad de Parkinson y la correlación de la expresión de  $\alpha$ -sinucleína y la patología de la enfermedad en modelos neurotóxicos de enfermedad de Parkinson. Evidencias adicionales indican que están implicadas en la enfermedad esporádica formas particulares de  $\alpha$ -sinucleína  
 25 (p. ej., mal plegadas y dopamina unida a  $\alpha$ -sinucleína).

Las sinucleínas son proteínas solubles pequeñas expresadas principalmente en tejido neural y en ciertos tumores. La familia incluye tres proteínas conocidas:  $\alpha$ -sinucleína,  $\beta$ -sinucleína y  $\gamma$ -sinucleína. Todas las sinucleínas tienen en común un motivo de unión a lípido  $\alpha$ -helicoidal altamente conservado con similitud con los dominios de unión a lípido  
 30 de clase A2 de apolipoproteínas intercambiables. Los miembros de la familia de sinucleína no se encuentran fuera de los vertebrados, aunque tienen alguna similitud estructural conservada con proteínas «abundantes en embrión tardío» de plantas. Las proteínas  $\alpha$  y  $\beta$ -sinucleínas se encuentran principalmente en tejido cerebral, donde se ven mayoritariamente en terminales presinápticas. La proteína  $\gamma$ -sinucleína se encuentra principalmente en el sistema nervioso periférico y retina, pero su expresión en tumores de mama es un marcador de progresión tumoral. No se han  
 35 determinado las funciones celulares normales para ninguna de las proteínas sinucleínas, aunque algunos datos sugieren un papel en la regulación de la estabilidad y/o el recambio de membrana. Las mutaciones en  $\alpha$ -sinucleína están asociadas a casos familiares raros de enfermedad de Parkinson de inicio temprano, y la proteína se acumula anormalmente en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y varias otras dolencias neurodegenerativas. Para revisión véase, p. ej., George, Genome Biol. 3 (2002), reviews3002.1-reviews3002.6 publicado en línea el 20 de  
 40 diciembre de 2001, en el que la Tabla 1 cataloga los miembros únicos de la familia de sinucleína que están actualmente enumerados en GenBank, cuyo contenido de divulgación se incorpora al presente documento como referencia.

La  $\alpha$ -sinucleína se identificó originalmente en cerebros humanos como la proteína precursora del componente no  $\beta$ -amiloides (CNA) de placas de enfermedad de Alzheimer (EA); véase, p. ej., Ueda y col, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.  
 45 90 (1993), 1282-1286. La  $\alpha$ -sinucleína, también llamada precursor del componente no A $\beta$  de amiloide de EA (PCNA), es una proteína de 140 aminoácidos. La  $\alpha$ -sinucleína existe en su forma nativa como un ovillo aleatorio; sin embargo, los cambios de pH, aglomeración molecular, contenido de metales pesados y niveles de dopamina afectan todos a la conformación proteica. Los cambios de conformación a restos oligoméricos, protofibrilares, fibrilares y agregados se cree que regulan la toxicidad proteica. Cada vez más evidencias indican que la  $\alpha$ -sinucleína adicionada con dopamina  
 50 tiene un curso temporal más rápido de formación de fibrillas en comparación con la proteína no adicionada. Además, la dopamina en el contexto de la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína es tóxica.

En esta memoria descriptiva, los términos «alfa-sinucleína», «a-sinucleína» y «aSyn» se usan de manera intercambiable para hacer referencia específicamente a la forma monomérica nativa de  $\alpha$ -sinucleína. El término « $\alpha$ -sinucleína» se usa también para identificar en general otros conformeros de  $\alpha$ -sinucleína, por ejemplo una  $\alpha$ -sinucleína unida a dopamina-quinona (DAQ) y oligómeros o agregados de  $\alpha$ -sinucleína. El término « $\alpha$ -sinucleína» también se usa para hacer referencia de forma colectiva a todos los tipos y formas de  $\alpha$ -sinucleína. La secuencia proteica para  $\alpha$ -sinucleína humana es MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVAT  
 55 VAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGTFVKDQLGKNEEGAPQ  
 60 EGILEMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -sinucleína puede

recuperarse de la bibliografía y bases de datos pertinentes, véase *p. ej.* Ueda y col., *ibid.*, GenBank swissprot: locus SYUA\_HUMAN, número de acceso P37840. El componente no A $\beta$  de amiloide de EA (CNA) deriva de  $\alpha$ -sinucleína. El CNA, un dominio altamente hidrófobo en  $\alpha$ -sinucleína, es un péptido consistente en al menos 28 residuos de aminoácidos (residuos 60-87) y opcionalmente 35 residuos de aminoácidos (residuos 61-95). El CNA presenta la

5 tendencia a formar una estructura de lámina beta (Iwai, y col., *Biochemistry*, 34 (1995) 10139-10145). Se describen las secuencias de aminoácidos de CNA en Jensen y col., *Biochem. J.* 310 (1995), 91-94; número de acceso a GenBank S56746 y Ueda y col., *PNAS USA* 90 (1993), 1282-11286.

La  $\alpha$ -sinucleína no agregada, o fragmentos de la misma incluyendo CNA, significa unidades peptídicas monoméricas.

10 La  $\alpha$ -sinucleína no agregada o fragmentos de la misma es generalmente soluble, y es capaz de autoagregar formando oligómeros solubles. Los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína y fragmentos de los mismos son habitualmente solubles y existen predominantemente como  $\alpha$ -hélices. La  $\alpha$ -sinucleína monomérica puede prepararse *in vitro* disolviendo péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La solución resultante se centrifuga para retirar cualquier partícula insoluble. La  $\alpha$ -sinucleína agregada o fragmentos de la misma, incluyendo CNA, significa oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína o

15 fragmentos de la misma que se han asociado en ensamblajes de lámina  $\beta$  insolubles. La  $\alpha$ -sinucleína agregada o fragmentos de la misma, incluyendo CNA, significa también polímeros fibrilares. Las fibrillas son habitualmente insolubles. Algunos anticuerpos se unen a cualquiera de  $\alpha$ -sinucleína soluble o fragmentos de la misma o  $\alpha$ -sinucleína agregada o fragmentos de la misma. Algunos anticuerpos se unen a oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína más fuertemente que a formas monoméricas o formas fibrilares. Algunos anticuerpos se unen tanto a  $\alpha$ -sinucleína soluble como agregada

20 o fragmentos de las mismas, y opcionalmente a formas oligoméricas también.

Los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína humanos divulgados en la presente memoria se unen específicamente a  $\alpha$ -sinucleína y epítomos de la misma y a diversas conformaciones de  $\alpha$ -sinucleína y epítomos de la misma. Por ejemplo, se divulgan

25 en el presente documento anticuerpos que se unen específicamente a  $\alpha$ -sinucleína,  $\alpha$ -sinucleína en su forma monomérica nativa,  $\alpha$ -sinucleína de longitud completa y truncada y agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Como se usa en el presente documento, la referencia a un anticuerpo que «se une específicamente», «se une selectivamente» o «se une preferentemente» a  $\alpha$ -sinucleína hace referencia a un anticuerpo que no se une a otras proteínas no relacionadas. En un ejemplo, un anticuerpo de  $\alpha$ -sinucleína divulgado en el presente documento puede unirse a  $\alpha$ -sinucleína o un epítomo de la misma y no mostrar ninguna unión por encima de aproximadamente 1,5 veces el fondo para otras

30 proteínas. Un anticuerpo que «se une específicamente» o «se une selectivamente» a un confórmero de  $\alpha$ -sinucleína hace referencia a un anticuerpo que no se une a todas las conformaciones de  $\alpha$ -sinucleína, *es decir*, no se une al menos a otro confórmero de  $\alpha$ -sinucleína. Por ejemplo, se divulgan en el presente documento anticuerpos que pueden distinguir entre las formas monomérica y agregada de  $\alpha$ -sinucleína,  $\alpha$ -sinucleína humana y de ratón;  $\alpha$ -sinucleína de longitud completa y formas truncadas así como  $\alpha$ -sinucleína humana frente a  $\beta$  y  $\gamma$ -sinucleína. Puesto que los

35 anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína de la presente invención se han aislado de un grupo de sujetos de edad avanzada sin signos de parkinsonismo y exhiben una respuesta inmunitaria específica de  $\alpha$ -sinucleína, los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína de la presente invención pueden llamarse también «autoanticuerpos humanos» para enfatizar que esos anticuerpos se expresaron de hecho por los sujetos y no se han aislado, por ejemplo, de una colección de fagos que expresa inmunoglobulina humana, lo que hasta ahora representaba un procedimiento común para intentar

40 proporcionar anticuerpos de tipo humano.

El término «polinucleótido» pretende englobar un único ácido nucleico, así como varios ácidos nucleicos, y hace referencia a una molécula o constructo de ácido nucleico aislado, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace de fosfodiéster convencional o un enlace no

45 convencional (por ejemplo, un enlace de amida, tal como el encontrado en ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El término «ácido nucleico» hace referencia a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido «aislado» se pretende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un anticuerpo contenido en un vector se considera aislado con los fines de la presente

50 invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención incluyen además tales moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento de

55 regulación, tal como un promotor, sitio de unión a ribosomas, o un terminador de la transcripción.

Como se usa en el presente documento, una «región codificante» es una porción del ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un «codón de terminación» (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, pero cualesquiera secuencias flanqueantes, por

60 ejemplo promotores, sitios de unión a ribosoma, terminadores de la transcripción, intrones y similares, no son parte de

una región codificante. Dos o más regiones codificantes de la presente invención pueden estar presentes en un constructo de un único polinucleótido, por ejemplo, en un único vector, o en constructos de polinucleótido separados, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un único vector puede codificar por separado una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, un polinucleótido o un ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, ya sea fusionadas o no fusionadas a un ácido nucleico que codifica una molécula de unión, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado de los mismos. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.

En ciertas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente puede incluir un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción asociados operativamente con una o más regiones codificantes. Una asociación operativa es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras de tal forma como para poner la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la secuencia o secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tal como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con la misma) están «asociados de forma operativa» o «ligados de forma operativa» si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del grupo de enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interfiere con la capacidad del molde de ADN de transcribirse. Por tanto, una región promotora estaría asociada de forma operativa con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de células que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción aparte del promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden estar asociados de forma operativa con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de células. En el presente documento se divulgan promotores y otras regiones de control de la transcripción adecuados.

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

«Una molécula de unión» como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos.

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

Como se comentará en más detalle a continuación, el término «inmunoglobulina» comprende diversas clases amplias de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo,  $\gamma$ 1- $\gamma$ 4). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la «clase» del anticuerpo como IgG, IgM, IgA IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y es conocido que confieren una especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente distinguibles para el experto en la técnica en vista de la presente divulgación. El siguiente comentario se dirigirá generalmente a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula estándar de inmunoglobulina comprende dos polipéptidos idénticos de cadena ligera de peso molecular de aproximadamente 23.000 dáltones y dos polipéptidos idénticos de cadena pesada de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están típicamente unidas por enlaces de disulfuro en una configuración «Y», donde las cadenas ligeras agrupan las cadenas pesadas comenzando en la boca de la «Y» y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligera y pesada están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de «cola» de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por grupos de enlace covalentes de disulfuro o grupos de enlace no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, linfocitos B o células huésped genomanipuladas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos transcurren desde el extremo N-

terminal en los extremos bifurcados de la configuración Y al extremo C-terminal al final de cada cadena.

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

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

En anticuerpos de origen natural, un anticuerpo comprende seis regiones hipervariables, a veces denominadas «regiones determinantes de complementariedad» o «CDR», presentes en cada dominio de unión al antígeno, que son secuencias cortas no contiguas de aminoácidos que se colocan específicamente para formar el dominio de unión al antígeno a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. Las «CDR» están flanqueadas por cuatro regiones «marco» o «FR» relativamente conservadas que muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación de lámina  $\beta$  y las CDR forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina  $\beta$ . Por tanto, las regiones marco actúan formando un armazón que proporciona el posicionamiento de las CDR en una orientación correcta mediante interacciones intercatenarias no covalentes. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo cognado. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, se pueden identificar fácilmente por un experto en la técnica para determinar cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada, puesto que se han definido con precisión; véase, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», Kabat, E., y col., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917.

En el caso en que se usen y/o acepten en la técnica dos o más definiciones de un término, la definición del término como se usa en el presente documento pretende incluir todos estos significados, a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término «región determinante de complementariedad» («CDR») para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos encontrados dentro de la región variable de tanto los polipéptidos de cadenas pesadas como ligeras. Esta región particular se ha descrito por Kabat y col., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequences of Proteins of Immunological Interest» (1983) y por Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, donde las definiciones incluyen superposiciones o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de la definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o las variantes del mismo, pretende estar dentro del alcance del término, como se define y se usa en el presente documento. Los residuos de aminoácidos adecuados que engloban las CDR, como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la Tabla 1 como una comparación. Los números exactos de residuos que engloban una CDR en particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de manera rutinaria qué residuos comprenden una región hipervariable o CDR particular del subtipo de anticuerpo IgG humano dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

**Tabla 1:** Definiciones de CDR<sup>1</sup>

	<b>Kabat</b>	<b>Chothia</b>
CDR1 de $V_H$	31-35	26-32
CDR2 de $V_H$	50-65	52-58
CDR3 de $V_H$	95-102	95-102
CDR1 de $V_L$	24-34	26-32
CDR2 de $V_L$	50-56	50-52

CDR3 de VL	89-97	91-96
<sup>1</sup> La numeración de las definiciones de todas las CDR de la Tabla 1 es de acuerdo con las convenciones de numeración expuestas en Kabat y col. (véase a continuación).		

Kabat y col. también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que se aplica a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar sin ambigüedad este sistema de «numeración de Kabat» a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ninguna información experimental más allá de la propia  
5 secuencia. Como se usa en el presente documento, la «numeración de Kabat» hace referencia al sistema de numeración expuesto por Kabat y col., U.S. Dept. of Health and Human Services, «Sequence of Proteins of Immunological Interest» (1983). A menos que se especifique otra cosa, las referencias a la numeración de posiciones de residuo de aminoácido específicas en un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención son de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

10 Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, fragmentos inmuno-específicos, variantes o derivados de los mismos de la invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados, murinizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión a epítipo, *por ejemplo*, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs, Fv monocatenario (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv ligados  
15 por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VL o VH, fragmentos producidos mediante una colección de expresión de Fab, y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, p. ej., anticuerpos anti-Id de anticuerpos divulgados en el presente documento). Las moléculas de ScFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e  
20 IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención no es IgM o un derivado de la misma con una estructura pentavalente. En particular, en aplicaciones específicas de la presente invención, especialmente uso terapéutico, las  
25 IgM son menos útiles que las IgG y otros anticuerpos bivalentes o moléculas de unión correspondientes, puesto que las IgM, debido a su estructura pentavalente y falta de maduración de la afinidad, a menudo muestran reactividades cruzadas no específicas y muy baja afinidad.

El anticuerpo de la presente invención no es un anticuerpo policlonal, es decir, consiste sustancialmente en una especie de anticuerpo particular en vez de ser una mezcla obtenida de una muestra de inmunoglobulina en plasma.

30 Los fragmentos de anticuerpo, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención los fragmentos de unión a  $\alpha$ -sinucleína que también comprenden cualquier combinación de una o más regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

35 En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano aislado de un ser humano. Opcionalmente, la región marco del anticuerpo humano se alinea y se adopta de acuerdo con las secuencias de región variable de línea germinal humana pertinentes de la base de datos; véase, *por ejemplo*, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) alojada por el MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido). Por ejemplo, los  
40 aminoácidos que se considera que se desvían potencialmente de la verdadera secuencia de línea germinal podrían deberse a las secuencias de cebadores de PCR incorporadas durante el proceso de clonación. En comparación con anticuerpos de tipo humano generados artificialmente tales como fragmentos de anticuerpo monocatenarios (scFv) de una colección de anticuerpos de presentación en fagos o ratones xenogénicos, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención se caracteriza por (i) obtenerse usando la respuesta inmunitaria humana en lugar de la de  
45 sustitutos animales, es decir, el anticuerpo se ha generado en respuesta a  $\alpha$ -sinucleína natural en su conformación relevante en el cuerpo humano, (ii) haber protegido al individuo o ser al menos significativo por la presencia de  $\alpha$ -sinucleína, y (iii) puesto que el anticuerpo es de origen humano, los riesgos de reactividad cruzada contra autoantígenos se minimizan. Por tanto, de acuerdo con la presente invención los términos «anticuerpo monoclonal humano», «autoanticuerpo monoclonal humano», «anticuerpo humano» y similares, se usan para designar una  
50 molécula de unión a  $\alpha$ -sinucleína que es de origen humano, *es decir*, que se ha aislado de una célula humana tal como un linfocito B o hibridoma del mismo, o el ADNc del que se ha clonado directamente de ARNm de una célula humana, por ejemplo, un linfocito B de memoria humano. Un anticuerpo humano es aún «humano» incluso si se hacen sustituciones de aminoácidos en el anticuerpo, por ejemplo, para mejorar las características de unión.

55 Los anticuerpos que derivan de colecciones de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos de una o más inmunoglobulinas humanas, y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo en la patente de Estados Unidos n.º 5.939.598 por Kucherlapati y col., se designan anticuerpos de tipo humano

para distinguirlos de los anticuerpos verdaderamente humanos de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término «anticuerpo murinizado» o «inmunoglobulina murinizada» hace referencia a un anticuerpo que comprende una o más CDR de un anticuerpo humano de la presente invención; y una región marco humana que contiene sustituciones y/o deleciones y/o inserciones de aminoácidos que están basadas en una secuencia de anticuerpo de ratón. La inmunoglobulina humana que proporciona las CDR se denomina «parental» o «aceptora», y el anticuerpo de ratón que proporciona los cambios marco se denomina «donante». Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, habitualmente son sustancialmente idénticas a regiones constantes de anticuerpo de ratón, es decir, al menos idénticas en aproximadamente el 85-90 %, preferentemente aproximadamente el 95 % o más. Por ello, en algunas realizaciones, una inmunoglobulina de cadena pesada o ligera humana murinizada de longitud completa contiene una región constante de ratón, CDR humanas y un marco sustancialmente humano que tiene una serie de sustituciones de aminoácidos «murinizantes». Típicamente, un «anticuerpo murinizado» es un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable murinizada y/o una cadena pesada variable murinizada. Por ejemplo, un anticuerpo murinizado no englobaría un anticuerpo quimérico típico, por ejemplo, debido a que la región variable entera de un anticuerpo quimérico no es de ratón. Un anticuerpo modificado que se ha «murinizado» mediante el proceso de «murinización» se une al mismo antígeno que el anticuerpo parental que proporciona las CDR y es habitualmente menos inmunógeno en ratones, en comparación con el anticuerpo parental.

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

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

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

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

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

Se considera que el tamaño mínimo de un epítipo de péptido o polipéptido para un anticuerpo debe ser de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítipos de péptido o polipéptido pueden contener preferentemente al menos siete, más preferentemente al menos nueve y lo más preferentemente entre al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. Puesto que una CDR puede reconocer un péptido o

polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos, y en algunos casos, pueden incluso no estar en la misma cadena de péptidos. En la presente invención, un epítipo de péptido o polipéptido reconocido por anticuerpos de la presente invención contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferentemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o entre aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de  $\alpha$ -sinucleína.

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

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

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

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

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

Puede decirse que una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado divulgado en el presente documento, se une a  $\alpha$ -sinucleína o un fragmento o variante de la misma con una tasa de disociación ( $k(\text{off})$ ) menor o igual a  $5 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  o  $10^{-3} \text{s}^{-1}$ . Más preferentemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a  $\alpha$ -sinucleína o un fragmento o variante de la misma con una tasa de disociación ( $k(\text{off})$ ) menor o igual a  $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ , o  $10^{-5} \text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$  o  $10^{-7} \text{s}^{-1}$ .

Puede decirse que una molécula de unión, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado divulgado en el presente documento se une a  $\alpha$ -sinucleína o un fragmento o variante de la misma con una tasa de asociación ( $k(\text{on})$ ) mayor o igual a  $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  o  $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Más preferentemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a  $\alpha$ -sinucleína o un fragmento o variante de la misma con una tasa de asociación ( $k(\text{on})$ ) mayor o igual a  $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , o  $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  o  $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

Se dice que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferentemente a ese epítipo en la medida en que bloquea, en cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo ensayos de ELISA de competición. Puede decirse que un anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 % o al menos un 50 %.



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

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

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

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

Como se indica previamente, se conocen bien las estructuras de subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término «dominio  $V_H$ » incluye el dominio variable de extremo amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término «dominio  $CH_1$ » incluye el primer (extremo más amino) dominio de región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio  $CH_1$  es adyacente al dominio  $V_H$  y es amino terminal a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, el término «dominio  $CH_2$ » incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 al residuo 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración de la UE; véase Kabat EA y col. *op. cit.*). El dominio  $CH_2$  es único en el sentido que no está íntimamente emparejado con otro dominio. En cambio, dos cadenas de carbohidratos ramificados ligadas por N se interponen entre los dos dominios  $CH_2$  de una molécula de IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio  $CH_3$  se extiende desde el dominio  $CH_2$  al extremo C-terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

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

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

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

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

Como se usa en el presente documento, los términos «tratar» o «tratamiento» hacen referencia tanto a tratamiento terapéutico como a medidas preventivas y profilácticas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio fisiológico o trastorno no deseado, tal como el desarrollo del parkinsonismo. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de síntomas, reducción del alcance de enfermedad, estabilización del estado de la enfermedad (es decir, que no empeora), demora o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o mitigación de la patología, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. «Tratamiento» también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en caso de no recibir tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o el trastorno, así como aquellos propensos a padecer la afección o el trastorno o aquellos en los que se quiere prevenir la manifestación de la afección o trastorno.

Se entiende por «sujeto», «individuo», «animal», «paciente» o «mamífero» cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, por ejemplo, un paciente humano, para el cual se desea diagnóstico, pronóstico, prevención o terapia.

## II. Anticuerpos

La presente invención se refiere generalmente a anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína humanos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos como se caracterizan en la reivindicaciones, que preferentemente demuestran las características de unión inmunológica y/o propiedades biológicas como se esbozan para el anticuerpo NI-202.12F4 ilustrado en los Ejemplos. De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos monoclonales humanos específicos de  $\alpha$ -sinucleína se clonaron a partir de un grupo de sujetos ancianos sanos.

En el transcurso de los experimentos efectuados de acuerdo con la presente invención, los intentos iniciales no lograron clonar anticuerpos específicos de  $\alpha$ -sinucleína pero casi siempre dieron como resultado clones de falso positivo. La investigación adicional de estos clones reveló que producían anticuerpos que reconocen proteínas de *E. coli*. Para evitar este problema, los anticuerpos en medio acondicionado de cultivos de linfocitos B de memoria humanos se cribaron en paralelo para determinar la unión al monómero de alfa-sinucleína de longitud completa recubierta y la ausencia de unión a proteínas de *E. coli* y seroalbúmina bovina (BSA). En particular, el medio acondicionado de linfocitos B se preabsorbió con proteínas de *E. coli* antes de someter el medio a un ensayo ELISA para cribar la unión de  $\alpha$ -sinucleína a anticuerpos humanos.

10

Los intentos iniciales de aislamiento de anticuerpos específicos se centraron en grupos de sujetos humanos con alta actividad de unión plasmática a  $\alpha$ -sinucleína, lo que sugiere niveles elevados de plasma con anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína circulantes. Inesperadamente, estos intentos de producir linfocitos B de memoria humanos específicos de  $\alpha$ -sinucleína fracasaron, y los anticuerpos descritos en la actual invención se aislaron de grupos de sujetos con baja reactividad plasmática con  $\alpha$ -sinucleína.

15

Debido a esta medida, pudieron aislarse varios anticuerpos. Los anticuerpos seleccionados se analizaron adicionalmente para determinar la clase y subclase de cadena ligera. Los mensajes de anticuerpos relevantes seleccionados de cultivos de linfocitos B de memoria se transcriben entonces por RT-PCR, se clonan y se combinan en vectores de expresión para la producción recombinante; véanse los Ejemplos adjuntos. La expresión recombinante de los anticuerpos humanos en células HEK293 o CHO y la posterior caracterización de sus especificidades de unión hacia  $\alpha$ -sinucleína de longitud completa y formas truncadas de la misma (Fig. 2) en transferencia Western (Fig. 4), así como a  $\beta$  y  $\gamma$ -sinucleína (Fig. 3), confirmó que se han clonado los primeros anticuerpos humanos que son altamente específicos de  $\alpha$ -sinucleína y reconocen diferentes epítomos en la proteína  $\alpha$ -sinucleína.

20

25

Por tanto, la presente invención se refiere generalmente a un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -sinucleína humano y a fragmentos de unión, derivados y variantes del mismo caracterizados en las reivindicaciones. Como se demuestra en los Ejemplos y se muestra en la Fig. 3, el anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -sinucleína humano de la presente invención se caracteriza por unirse específicamente a  $\alpha$ -sinucleína en comparación con  $\beta$ -sinucleína y  $\gamma$ -sinucleína. Ventajosamente, el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a  $\alpha$ -sinucleína en forma oligomérica o agregada. Además, el anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína humano de la presente invención puede caracterizarse adicionalmente por su capacidad de reconocer  $\alpha$ -sinucleína en transferencia Western, véase la Fig. 4.

30

En una realización, la presente invención se dirige a un anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivados del mismo, donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítomo de  $\alpha$ -sinucleína que el anticuerpo de referencia NI-202.12F4. Como se ilustra en los Ejemplos, el anticuerpo NI-202.3G12 se une a  $\alpha$ -sinucleína de tipo silvestre (wt) pero no a truncamientos de  $\alpha$ -sinucleína en un ensayo ELISA directo, apuntando a un epítomo estructural de NI-202.3G12; véase la Fig. 2A. En contraposición, el anticuerpo NI-202.12F4 se une a truncamientos de  $\alpha$ -sinucleína que contienen una región de repetición anfipática N-terminal (aminoácidos 1-60) en un ensayo ELISA directo, apuntando a un epítomo N-terminal de NI-202.12F4; véase la Fig. 2B. Además, los resultados preliminares de ensayos ELISA directos efectuados con anticuerpo NI-202.3D8 revelaron que NI-202.3D8 reconoce específicamente el extremo C de la  $\alpha$ -sinucleína, preferentemente los aminoácidos 96-140.

35

40

Además, sin pretender limitarse a las observaciones experimentales iniciales, experimentos preliminares adicionales dan lugar a suponer que el anticuerpo NI-202.3D8 se une preferentemente a monómero de  $\alpha$ -sinucleína en lugar de fibrillas en un ensayo de anticuerpo ELISA directo, mientras que los anticuerpos NI-202.12F4 y NI-202.3G12 se unen preferentemente a agregados o fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína frente a la forma monomérica de  $\alpha$ -sinucleína. Por ello, la presente invención proporciona un conjunto de anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína humanos con especificidades diferentes, que son, por tanto, particularmente útiles con fines de diagnóstico y terapéutico.

45

En una realización, el anticuerpo de la presente invención exhibe las propiedades de unión del anticuerpo NI-202.12F4 ejemplar como se describe en uno cualquiera de los Ejemplos 1 a 5. Por ejemplo, en una realización el anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína de la presente invención reconoce preferentemente  $\alpha$ -sinucleína humana en lugar de ratón, en particular cuando se analiza de acuerdo con el Ejemplo 3. Además, o como alternativa, un anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína de la presente invención reconoce preferentemente formas agregadas o mal plegadas de  $\alpha$ -sinucleína en lugar de formas monoméricas fisiológicas, en particular cuando se analiza de acuerdo con el Ejemplo 3. Además, o como alternativa, el anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína de la presente invención se une a mutantes de  $\alpha$ -sinucleína humana causantes de enfermedades, en particular las descritas en el Ejemplo 3. En este contexto, las especificidades de unión pueden estar en el intervalo como se muestra para el anticuerpo NI-202.12F4 ejemplar en la Fig. 5, es decir, que tienen concentraciones eficaces semimáximas (CE50) de aproximadamente 100 a 1000 pM, preferentemente una

50

60

CE50 de aproximadamente 100 a 500 pM para  $\alpha$ -sinucleína de tipo silvestre o un mutante causante de enfermedades de la misma.

5 Por ello, un anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína de la presente invención se une preferentemente a formas patológicas modificadas de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro, por ejemplo, agregados patológicos de  $\alpha$ -sinucleína como se ejemplifica por transferencia Western y tinción inmunohistoquímica descritas en el Ejemplo 3. Por consiguiente, en otra realización adicional o alternativa, el anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína de la presente invención se une preferentemente a un epítipo conformacional de  $\alpha$ -sinucleína humana y no se une significativamente a fragmentos derivados N-terminales de  $\alpha$ -sinucleína consistentes en los aminoácidos 1-20, 21-40, 41-60, 11-30 o 31-50.

10 La presente invención está también guiada a un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivados del mismo, donde el anticuerpo comprende un dominio de unión al antígeno idéntico al del anticuerpo NI-202.12F4.

15 La presente invención ejemplifica además varias de tales moléculas de unión, p.ej. anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, que pueden caracterizarse por comprender en su región variable, p.ej., un dominio de unión a la región determinante de complementariedad (CDR) de la región variable  $V_H$  y  $V_L$  que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 13 representadas en la Fig. 1B. Las secuencias de nucleótidos correspondientes que codifican las regiones variables identificadas anteriormente se exponen en el listado de secuencias adjunto. Un ejemplo de conjunto de CDR de las secuencias de aminoácidos anteriores de la región  $V_H$  20 y  $V_L$  como se representa en la Fig. 1B se indica también en el listado de secuencias anexo. Sin embargo, como se comenta a continuación, el experto en la técnica es consciente del hecho de que, además o como alternativa, pueden usarse CDR que difieren en su secuencia de aminoácidos de las expuestas en la Fig. 1B por uno, dos, tres o incluso más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3.

25 En una realización, el anticuerpo de la presente invención es uno cualquiera de los anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de la región  $V_H$  y  $V_L$  como se representa en la Fig. 1B. Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, derivado o variante del mismo que compete por la unión a  $\alpha$ -sinucleína con al menos uno de los anticuerpos que tienen la región  $V_H$  y  $V_L$  como se representa en la Fig. 1B. Esos anticuerpos pueden ser también humanos, en particular para aplicaciones terapéuticas. Como 30 alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo de murino, murinizado y quimérico murino-humano, que son particularmente útiles para procedimientos de diagnóstico y estudios en animales.

Como se ha mencionado anteriormente, debido a su generación tras una respuesta inmunitaria humana, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención reconocerá epítopos que son de importancia fisiológica particular y que 35 podrían no ser accesibles o menos inmunógenos en el caso de procesos de inmunización para la generación de, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón y el cribado *in vitro* de colecciones de presentación en fagos, respectivamente. Por consiguiente, es prudente estipular que el epítipo del anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína humano de la presente invención es único y no existe ningún otro anticuerpo que sea capaz de unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención se extiende también 40 generalmente a anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína y moléculas de unión a  $\alpha$ -sinucleína que compiten con el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención por la unión específica a  $\alpha$ -sinucleína. La presente invención está dirigida más específicamente a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivados del mismo, donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo de  $\alpha$ -sinucleína que el anticuerpo de referencia NI-202.12F4.

45 La competencia entre anticuerpos se determina por un ensayo en el que la inmunoglobulina bajo prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como  $\alpha$ -sinucleína. Son conocidos numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición en sándwich; véase 50 Stahli y col., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; EIA de biotina-avidina directo de fase sólida; véanse Kirkland y col., *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 y Cheung y col., *Virology* 176 (1990), 546-552; ensayo marcado de fase sólida, ensayo de tipo sándwich marcado directo de fase sólida; véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA marcado directo de fase sólida usando el marcaje  $^{125}$ ; véase Morel y col., *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 y Moldenhauer y col., *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Típicamente, tal ensayo implica el uso de  $\alpha$ -sinucleína purificada o agregados de la misma unidos a una superficie sólida o células 55 portadoras de cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada, es decir, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. La inhibición competitiva se mide mediante la determinación de la cantidad de marcaje unida a la superficie sólida o las células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Habitualmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Preferentemente, el ensayo de unión competitiva se efectúa en condiciones como se describe para el ensayo ELISA en los Ejemplos 60 adjuntos. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competición (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos

que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente lo suficientemente cercano al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que tenga lugar el impedimento estérico. Habitualmente, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos el 50 % o el 75 %. Por ello, la presente invención está adicionalmente guiada a un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivados del mismo, donde el anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia NI-202.12F4 a  $\alpha$ -sinucleína.

Una inmunoglobulina o su ADNc codificante se puede modificar adicionalmente. Por tanto, en una realización adicional, el procedimiento de la presente invención comprende una cualquiera de la etapa o etapas de producción de un anticuerpo quimérico, anticuerpo murinizado, anticuerpo monocatenario, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo marcado o un análogo de uno cualquiera de ellos. Son conocidos por el experto en la técnica los procedimientos correspondientes y se describen, *p. ej.* en Harlow and Lane «Antibodies, A Laboratory Manual», CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Cuando los derivados de dichos anticuerpos se obtienen mediante la técnica de presentación en fagos, se puede usar la resonancia de plasmón superficial, como se emplea en el sistema BIAcore, para aumentar la eficiencia de los anticuerpos de fagos que se unen al mismo epítipo que el de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO89/09622. Los procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados se describen, *p. ej.*, en la solicitud europea EP-A1 0 239 400 y la solicitud internacional WO90/07861.

Una fuente adicional de anticuerpos a utilizar de acuerdo con la presente invención son los anticuerpos denominados xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos de tipo humano en ratones se describe en, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 y WO 96/33735. Como se ha comentado anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en una variedad de formas aparte de anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como en cadenas únicas; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO88/09344.

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

La presente invención se refiere a cualquier molécula de unión, *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento de unión al mismo que está orientado hacia anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína humanos de la presente invención y presenta las propiedades mencionadas, es decir que reconoce específicamente  $\alpha$ -sinucleína. En tales anticuerpos y moléculas de unión se puede ensayar su especificidad y afinidad de unión mediante ELISA y transferencia Western e inmunohistoquímica, como se describe en el presente documento, véanse, por ejemplo, los Ejemplos. Además, los resultados preliminares de experimentos posteriores efectuados de acuerdo con la presente invención revelaron que el anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína humanos de la presente invención, en particular el anticuerpo NI-202.12F4, reconoce los cuerpos de inclusión de  $\alpha$ -sinucleína presentes en secciones de cerebro humano de pacientes que padecían demencia con cuerpos de Lewy (DCL) o enfermedad de Parkinson (EP). Por tanto, en una realización preferida particular de la presente invención, el anticuerpo humano o fragmento de unión, derivado o variante del mismo, reconoce  $\alpha$ -sinucleína en secciones del cerebro humano con DCL o EP.

Como una alternativa para obtener inmunoglobulinas directamente del cultivo de linfocitos B inmortalizados o linfocitos B de memoria, las células inmortalizadas se pueden usar como una fuente de loci de cadena pesada y cadena ligera reorganizados para la expresión y/o la genomanipulación. Los genes de anticuerpo reorganizados se pueden transcribir de manera inversa a partir de ARNm apropiados para producir ADNc. Si se desea, la región constante de cadena pesada se puede intercambiar por la de un isotipo diferente o se puede eliminar en su totalidad. Las regiones variables se pueden ligar para codificar regiones Fv monocatenarias. Se pueden ligar múltiples regiones Fv para

conferir capacidad de unión a más de una diana o se pueden emplear combinaciones de cadena pesada y ligera quiméricas. Una vez que se encuentra disponible el material genético, es sencillo el diseño de análogos como se ha descrito anteriormente que retienen tanto su capacidad para unirse a la diana deseada. Los procedimientos para la clonación de regiones variables de anticuerpo y la generación de anticuerpos recombinantes son conocidos por el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Gilliland y col., *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke y col., *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

Una vez que se obtiene el material genético apropiado, y si se desea, se modifica para codificar un análogo, las secuencias codificantes, incluidas las que codifican, como mínimo, las regiones variables de cadena pesada y ligera, se pueden insertar en sistemas de expresión contenidos en vectores que se pueden transfectar en células huésped recombinantes estándares. Se puede usar una variedad de tales células huésped; sin embargo, para un procesamiento eficiente, se prefieren células de mamífero. Las líneas celulares de mamífero típicas útiles con este fin incluyen, pero sin limitación, células CHO, células HEK 293 o células NSO.

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

De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere también a un polinucleótido que codifica un anticuerpo o molécula de unión equivalente de la presente invención, en el caso del anticuerpo preferentemente al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. Típicamente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de  $V_H$  y  $V_L$  de la región variable de dicho anticuerpo.

El experto en la técnica apreciará fácilmente que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable descrito anteriormente se puede usar para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad y función biológica deseadas. Por tanto, la presente invención también engloba polipéptidos y anticuerpos que comprenden al menos una CDR del dominio variable descrito anteriormente y que tienen de forma ventajosa sustancialmente las mismas propiedades de unión o similares a las del anticuerpo descrito en los ejemplos adjuntos. El experto en la técnica sabe que la afinidad de unión se puede potenciar haciendo sustituciones de aminoácidos dentro de las CDR o dentro de los bucles hipervariables (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917) que se superponen parcialmente con las CDR como se define por Kabat; véase, por ejemplo, Riechmann, y col., *Nature* 332 (1988), 323-327. Por tanto, la presente invención se refiere también a anticuerpos donde una o más de las CDR mencionadas comprenden una o más, preferentemente no más de dos sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, el anticuerpo de la invención comprende, en una o ambas de sus cadenas de inmunoglobulina, dos o las tres CDR de las regiones variables como se expone en la Fig. 1B.

Las moléculas de unión, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención, como es conocido por los expertos en la técnica, pueden comprender una región constante que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante del anticuerpo puede activar el sistema de complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de patógenos celulares. La activación del complemento estimula también la respuesta inflamatoria y puede estar implicada también en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a receptores en diversas células mediante la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une al receptor Fc (FcR) en una célula. Existen una serie de receptores Fc que son específicos de diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc sobre las superficies celulares desencadena una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la envoltura y destrucción de partículas recubiertas por anticuerpos, la depuración de complejos inmunitarios, la lisis de células diana recubiertas por anticuerpos mediante linfocitos citotóxicos (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia de placenta y el control de la producción de inmunoglobulina.

Por consiguiente, ciertas realizaciones de la presente invención incluyen un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, en el que al menos una fracción de uno o más dominios de regiones constantes se ha eliminado o alterado de otro modo para proporcionar las características bioquímicas deseadas, tales como funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerizar de forma no covalente, la capacidad aumentada de localizarse en el sitio de agregación y deposición de  $\alpha$ -sinucleína, una semivida sérica reducida, o una semivida sérica aumentada en comparación con un anticuerpo completo sin alteración de aproximadamente la misma

inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos para uso en procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento son anticuerpos de dominio eliminado que comprenden una cadena polipeptídica similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará todo o parte del dominio CH2. En otras realizaciones, ciertos anticuerpos para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento tienen una región constante, p. ej., una región constante de cadena pesada de IgG, que está alterada para eliminar la glicosilación, a los que se hace referencia en otro lugar del presente documento como anticuerpos aglicosilados o «agli». Dichos anticuerpos «agli» se pueden preparar enzimáticamente, así como mediante la genomanipulación de uno o más sitios de glicosilación de consenso en la región constante. Aún sin limitarse por la teoría, se cree que los anticuerpos «agli» pueden tener una seguridad y estabilidad *in vivo* mejoradas. Se encuentran procedimientos de producción de anticuerpos aglicosilados que tienen la función efectora deseada, por ejemplo, en la solicitud internacional WO2005/018572.

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

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en el presente documento, la porción Fc se puede mutar o intercambiar por secuencias de proteína alternativas para aumentar la captación celular de anticuerpos, a modo de ejemplo potenciando la endocitosis mediada por receptor de anticuerpos a través de los receptores Fc $\gamma$ , LRP, o receptores Thy1 o mediante «Tecnología de SuperAnticuerpos», que se dice que permite trasladar anticuerpos a células vivas sin dañarlas (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Por ejemplo, la generación de las proteínas de fusión de la región de unión al anticuerpo y los ligandos de proteínas cognados de los receptores de superficie celular o anticuerpos bi- o multiespecíficos con una unión de secuencias específicas a  $\alpha$ -sinucleína, así como un receptor de superficie celular se pueden genomanipular usando técnicas conocidas en la técnica.

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

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

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

En realizaciones particulares preferidas, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de

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

La desinmunización se puede usar también para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término «desinmunización» incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítomos de linfocitos T; véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO98/52976 y WO00/34317. Por ejemplo, se analizan las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo de partida y un «mapa» epitópico de linfocitos T humanos de cada región V que muestra la localización de los epítomos en relación con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Se analizan los epítomos de linfocitos T individuales del mapa epitópico de linfocitos T para identificar las sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseñan un intervalo de secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y se incorporan posteriormente estas secuencias a un intervalo de polipéptidos de unión, p. ej., anticuerpos específicos de  $\alpha$ -sinucleína o fragmentos inespecíficos de los mismos para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento, de los que se ensaya entonces la función. Típicamente, se generan y se ensayan entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Se clonan entonces genes completos de cadena pesada y ligera que comprenden regiones modificadas V y C humanas en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpos completos. Se comparan entonces los anticuerpos en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridomas, incluyendo las conocidas en la técnica y descritas, por ejemplo, en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). El término «anticuerpo monoclonal», como se usa en el presente documento, no se limita a los anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridomas. El término «anticuerpo monoclonal» hace referencia a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico, o fágico, y no al procedimiento mediante el cual se produce. Por tanto, el término «anticuerpo monoclonal» no se limita a los anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridomas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención derivan de linfocitos B humanos que se han inmortalizado a través de transformación con virus Epstein-Barr, como se describe en el presente documento.

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

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



En otra realización, los linfocitos se pueden seleccionar por micromanipulación y los genes variables se aíslan. Por ejemplo, pueden aislarse células mononucleares de sangre periférica de un mamífero inmunizado o naturalmente inmune, p. ej., un ser humano, y cultivarse durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Pueden cribarse en los cultivos las IgG específicas que satisfacen los criterios de cribado. Las células de pocillos positivos se pueden aislar. Los linfocitos B productores de Ig individuales se pueden aislar por FACS o identificándolos en un ensayo de placa hemolítica mediado por complemento. Los linfocitos B productores de Ig se pueden micromanipular en un tubo y los genes  $V_H$  y  $V_L$  se pueden amplificar usando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes  $V_H$  y  $V_L$  pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpos y transfectarse en células (por ejemplo, células eucariotas o procariotas) para su expresión.

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

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen los epítomos específicos se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y  $F(ab')_2$  se pueden producir de forma recombinante o mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaina (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos  $F(ab')_2$ ). Los fragmentos  $F(ab')_2$  contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Tales fragmentos son suficientes para su uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que implican acoplar las porciones inmunes específicas de inmunoglobulinas para detectar reactivos tales como radioisótopos.

Los anticuerpos completamente humanos, tales como se describen en el presente documento, se desean particularmente para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos de la presente invención se aíslan, por ejemplo, de sujetos de edad avanzada quienes, dada su edad, puede sospecharse que corren el riesgo de desarrollar un trastorno, p. ej., enfermedad de Parkinson, o de un paciente con el trastorno pero con un curso de la enfermedad inusualmente estable. Sin embargo, aunque es prudente esperar que los sujetos de edad avanzada, sanos y sin síntomas, respectivamente, desarrollarán anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína protectores más regularmente que los sujetos más jóvenes, estos últimos se pueden usar también como fuente para obtener un anticuerpo humano de la presente invención. Esto es particularmente verdadero para los pacientes más jóvenes que están predispuestos a desarrollar una forma familiar de una enfermedad sinucleopática, pero que permanecen sin síntomas puesto que su sistema y respuesta inmunitarios funcionan más eficientemente que en los adultos mayores.

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

En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una región constante sintética donde uno o más dominios se eliminan parcial o completamente («anticuerpos de dominio eliminado»). En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán constructos de dominio eliminado o variantes donde se ha eliminado todo el dominio CH2 (constructos  $\Delta$ CH2). Para otras realizaciones, un péptido conector corto puede sustituir al dominio eliminado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento para la región variable. Los expertos en la técnica apreciarán que tales constructos se prefieren particularmente debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 sobre el índice catabólico del anticuerpo. Los constructos eliminados del dominio pueden derivarse usando un vector que codifica un dominio constante humano de IgG<sub>1</sub>, véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO02/060955 y WO02/096948A2. Este vector está genomanipulado para eliminar el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que exprese un dominio eliminado de la región constante de IgG<sub>1</sub>.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente invención son minicuerpos. Los minicuerpos pueden elaborarse usando procedimientos descritos en la técnica, véanse, p. ej., la patente de Estados Unidos 5.837.821o la solicitud internacional WO 94/09817.

En una realización, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene delección o sustitución de algunos o incluso un único aminoácido siempre y cuando permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente como para reducir sustancialmente

- la unión de Fc y aumentar de este modo la localización de  $\alpha$ -sinucleína. De manera similar, puede ser deseable eliminar simplemente esa parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión de complemento) a modular. Tales deleciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida sérica) mientras se dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante en cuestión. Además, como se ha mencionado anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos divulgados pueden ser sintéticas a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos, lo que potencia el perfil del constructo resultante. En este sentido, puede ser posible la interrupción de la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, la unión de Fc) mientras se mantienen de manera sustancial la configuración y el perfil inmunógeno del anticuerpo modificado. Todavía otras realizaciones comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar las características deseables, tales como la función efectora, o proporcionar un enlace de más citotoxinas o carbohidratos. En tales realizaciones, puede ser deseable la inserción o replicación de secuencias específicas derivadas de los dominios de región constante seleccionados.
- 15 La presente invención proporciona también anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (p. ej., las regiones  $V_H$  y/o regiones  $V_L$ ) descritas en el presente documento, uniéndose inmunoespecíficamente dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos a  $\alpha$ -sinucleína. Pueden usarse técnicas estándares conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo incluyendo, pero sin limitación, mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR, lo que da como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos respecto a la región  $V_H$ ,  $V_H$ -CDR1,  $V_H$ -CDR2,  $V_H$ -CDR3, región  $V_L$ ,  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2, o  $V_L$ -CDR3 de referencia. Una «sustitución de aminoácidos conservadora» es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como mediante mutagénesis de saturación, y puede cribarse en los mutantes resultantes la actividad biológica para identificar mutantes que retienen actividad (p. ej., la capacidad de unirse a  $\alpha$ -sinucleína).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solo en regiones marco o solo en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones de aminoácido silenciosas o neutras, por ejemplo, no tienen efecto o tienen poco efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno, de hecho algunas de estas mutaciones no alteran la secuencia de aminoácidos de ninguna forma. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones, o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Las regiones codificantes optimizadas de codones que codifican anticuerpos de la presente invención se divulgan en otra parte en el presente documento. Como alternativa, las mutaciones de aminoácido no neutras pueden alterar la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Es probable que la localización de la mayoría de las mutaciones de aminoácido silenciosas y neutras sea en las regiones marco, mientras que es probable que la localización de la mayoría de las mutaciones de aminoácido no neutras sea en CDR, pese a que este no es un requisito absoluto. Un experto en la técnica será capaz de diseñar y ensayar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como actividad de unión al antígeno sin alteración, o con alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma rutinaria y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad de unirse inmunoespecíficamente al menos a un epítipo de  $\alpha$ -sinucleína) se puede determinar usando técnicas descritas en el presente documento o modificando rutinariamente técnicas conocidas en la técnica.

55

### III. Polinucleótidos que codifican anticuerpos

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, puede estar compuesto por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de

60

unión al antígeno, variante o derivado del mismo, puede estar compuesto por un ADN monocatenario o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias o bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias.

- 5 Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, puede estar compuesto por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo también puede contener una o más bases modificadas o esqueletos de ADN o ARN modificados por estabilidad o por otras razones. Las bases «modificadas» incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se  
10 pueden hacer una variedad de modificaciones a ADN y ARN; por tanto, «polinucleótido» abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

Un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, una porción de cadena pesada o una porción de cadena ligera de inmunoglobulina) se puede crear por la  
15 introducción de una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de tal forma que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas estándares, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, las sustituciones de aminoácido conservativas se realizan en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales.

20 Como es bien sabido, el ARN se puede aislar de los linfocitos B originales, células de hibridoma o de otras células transfectadas por técnicas estándares, tales como extracción con isotiocianato de guanidina y precipitación seguida de centrifugación o cromatografía. Cuando sea deseable, el ARNm se puede aislar del ARN total por técnicas estándares tales como cromatografía en oligo dT-celulosa. Se conocen en la técnica las técnicas adecuadas. En una  
25 realización, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo pueden elaborarse, simultánea o separadamente, usando transcriptasa inversa y ADN polimerasa de acuerdo con procedimientos bien conocidos. La PCR se puede iniciar por cebadores de región constante de consenso o por cebadores más específicos basados en las secuencias publicadas de ADN y aminoácidos de cadena pesada y ligera. Como se ha comentado anteriormente, la PCR también se puede usar para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de anticuerpos.  
30 En este caso, se pueden cribar las colecciones por cebadores de consenso o sondas homólogas más grandes tales como sondas de región constante humana.

El ADN, típicamente ADN plasmídico, se puede aislar de las células usando técnicas conocidas en la técnica, cartografiarse por restricción y secuenciarse de acuerdo con técnicas estándares bien conocidas, expuestas en detalle,  
35 por ejemplo, en las referencias anteriores con respecto a las técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético de acuerdo con la presente invención en cualquier momento durante el proceso de aislamiento o el posterior análisis.

En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido comprende, consiste esencialmente en, o  
40 consiste en un ácido nucleico que tiene una secuencia polinucleotídica de la región V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> de un anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína como se expone en las SEQ ID NO: 8 u 11. En este sentido, el experto en la técnica apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar el dominio variable de ambas cadenas de inmunoglobulina o solo de una.

45 La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en otra parte. Adicionalmente, los polinucleótidos que codifican los polinucleótidos de fusión, fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en el presente documento, también se contemplan por la invención.

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

55 Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo se puede generar a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero la secuencia de la molécula del anticuerpo es conocida, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente  
60 adecuada (por ejemplo, una colección de ADNc de anticuerpo, o una colección de ADNc generada a partir de, o ácido

nucleico, preferentemente poliA<sup>+</sup>ARN, aislado de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo específico de  $\alpha$ -sinucleína, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) por amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridarse en los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica de la secuencia génica particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc a partir de una colección de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden entonces clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier procedimiento bien conocido en la técnica.

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

#### IV. Expresión de polipéptidos de anticuerpo

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

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

En realizaciones particularmente preferidas, los genes de región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de región constante de cadena pesada y ligera (preferentemente humanos) como se ha comentado anteriormente. En una realización, esto se efectúa usando un vector de expresión patentado de Biogen

IDEC, Inc., al que se hace referencia como NEOSPLA, divulgado en la patente de Estados Unidos n.º 6.159.730. Este vector contiene el promotor/potenciador de citomegalovirus, el promotor principal de beta globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, exón 1 y exón 2 de fosfotransferasa de neomicina, el gen y la secuencia líder de dihidrofolato reductasa. Se ha encontrado que este vector da como resultado un nivel muy alto de expresión de anticuerpos tras la incorporación de genes de región variable y constante, la transfección en células CHO, seguido de la selección en medio que contiene G418 y amplificación con metotrexato. Por supuesto, en la presente invención se puede usar cualquier vector de expresión que sea capaz de provocar la expresión en células eucariotas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero sin limitación, los plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, y pZeoSV2 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA), y plásmido pCI (disponible en Promega, Madison, WI). En general, el cribado en grandes números de células transformadas de aquellas que expresan niveles adecuadamente altos de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina es experimentación de rutina que se puede llevar a cabo, por ejemplo, por sistemas robóticos. Los sistemas de vector también se enseñan en las patentes de Estados Unidos n.º 5.736.137y5.658.570, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad en el presente documento. Este sistema proporciona altos niveles de expresión, por ejemplo, >30 pg/célula/día. Otros sistemas de vector ejemplares se divulgan, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.413.777.

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

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

Se transfiere el vector de expresión a una célula huésped por técnicas convencionales y se cultivan entonces las células transfectadas por técnicas convencionales, produciendo un anticuerpo para uso en los procedimientos descritos en el presente documento. Por tanto, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, ligado operativamente a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, en la célula huésped se pueden coexpresar vectores que codifican las cadenas tanto pesada como ligera para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

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

Como se usa en el presente documento, «célula huésped» hace referencia a células que alojan vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procesos para el aislamiento de anticuerpos de huéspedes recombinantes, los términos «célula» y «cultivo celular» se usan de manera intercambiable para designar la fuente de anticuerpo a menos que se especifique claramente otra cosa. En

otras palabras, la recuperación de polipéptidos de las «células» puede significar de células enteras centrifugadas, o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

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

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

Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, se pueden usar células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glucosilación, y la fosforilación del producto génico.

Para una producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, se pueden genomanipular líneas celulares que expresan de forma estable la molécula del anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, secuencias potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células genomanipuladas crezcan durante 1-2 días en unos medios enriquecidos, y a continuación se cambian a unos medios selectivos. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y que crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este procedimiento se puede usar de manera ventajosa para genomanipular líneas celulares que expresen de manera estable la molécula del anticuerpo.

Se pueden usar una serie de sistemas de selección que incluyen, pero sin limitación, timidina cinasa del herpesvirus simple (Wigler y col., Cell 11 (1977), 223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc.

- Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202), y pueden emplearse genes de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col., Cell 22 (1980), 817) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, la resistencia anti-metabolito se puede usar como la base de selección de los siguientes genes: dhfr que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 Goldspiel y col., Clinical Pharmacy 12 (1993), 488-505; Wu y Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 (1993), 573-596; Mulligan, Science 260 (1993), 926-932; y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre y col., Gene 30 (1984), 147. Se describen procedimientos conocidos comúnmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse en Ausubel y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin y col., J. Mol. Biol. 150:1 (1981).
- 15 Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden aumentar por amplificación de vectores, para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, Nueva York, Vol. 3. (1987). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de célula huésped hará que aumente el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada al gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo; véase Crouse y col., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257. La producción *in vitro* permite el aumento de escala para dar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. En la técnica se conocen técnicas de cultivo de células de mamíferos en condiciones de cultivo de tejidos, e incluyen el cultivo de suspensiones homogéneas, por ejemplo, en un reactor aerotransportado o en un reactor de agitación continua, o el cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, en microperlas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si es necesario y/o deseado, las soluciones de polipéptidos pueden purificarse mediante procedimientos de cromatografía corrientes, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno)afinidad, p. ej. después de biosíntesis preferencial de un polipéptido de región bisagra sintético o antes o después de la etapa de cromatografía HIC descrita en el presente documento.
- 30 Los genes que codifican anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también se pueden expresar en células no de mamíferos tales como células de bacterias, insectos, levaduras o vegetales. Las bacterias que captan fácilmente ácidos nucleicos incluyen miembros de las enterobacterias, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará adicionalmente que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos se vuelven típicamente parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos se deben aislar, purificar y ensamblar entonces en moléculas funcionales. Cuando se deseen formas tetravalentes de anticuerpos, las subunidades se autoensamblarán en anticuerpos tetravalentes, véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO02/096948.
- 40 En los sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente una serie de vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de tal proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, se pueden desear vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Tales vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., EMBO J. 2 (1983), 1791), en el que la secuencia codificante de anticuerpo se puede ligar individualmente en el vector en marco con la región codificante de lacZ de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguida de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión por proteasa trombina o factor Xa de manera que el producto génico diana clonado se pueda liberar del resto GST.
- 55 Además de procariontes, pueden usarse también microbios eucariotes. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más comúnmente usado entre los microorganismos eucariotes, aunque están comúnmente disponibles una serie de otras cepas, p. ej., *Pichia pastoris*. Para expresión en *Saccharomyces*, se usa comúnmente el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb y col., Nature 282 (1979), 39; Kingsman y col., Gene 7 (1979), 141; Tschemper y col., Gene 10 (1980), 157). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecimiento en triptófano, por ejemplo,

ATCC N.º 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). La presencia de la lesión de trp1 como una característica del genoma de célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

- 5 En un sistema de insecto, el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa típicamente como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y se puede colocar bajo control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).
- 10 Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado recombinantemente, los anticuerpos enteros, sus dímeros, cadenas pesada y ligera individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándares de la técnica, incluyendo, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por un antígeno específico después de la Proteína A, y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, por ejemplo,
- 15 precipitación de sulfato de amonio, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas; véase, por ejemplo, Scopes, «Protein Purification», Springer Verlag, N.Y. (1982). Como alternativa, se divulga un procedimiento preferido para aumentar la afinidad de anticuerpos de la invención en la publicación de patente de Estados Unidos 2002-0123057 A1.

## 20 V. Proteínas de fusión y conjugados

En ciertas realizaciones, el polipéptido de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos normalmente no asociados con un anticuerpo. Las modificaciones ejemplares se describen en más detalle a continuación. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo fv monocatenario de la invención puede comprender una

25 secuencia enlazadora flexible, o se puede modificar para añadir un resto funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, una toxina o una etiqueta tal como una fluorescente, radioactiva, enzima, magnética nuclear, metal pesado y similares).

Un polipéptido de anticuerpo de la invención puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas quiméricas que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a  $\alpha$ -sinucleína de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión diana, y al menos una porción heteróloga, es decir, una porción con la cual no está naturalmente ligado en la naturaleza. Las secuencias de aminoácido pueden existir normalmente en proteínas separadas que se juntan en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína pero están colocadas en una nueva disposición en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión se pueden crear, por ejemplo, mediante síntesis química, o mediante la creación y traducción de un polinucleótido en el

30 que se codifican las regiones del péptido en la relación deseada.

El término «heterólogo», como se aplica a un polinucleótido o a un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido deriva de una entidad distinta de aquella del resto de la entidad con la que se compara. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, un «polipéptido heterólogo» a fusionar con un anticuerpo o un fragmento de unión

40 al antígeno, variante o análogo del mismo deriva de un polipéptido no de inmunoglobulina de la misma especie, o un polipéptido de inmunoglobulina o no de inmunoglobulina de una especie diferente.

Como se ha comentado en más detalle en otro lugar del presente documento, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden fusionarse adicionalmente

45 recombinantemente con un polipéptido heterólogo en el extremo N o C-terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden fusionar recombinantemente o conjugar con moléculas útiles como marcajes en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas; véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO92/08495;WO91/14438;WO89/12624;la patente de Estados Unidos n.º

50 5.314.995 y la solicitud de patente europea EP 0396387.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por gen. Los

55 anticuerpos se pueden modificar mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraducciona, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Tales modificaciones se describen bien en textos básicos y en monografías más detalladas, así como también en la extensa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden aparecer en cualquier lugar del anticuerpo, incluyendo el esqueleto del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo, o en restos tales como carbohidratos. Se apreciará que el

60 mismo tipo de modificación puede estar presente en igual grado o distintos grados en varios sitios de un anticuerpo



dado. Además, un anticuerpo dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales de postraducción o pueden elaborarse por procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace de disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación; véanse, *por ejemplo*, Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York 2ª Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter y col., Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan y col., Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992), 48-62).

La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo, y un polipéptido heterólogo. En una realización, una proteína de fusión de la invención comprende, consiste esencialmente o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones V<sub>H</sub> de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones V<sub>L</sub> de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes del mismo, y un polipéptido heterólogo. En otra realización, una proteína de fusión para uso en procedimientos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento consiste esencialmente o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia aminoacídica de una, dos o tres cualesquiera de las V<sub>H</sub>-CDR de un anticuerpo, o fragmento, variante o derivado del mismo, o la secuencia de aminoácidos de una, dos o tres cualesquiera de las V<sub>L</sub>-CDR de un anticuerpo, o fragmentos, variantes o derivados del mismo, y un polipéptido heterólogo. En una realización, la proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una V<sub>H</sub>-CD3 de un anticuerpo de la presente invención, o fragmento, derivado o variante del mismo, y una secuencia de polipéptido heterólogo, uniéndose específicamente dicha proteína de fusión a  $\alpha$ -sinucleína. En otra realización, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una región V<sub>H</sub> de un anticuerpo de la invención, y la secuencia de aminoácidos de al menos una región V<sub>L</sub> de un anticuerpo de la invención o fragmentos, derivados o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptido heterólogo. Preferentemente, las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la proteína de fusión corresponden a un único anticuerpo fuente (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente a  $\alpha$ -sinucleína. En todavía otra realización, una proteína de fusión para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento divulgados en la presente memoria comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más cualesquiera de las V<sub>H</sub>-CDR de un anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más cualesquiera de las V<sub>L</sub>-CDR de un anticuerpo, o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptido heterólogo. Preferentemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las V<sub>H</sub>-CDR o V<sub>L</sub>-CDR corresponden a un único anticuerpo fuente (o fragmento scFv o Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también están englobadas por la invención.

Las proteínas de fusión ejemplares reseñadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de linfocitos T (Gascoigne y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon y col., Nature 337 (1989), 525-531; Traunecker y col., Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl y col., DNA Cell Biol. USA 9 (1990), 347-353; yByrn y col., Nature 344 (1990), 667-670); L-selectina (receptor de anidamiento) (Watson y col., J. Cell. Biol. 110 (1990), 2221-2229; yWatson y col., Nature 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo y col., Cell 61 (1990), 1303-1313); CD28 y B7 (Linsley y col., J. Exp. Med. 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley y col., J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic y col., Cell 66 (1991), 1133-1144); receptor de TNF (Ashkenazi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer y col., Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886; yPeppel y col., J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991); y receptor de IgE  $\alpha$  (Ridgway y Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Resumen N.º 1448).

Como se ha comentado en otro lugar del presente documento, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados del mismo de la invención pueden fusionarse con polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida in vivo de los polipéptidos o para uso en inmunoensayos usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, se puede conjugar PEG con los anticuerpos de la invención para aumentar su semivida in vivo; véanse, *por ejemplo*, Leong y col., Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; oWeir y col., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

Además, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden fusionar con secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina (HIS), tal como el

marcaje proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcajes de péptidos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcaje «HA», que  
5 corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., Cell 37 (1984), 767) y el marcaje «Flag».

Las proteínas de fusión pueden prepararse usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica; véanse por ejemplo las patentes de Estados Unidos n.º 5.116.964y5.225.538. El sitio preciso en el que se realiza la fusión puede  
10 seleccionarse empíricamente para optimizar las características de unión o secreción de la proteína de fusión. El ADN que codifica la proteína de fusión se transfecta entonces a una célula huésped para expresión.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en forma no conjugada o se pueden conjugar con al menos una diversidad de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la  
15 detección diana, o para formar imágenes o para la terapia del paciente. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden marcar o conjugar antes o después de la purificación, cuando se efectúa la purificación. En particular, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden conjugar con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.  
20

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

Los expertos en la técnica apreciarán que los conjugados también se pueden ensamblar usando una variedad de técnicas dependiendo del agente seleccionado a conjugar. Por ejemplo, los conjugados con biotina se preparan, por  
30 ejemplo, haciendo reaccionar un polipéptido de unión a  $\alpha$ -sinucleína con un éster de biotina activado tal como el éster N-hidroxisuccinimida de biotina. De manera similar, los conjugados con un marcador fluorescente se pueden preparar en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo, los enumerados en el presente documento, o mediante reacción con un isotiocianato, preferentemente isotiocianato de fluoresceína. Los conjugados de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se preparan de manera análoga.  
35

La presente invención engloba además anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención conjugados con un agente terapéutico o de diagnóstico. Los anticuerpos se pueden usar como diagnóstico para, por ejemplo, demostrar la presencia de una enfermedad neurológica, para indicar el riesgo de  
40 contraer una enfermedad neurológica, para monitorizar el desarrollo o progresión de una enfermedad neurológica, es decir, una sinucleinopatía como parte de un procedimiento de prueba clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento y/o prevención dado. La detección se puede facilitar mediante el acoplamiento del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones usando diversas  
45 tomografías de emisión de positrones e iones de metales paramagnéticos no radioactivos; véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.741.900para iones de metales que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como diagnósticos de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  o  $^{99}\text{Tc}$ .  
50

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo también se puede marcar de manera detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado quimioluminiscente se determina entonces mediante la detección de la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una  
55 reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.  
60

Una de las maneras en las que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo se puede marcar de manera detectable es ligando el mismo a una enzima y usando el producto ligado en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., «The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)» Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller y col., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. y col., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo (1981). La enzima que está unida al anticuerpo reaccionará con un sustrato adecuado, preferentemente un sustrato cromogénico, de tal manera que produzca un resto químico que se puede detectar, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que se pueden usar para marcar de manera detectable el anticuerpo incluyen, pero sin limitación, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Adicionalmente, la detección puede lograrse mediante procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también se puede lograr mediante comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de manera similar.

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

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo también se puede marcar de manera detectable usando metales emisores de fluorescencia tales como <sup>152</sup>Eu u otros de la serie lantánida. Estos metales se pueden enlazar al anticuerpo usando grupos quelantes de metales tales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

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

Como se menciona, en ciertas realizaciones, se puede conjugar un resto que potencia la estabilidad o eficacia de una molécula de unión, p. ej. un polipéptido de unión, p. ej. un anticuerpo o fragmento inmuno-específico del mismo. Por ejemplo, en una realización, se puede conjugar PEG con las moléculas de unión de la invención para aumentar su semivida *in vivo*. Leong y col., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir y col., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

## VI. Composiciones y procedimientos de uso

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden la molécula de unión a  $\alpha$ -sinucleína anteriormente mencionada, p. ej., anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención o derivado o variante del mismo. La composición de la presente invención puede comprender adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente agentes tales como interleucinas o interferones dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Por ejemplo, para uso en el tratamiento de enfermedad de Parkinson, el agente adicional puede seleccionarse de entre el grupo consistente en moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína y combinaciones de los mismos. Por ello, en una realización particular preferida, la presente invención se refiere al uso de una molécula de unión a  $\alpha$ -sinucleína, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una enfermedad sinucleinopática, la monitorización de la progresión de una enfermedad sinucleinopática, o una respuesta a un tratamiento de una enfermedad sinucleinopática en un sujeto, o para

determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad sinucleinopática.

Por ello, en una realización, la presente invención se refiere al anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína y fragmento de unión a  $\alpha$ -sinucleína del mismo de la presente invención para uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno neurológico caracterizado por una acumulación y/o deposición anormal de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro y el sistema nervioso, respectivamente, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de una cualquiera de las moléculas de unión a  $\alpha$ -sinucleína descritas anteriormente, p. ej. anticuerpos de la presente invención. El término «trastorno neurológico» incluye, pero sin limitación, enfermedades sinucleinopáticas tales como enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante de enfermedad de Alzheimer con cuerpos de Lewy (VEACL), atrofia sistémica múltiple (ASM), insuficiencia autonómica pura (IAP), neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral de tipo 1 (NAHC-I), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, distrofia neuroaxonal generalizada de inicio juvenil (enfermedad de Hallervorden-Spatz), esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática y síndrome de Down, así como otros trastornos del movimiento y enfermedades del sistema nervioso central (SNC) en general. A menos que se indique otra cosa, los términos neurodegenerativo, neurológico o neuropsiquiátrico se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Una ventaja particular del enfoque terapéutico de la presente invención reside en el hecho de que los anticuerpos de la presente invención derivan de linfocitos B o linfocitos B de memoria de sujetos de edad avanzada sin signos de parkinsonismo y, por tanto, son, con cierta probabilidad, capaces de prevenir una enfermedad sinucleinopática clínicamente manifiesta, o de disminuir el riesgo de aparición de la enfermedad clínicamente manifiesta, o de retrasar el inicio o progresión de la enfermedad clínicamente manifiesta. Típicamente, los anticuerpos de la presente invención también han pasado por maduración somática con éxito, es decir, la optimización con respecto a la selectividad y efectividad en la unión de alta afinidad a la molécula de  $\alpha$ -sinucleína diana por medio de la variación somática de las regiones variables del anticuerpo.

El hecho de saber que dichas células *in vivo*, por ejemplo, en un ser humano, no se han activado por medio de proteínas fisiológicas o estructuras celulares diferentes o relacionadas en el sentido de una reacción alérgica o autoinmunitaria es también de gran importancia médica ya que implica una posibilidad considerablemente aumentada de vivir satisfactoriamente a través de las fases de prueba clínica. Por así decirlo, ya se han demostrado la eficiencia, aceptabilidad y tolerabilidad antes del desarrollo preclínico y clínico del anticuerpo profiláctico o terapéutico en al menos un sujeto humano. Por tanto, se puede esperar que en los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína humanos de la presente invención, tanto su eficiencia específica de la estructura diana como agente terapéutico como su probabilidad disminuida de efectos secundarios, aumenten significativamente su probabilidad clínica de éxito.

La presente invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico y de diagnóstico, respectivamente, que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes descritos anteriormente, por ejemplo, un anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína, fragmento de unión, derivado o variante del mismo. Puede haber un aviso asociado a tal recipiente o recipientes de la forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación por el organismo de la fabricación, el uso o la venta para administración a seres humanos. Además, o como alternativa, el kit comprende reactivos y/o instrucciones para su uso en ensayos de diagnóstico apropiados. La composición, p. ej. el kit de la presente invención, es por supuesto particularmente adecuado para la valoración de riesgos, diagnóstico, prevención y tratamiento de un trastorno que está acompañado de la presencia de  $\alpha$ -sinucleína, y en particular aplicable para el tratamiento de enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y variante con cuerpos de Lewy de enfermedad de Alzheimer (VCLEA).

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

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

El régimen de dosificación se determinará por el médico encargado y los factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto particular a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos administrados conjuntamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000  $\mu\text{g}$  (o de ácido nucleico para expresión o para inhibición de la expresión en este intervalo); sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, considerando especialmente los factores mencionados anteriormente. Generalmente, la dosificación puede oscilar, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. Se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores también estén dentro del alcance de la invención. Tales dosis se pueden administrar a los sujetos diariamente, en días alternos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otra programación determinada por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar conlleva la administración en dosificaciones múltiples durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales conllevan la administración de una vez cada dos semanas o una vez por mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las programaciones de dosificación ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg por semana. En algunos procedimientos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. La progresión se puede monitorizar por valoración periódica. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, Ringer lactado o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. Pueden estar presentes también conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente agentes tales como dopamina o fármacos psicofarmacológicos dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica.

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

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

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

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

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

En una realización adicional de la presente invención, las moléculas de unión a  $\alpha$ -sinucleína, en particular anticuerpos de la presente invención, pueden coadministrarse o administrarse antes o después de terapia de trasplante con trasplantes neurales o terapia de células madre útil para tratar una enfermedad sinucleinopática. Tales enfoques con trasplantes de neuronas mesencefálicas embrionarias se han efectuado en pacientes con enfermedad de Parkinson con el objetivo de reemplazar las neuronas que se pierden en la enfermedad y restaurar la neurotransmisión dopaminérgica en el cuerpo estriado. Después de 11-16 años después del trasplante, se encontró que las neuronas injertadas contienen cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy. Esta extensión de la patología de  $\alpha$ -sinucleína del huésped a los tejidos injertados puede prevenirse mediante la coadministración de moléculas de unión a  $\alpha$ -sinucleína, en particular anticuerpos de la presente invención.

Una dosis o cantidad terapéuticamente efectiva hace referencia a una cantidad del principio activo suficiente para mejorar los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y toxicidad de tales compuestos se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo,  $DE_{50}$  (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50 % de la población) y  $DL_{50}$  (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación  $DL_{50}/DE_{50}$ . Preferentemente, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente para restaurar o conservar el comportamiento y/o propiedades cognitivas normales en el caso de EP, DCL y otras enfermedades sinucleinopáticas.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende una cualquiera de las moléculas de unión a  $\alpha$ -sinucleína anteriormente descritas, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención y opcionalmente medios adecuados para la detección, tales como reactivos usados convencionalmente en procedimientos de inmunodiagnóstico o basados en ácido nucleico. Los anticuerpos de la invención son, por ejemplo, adecuados para su uso en inmunoensayos, en los que se pueden utilizar en fase líquida o unidos a un portador en fase sólida. Los ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto. Son ejemplos de tales inmunoensayos radioinmunoensayo (RIA), ensayo tipo sándwich (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y ensayo de transferencia Western. Los antígenos y anticuerpos de la invención se pueden unir a diferentes portadores y usarse para aislar células específicamente unidas a los mismos. Los ejemplos de portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble con los fines de la invención. Existen muchos marcajes y procedimientos de marcaje diferentes conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de los tipos de marcajes que se pueden usar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes; véanse también las realizaciones comentadas anteriormente en el presente documento.

En una realización adicional, las moléculas de unión a  $\alpha$ -sinucleína, en particular anticuerpos de la presente invención, pueden usarse también en un procedimiento para el diagnóstico de un trastorno en un individuo mediante la obtención de una muestra de fluido corporal del individuo ensayado, que puede ser una muestra de sangre, una muestra de linfa o cualquier otra muestra de fluido corporal, y la puesta en contacto de la muestra de fluido corporal con un anticuerpo de la presente invención en condiciones que posibiliten la formación de complejos de anticuerpo-antígeno. El nivel de tales complejos se determina entonces mediante procedimientos conocidos en la técnica, indicando un nivel significativamente mayor que el formado en una muestra de control la enfermedad en el individuo ensayado. De la

misma manera, también se puede usar el antígeno específico unido a los anticuerpos de la invención. Por tanto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención.

5 En este contexto, la presente invención también se refiere a medios específicamente diseñados con este fin. Por ejemplo, se puede usar una matriz basada en anticuerpos que esté, por ejemplo, cargada con anticuerpos o moléculas de unión al antígeno equivalentes de la presente invención que reconocen específicamente  $\alpha$ -sinucleína. El diseño de inmunoensayos de micromatrices se resume en Kusnezow y col., *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a micromatrices cargadas con moléculas de unión a  $\alpha$ -sinucleína  
10 identificadas de acuerdo con la presente invención.

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

(a) valorar el nivel de  $\alpha$ -sinucleína en una muestra del sujeto a diagnosticar con un anticuerpo de la presente invención,  
15 un fragmento de unión a  $\alpha$ -sinucleína del mismo o una molécula de unión a  $\alpha$ -sinucleína que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión que cualquiera de ellos; y  
(b) comparar el nivel de  $\alpha$ -sinucleína con un patrón de referencia que indica el nivel de  $\alpha$ -sinucleína en uno o más sujetos de control,  
donde una diferencia o similitud entre el nivel de  $\alpha$ -sinucleína y el patrón de referencia indica que el sujeto tiene  
20 enfermedad de Parkinson.

El sujeto a diagnosticar puede ser asintomático o preclínico para la enfermedad. Preferentemente, el sujeto de control tiene una enfermedad sinucleinopática, por ejemplo EP, DCL o VCLEA, donde una similitud entre el nivel de  $\alpha$ -sinucleína con el patrón de referencia indica que el sujeto a diagnosticar tiene una enfermedad sinucleinopática. Como  
25 alternativa, o además como un segundo control, el sujeto de control no tiene una enfermedad sinucleinopática, donde una diferencia entre el nivel de  $\alpha$ -sinucleína y el patrón de referencia indica que el sujeto a diagnosticar tiene una enfermedad sinucleinopática. Preferentemente, el sujeto a diagnosticar y el sujeto o sujetos de control tienen la misma edad. La muestra a analizar puede ser cualquier fluido corporal que se sospeche que contiene  $\alpha$ -sinucleína, por ejemplo, una muestra de sangre, LCR u orina.

30 El nivel de  $\alpha$ -sinucleína puede valorarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica que comprende, p. ej., analizar la  $\alpha$ -sinucleína mediante una o más técnicas elegidas de transferencia Western, inmunoprecipitación, ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), electroforesis en gel bidimensional, espectroscopía de masas (MS),  
35 desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo-MS (MALDI-TOF), desorción/ionización por láser potenciada de superficie-tiempo de vuelo (SELDI-TOF), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC), cromatografía líquida multidimensional (LC) seguida de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y densitometría láser. Preferentemente, dicha formación de imágenes *in vivo* de  $\alpha$ -sinucleína comprende tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía por emisión de fotón único (SPECT), imagen  
40 óptica de infrarrojo cercano (NIR) o imagen por resonancia magnética (MRI).

Se describen también procedimientos de diagnóstico de una enfermedad sinucleinopática tal como enfermedad de Parkinson o enfermedad de cuerpos de Lewy, monitorización de la progresión de una enfermedad sinucleinopática y monitorización del tratamiento de una enfermedad sinucleinopática usando anticuerpos y medios relacionados que  
45 pueden adaptarse de acuerdo con la presente invención en la solicitud internacional WO2007/011907. De forma similar, se describen procedimientos de detección basados en anticuerpo para  $\alpha$ -sinucleína en las solicitudes internacionales WO99/50300, WO2005/047860, WO2007/021255 y WO2008/103472. Esos procedimientos pueden aplicarse como se describe, pero con un anticuerpo específico de  $\alpha$ -sinucleína, fragmento de unión, derivado o variante de la presente invención.

50 Estas y otras realizaciones se divulgan y se engloban por la descripción y los ejemplos de la presente invención. Puede recuperarse bibliografía adicional respecto a cualquiera de los materiales, procedimientos, usos y compuestos a emplear de acuerdo con la presente invención a partir de colecciones y bases de datos públicas usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública «Medline», que se aloja por el National  
55 Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine at the National Institutes of Health. Las bases de datos y direcciones web adicionales, tales como las del European Bioinformatics Institute (EBI), que forma parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) son conocidas por los expertos en la técnica y también se pueden obtener usando motores de búsqueda de Internet. Se da una perspectiva general de información de patentes en biotecnología y una encuesta de fuentes relevantes de información de patentes útil para la búsqueda retrospectiva y  
60 para concienciación actual en Berks, *TIBTECH* 12 (1994), 352-364.

La divulgación anterior generalmente describe la presente invención. A menos que se indique otra cosa, un término como se usa en el presente documento da la definición tal como la proporciona el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpresso en 2003, ISBN 0 19 850673 2.

- 5 Se puede obtener una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en el presente documento con fines de ilustración solamente.

## EJEMPLOS

- 10 Los ejemplos que siguen ilustran adicionalmente la invención. Los siguientes experimentos en los Ejemplos 1 a 2 se ilustran y se describen con respecto a los anticuerpos NI-202.3G12, NI-202.12F4 y NI-202.3D8 como se clonan, es decir, contienen las mutaciones inducidas por cebador en los propios extremos N de las regiones variables de Ig marco 1 sin ajustarse a las secuencias de línea germinal (GL) de cadenas variables pesada y ligera humana; véase la Figura 1. Sin embargo, los otros anticuerpos de la serie NI-202, en particular aquellos con secuencias de GL ajustadas, son
- 15 estructuralmente similares y por tanto puede esperarse que proporcionen resultados comparables. Estos anticuerpos se expresaron como moléculas de IgG1 humana. Los experimentos en los Ejemplos 3 y 4 se ilustran y se describen con respecto al anticuerpo NI-202.12F4, con mutaciones inducidas por cebador en los propios extremos N de las regiones variables de Ig marco 1 ajustado a las secuencias de línea germinal (GL) de cadenas variables pesada y ligera humana; véase la Figura 1. Este anticuerpo se expresó como una molécula quimérica donde los dominios
- 20 variables humanos ajustados se fusionaban con regiones constantes de IgG2a de ratón para permitir estudios de dosificación crónica en modelos de ratón transgénico sin inducir una respuesta inmunitaria de ratón anti-humana.

## Material y procedimientos

- 25 Pueden encontrarse descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los empleados en el presente documento, en la bibliografía citada. A menos que se indique otra cosa a continuación, la identificación de linfocitos B específicos de  $\alpha$ -sinucleína y la clonación molecular de anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína que presentan especificidad de interés, así como su expresión recombinante y caracterización funcional, se han efectuado o se pueden efectuar como se describe en la sección de Ejemplos y Procedimientos suplementarios de la solicitud
- 30 internacional WO2008/081008.

## Purificación de antígeno

- Se obtuvo His- $\alpha$ -sinucleína recombinante mediante expresión recombinante de *Escherichia coli* y posterior purificación
- 35 usando precipitación termoinducida, cromatografía de afinidad de níquel, de intercambio aniónico y de exclusión por tamaño.

- Por ejemplo, se usó un constructo de ADN que comprende al ADNc que codifica  $\alpha$ -sinucleína bajo el control del promotor T7 para transformar una cepa de *Escherichia coli* apropiada tal como BL21(D3) y se indujo la expresión de
- 40 200 ml de cultivo celular mediante la adición de 1 mM de  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG). Se recolectaron las células después de 4 horas de inducción a 37 °C y se resuspendieron entonces en 20 ml de Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8, seguido de sonicación. Después de hervir durante 15 min, se recogió el sobrenadante de 17000 g
- 45 termorresistente. Se recogió el sobrenadante de 17000 g termorresistente similar de *Escherichia coli* ficticia. Después de ajustar el sobrenadante de 17000 g termorresistente (20 ml) de *Escherichia coli* que expresa  $\alpha$ -sinucleína marcada con His a Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8, se cargó en una columna HisTrap HP de 1 ml (GE Life Science) y se eluyó HIS- $\alpha$ -sinucleína con un gradiente de imidazol 30-500 mM. Se reunieron las fracciones que
- 50 contienen HIS- $\alpha$ -sinucleína y se diluyeron entonces 1:10 con Tris 50 mM pH 8. Se aplicaron las fracciones reunidas diluidas a una columna HiTrap Q HP de 1 ml (GE Life Science) y se eluyeron las proteínas unidas en un gradiente de NaCl 30-1000 mM. Finalmente, se purificaron adicionalmente los eluidos que contenían HIS- $\alpha$ -sinucleína usando
- filtración en gel de alta resolución (Superdex 200 10/300 GL). Este procedimiento de purificación procura HIS- $\alpha$ -sinucleína con un grado de pureza de alrededor del 99 % como se estima por PAGE-SDS y tinción de Coomassie. La concentración de proteína purificada se ha determinado usando un ensayo de BCA (Pierce).

## Cribado de anticuerpo de $\alpha$ -sinucleína

- 55 Se recubrieron microplacas de media área de 96 pocillos (Corning) con HIS- $\alpha$ -sinucleína purificada o  $\alpha$ -sinucleína (rPeptide) a una concentración estándar de 2  $\mu$ g/ml en tampón de recubrimiento (PBS, H 9,6) durante una noche a 4 °C. Se lavaron las placas con PBS-T a pH 7,6 y se bloquearon los sitios de unión no específica durante 1 h a TA con PBS-T que contenía 2 % de BSA (Sigma, Buchs, Suiza). Se preabsorbió medio acondicionado de linfocitos B durante
- 60 1 h a TA con proteínas de *E. coli* termorresistentes al 10 % en BSA al 1 %. Esta etapa de preabsorción se había



desarrollado después de que varios intentos anteriores de cribado de ELISA fueran infructuosos para identificar anticuerpos específicos de  $\alpha$ -sinucleína humanos. Por tanto, afortunadamente resultó que la preabsorción de la placa de ELISA con proteínas de *E. coli* termorresistentes excluye el cribado de aciertos falsos positivos tales como anticuerpos adhesivos y anticuerpos dirigidos contra contaminaciones de proteína de *E. coli* presentes probablemente en muestras de  $\alpha$ -sinucleína recombinante purificada. El medio preabsorbido se transfirió entonces desde placas de cultivo de linfocitos B de memoria a placas de ELISA y se incubaron durante 2 h a TA. Las placas ELISA se lavaron con PBS-T y entonces se incubaron con anticuerpo policlonal IgG (específico del fragmento Fc $\gamma$ ) anti-humano de burro conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de lavar con PBS-T, la unión de anticuerpos humanos se determinó por medida de la actividad de HRP en un ensayo colorimétrico estándar.

### **Clonación molecular de anticuerpos de $\alpha$ -sinucleína**

Se obtuvieron muestras que contenían linfocitos B de memoria de voluntarios de >60 años de edad. Todos los voluntarios tenían en común carecer de cualquier signo de parkinsonismo. Los linfocitos B vivos de cultivos de linfocitos B de memoria seleccionados se recolectan y se prepara ARNm. Se obtienen entonces secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina usando cebadores específicos de marco 1 de Ig para todas las familias de cadena pesada y ligera variable humana como cebadores en 5' en combinación con cebadores específicos de todos los segmentos J humanos (cadena pesada y ligera kappa) y segmentos C (cadena ligera lambda) como cebadores en 3' (Marks y col., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard y col., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

La identificación del clon de anticuerpo con la especificidad deseada se efectúa por medio del nuevo cribado en ELISA tras la expresión recombinante de anticuerpos completos. La expresión recombinante de anticuerpos IgG1 humanos completos o anticuerpos IgG2a quiméricos se consigue tras la inserción de las secuencias variables de cadena pesada y ligera «en el marco de lectura adecuado» en vectores de expresión que complementan la secuencia de región variable con una secuencia que codifica un péptido líder en el extremo 5' y el extremo 3' con una secuencia que codifica el uno o más dominios constantes apropiados. Con ese fin, los cebadores contenían sitios de restricción diseñados para facilitar la clonación de secuencias variables de cadena pesada y ligera en vectores de expresión de anticuerpos. Las inmunoglobulinas de cadena pesada se expresan insertando el producto RT-PCR de cadena pesada de inmunoglobulina en marco en un vector de expresión de cadena pesada que porta un péptido señal y los dominios constantes de inmunoglobulina gama 1 humana o inmunoglobulina gama 2a de ratón. La inmunoglobulina de cadena ligera kappa se expresa insertando el producto de RT-PCR de cadena ligera kappa de NI-202.3D8 en marco en un vector de expresión de cadena ligera que proporciona un péptido señal y el dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera kappa humana. Las inmunoglobulinas de cadena ligera lambda NI-202.12F4 y NI-202.3G12 se expresan insertando el producto de RT-PCR de cadena ligera lambda en marco en un vector de expresión de cadena ligera lambda que proporciona un péptido señal y el dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera lambda humana o de ratón.

Los anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales se obtienen tras la cotransfección en células HEK293 o CHO (o cualquier otra línea celular receptora apropiada de origen humano o de ratón) de un vector de expresión de cadena pesada de Ig y un vector de expresión de cadena ligera de Ig lambda o kappa. El anticuerpo monoclonal humano recombinante se purifica posteriormente a partir del medio acondicionado usando purificación de columna de proteína A estándar. El anticuerpo monoclonal humano recombinante se puede producir en cantidades ilimitadas usando células transfectadas de forma transitoria o estable. Se pueden establecer líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales humanos recombinantes usando vectores de expresión de Ig directamente o por medio de la reclonación de regiones variables de Ig en diferentes vectores de expresión. Los derivados, tales como F(ab), F(ab)<sub>2</sub> y scFv también se pueden generar a partir de estas regiones variables de Ig.

### **Anticuerpos**

Se usaron pananticuerpo policlonal de sinucleína de conejo (Abcam), anticuerpo monoclonal de ratón específico de  $\alpha$ -sinucleína LB509 (Invitrogen), anticuerpo Syn211 (Sigma) y clon 42 (BD Bioscience) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína humanos recombinantes NI-202.3G12, NI-202.12F4 y NI-202.3D8 son anticuerpos de esta invención. Se expresaron en células HEK293 o CHO y se usaron entonces directamente medios acondicionados en aplicaciones posteriores, a menos que se afirme otra cosa. En los Ejemplos 3 a 5 se usaron los anticuerpos recombinantes purificados de la presente invención.

### **ELISA directo**

Se recubrieron los antígenos a la concentración indicada en PBS a pH 9,6 sobre microplacas de área media de 96 pocillos (Corning) durante un anoche a 4 °C. Se lavaron las placas con PBS-T a pH 7,6 y se bloquearon los sitios de

unión no específica durante 1 h a TA con PBS-T que contenía BSA al 2 % (Sigma). Se transfirieron entonces sondas (anticuerpos primarios) a los pocillos y se incubaron durante 2 h a TA. Después de lavar con PBS-T a pH 7,6, se incubaron los pocillos con anticuerpo secundario policlonal anti-humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (para anticuerpos humanos recombinante), anti-conejo (para pananticuerpo de sinucleína) o anti-ratón (para LB509 o Syn211) durante 1 h a TA. Después de un lavado riguroso con PBS-T, se determinó la unión de sondas por medida de la actividad de HRP en un ensayo colorimétrico estándar usando 3,3',5,5'-tetrametilfenil-4,4'-diamina (Sigma) como sustrato cromogénico.

#### **Transferencia Western y tinción de proteína con Coomassie**

10 Para valorar la unión a  $\alpha$ -sinucleína humana y de ratón, se homogeneizaron cerebros congelados de ratones de tipo silvestre o transgénico de  $\alpha$ -sinucleína en PBS (10 ml/g de peso húmedo) usando un homogeneizador Dounce. Se centrifugó el extracto a 100.000 g y se designó el sobrenadante fracción soluble. Se mezclaron la fracción soluble o proteínas recombinantes (750 ng) con tinte de carga, se calentó a 65 °C durante 10 min, se cargaron 0,75  $\mu$ g por carril  
15 y se separaron en una PAGE-SDS con 4-20 % de Tris-glicina. Se tiñeron los geles con solución de azul brillante R 250 de Coomassie al 0,025 % (Fluka) o se electrotransfirieron a membrana de transferencia de nitrocelulosa. Se incubaron entonces las transferencias con anticuerpo primario durante 2 h. Se reveló la unión de anticuerpos primarios usando anticuerpos secundarios anti-humanos conjugados con HRP. Se revelaron las transferencias usando los reactivos de detección de ECL plus Western Blotting (GE Healthcare).

20 Para valorar la unión a monómeros y agregados de  $\alpha$ -sinucleína, se prepararon extractos cerebrales en PBS que contenía 0,5 % de Triton X100 seguido de centrifugación a 1000 g durante 5 min. Se separaron los sobrenadantes por electroforesis en gel NuPAGE con 4-12 % de Bis-Tris y se analizaron por WB.

#### **Prueba del poste**

Se ensayan los ratones al inicio de la fase oscura cuando están más activos. El poste está compuesto por un palo de madera de 50 cm de longitud y 1 cm de anchura cubierto con tela para facilitar la escalada. La base del poste está colocada en la jaula de alojamiento del ratón. Se dispone el ratón en la parte superior del poste y se registra el tiempo  
30 para orientarse hacia abajo y el tiempo para bajar a la jaula de alojamiento durante 5 ensayos con intervalos entre ensayo de 30 min. Se analiza el ensayo de mejor rendimiento.

#### **Prueba de laberinto elevado en cruz**

35 Se ensayan los ratones al inicio de la fase oscura cuando están más activos. Se efectúa el ensayo con luz tenue (40 lux). El laberinto elevado en cruz consiste en dos brazos abiertos y dos cerrados (longitud de brazo: 30 cm; anchura: 5 cm). Los brazos abiertos tienen un borde pequeño de 1 cm y los brazos cerrados están bordeados por una pared de 15 cm. Al inicio de la tarea, se disponen los ratones en el centro del laberinto elevado en cruz frente a un brazo abierto. Se hace el videoseguimiento de los ratones mientras exploran el laberinto durante 5 min. Se miden y analizan el tiempo  
40 gastado en los brazos abiertos y cerrados y la distancia cubierta.

#### **Ratones transgénicos**

45 B6;C3-Tg(Prnp-SNCA<sup>A53T</sup>)83Vle/J (Giasson y col., Neuron. 34 (2002), 521-533) Los ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína y los correspondientes ratones de tipo silvestre se mantuvieron en condiciones de alojamiento estándares en un ciclo de 12 h:12 h de luz/oscuridad inverso con acceso libre a agua y comida. Los grupos de tratamiento se equilibraron de acuerdo con la edad y el género.

#### **Determinación de los niveles de NI202.12F4 y $\alpha$ -sinucleína en plasma de ratón**

50 Se determinaron los niveles plasmáticos de NI-202.12F4 usando un ELISA directo de  $\alpha$ -sinucleína que usa NI-202.12F4 recombinante de concentración conocida como patrón. Para la determinación de los niveles de  $\alpha$ -sinucleína humana en plasma, se aplicó un ELISA de sándwich (Invitrogen, Estados Unidos).

#### **Ejemplo 1: Identificación de anticuerpos específicos de $\alpha$ -sinucleína con diferentes especificidades de epítipo**

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína nativamente desplegada de 140 aminoácidos (aa) de longitud que está compuesta por tres dominios. Estos son la región de repetición anfipática N-terminal (1-60 aa), la región central (61-95 aa) y la región ácida C-terminal (96-140). Para entender adicionalmente la especificidad de los anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína  
60 humanos recombinantes, se determinó el dominio de  $\alpha$ -sinucleína que contiene la secuencia de reconocimiento, se

recubrieron los truncamientos de  $\alpha$ -sinucleína de 1-60 aa, 1-95 aa, 61-140 aa y 96-140 aa a concentración igual sobre placas ELISA y se sondearon entonces autoanticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína humanos NI-202.3G12 y NI-202.12F4 para unión a estos truncamientos.

- 5 De forma interesante, NI-202.3G13 solo se une a  $\alpha$ -sinucleína de longitud completa, pero no a ninguno de los cuatro truncamientos ensayados (Fig. 2A). Esto sugiere que el epítipo de reconocimiento de NI-202.3G12 es un motivo estructural en lugar de una secuencia de reconocimiento primaria lineal.

Por otro lado, NI-202.12F4 se une a fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína que comprenden los aa 1-60 (Fig. 2B), pero no a fragmentos truncados N-terminales que comprenden los aminoácidos 61-140 o 96-140. Esto muestra que su epítipo está localizado en el extremo N. De forma notable, la caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón que se unen selectivamente a  $\alpha$ -sinucleína en inclusiones patológicas reveló que sus epítipos están dentro del mismo segmento N-terminal (Waxman y col., *Acta Neuropathol.* 116 (2008), 37-46).

- 15 Además, los resultados preliminares de ensayos ELISA directos efectuados con anticuerpo NI-202.3D8 revelaron que NI-202.3D8 reconoce específicamente el extremo C de la  $\alpha$ -sinucleína, en particular los aminoácidos 96-140. La delección de los aminoácidos clave 125-140 en el dominio C-terminal altera en gran medida la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y, en los cerebros de pacientes con enfermedad de demencia con cuerpos de Lewy (DCL), así como en modelos animales transgénicos, existe una abundante acumulación de fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína C-terminales. Estos estudios sugieren que los anticuerpos capaces de reconocer la región C-terminal podrían tener efectos terapéuticos potenciales; véase Masliah y col., *Neuron*, 46 (2005), 857-868.

Para excluir que los truncamientos que comprenden  $\alpha$ -sinucleína C-terminal no se recubren eficientemente sobre placas ELISA, se realizó la cartografía epitópica del anticuerpo monoclonal de ratón de alfa-sinucleína LB509 (Baba y col., *Am. J. Pathol.* 152 (1998), 879-884). LB509 se une a un epítipo C-terminal (Jakes y col., *Neuroscience Letters* 269 (1999), 13-16). Como se muestra en la Fig. 2C, este estudio confirma el epítipo C-terminal de LB509 y por tanto confirma el recubrimiento eficiente de fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína C-terminales. En conclusión, la cartografía epitópica de anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína humanos recombinantes en los experimentos efectuados de acuerdo con la presente invención muestra que estos anticuerpos están dirigidos contra diferentes epítipos, incluyendo epítipos conformacionales y estructuras patológicas potenciales en el extremo N y el extremo C.

### **Ejemplo 2: Los anticuerpos humanos son específicos de $\alpha$ -sinucleína**

$\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -sinucleína son proteínas altamente homólogas que se expresan predominantemente en sistema nervioso, músculo esquelético y corazón. Sin embargo, solo la  $\alpha$ -sinucleína anormal está ligada a un amplio espectro de enfermedades del SNC, mientras que la  $\beta$ -sinucleína se sugiere que es un inhibidor de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y puede proteger el sistema nervioso central de los efectos neurotóxicos de la  $\alpha$ -sinucleína. Por tanto, los anticuerpos (terapéuticos) contra variantes patológicas de  $\alpha$ -sinucleína preferentemente no reaccionan de forma cruzada con  $\beta$  y  $\gamma$ -sinucleína. Para apoyar la especificidad y uso terapéutico potencial de los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína humanos recombinantes, se sondeó en los anticuerpos candidatos la unión a  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -sinucleína en un ensayo ELISA directo y por transferencia Western (WB). En primer lugar, se han recubierto  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -sinucleína sobre placas ELISA a igual concentración de recubrimiento (2  $\mu$ g/ml) y se incubaron entonces con un pananticuerpo de control de sinucleína o anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína humanos recombinantes. El pananticuerpo de sinucleína reacciona con las tres proteínas sinucleína recubiertas sobre placas ELISA (Fig. 3A). Se sondeó entonces en los anticuerpos de  $\alpha$ -sinucleína humanos recombinantes la unión específica a  $\alpha$ -sinucleína. Tanto NI-202.3G12 como NI-202.12F4 reaccionan con  $\alpha$ -sinucleína recubierta pero no con  $\beta$  y  $\gamma$ -sinucleína (Fig. 3A y 3B).

De forma similar, la especificidad de los anticuerpos recombinantes se investigó también usando análisis de WB. La tinción de proteína con Coomassie confirma que se han aplicado concentraciones iguales de las tres proteínas sinucleína al análisis de PAGE-SDS (Fig. 4A). El análisis de WB muestra entonces que NI-202.12F4 se une selectivamente a  $\alpha$ -sinucleína (Fig. 4B), mientras que no se detectó señal sin anticuerpo primario (Fig. 4C). La unión de NI-202.3G12 a  $\alpha$ -sinucleína en WB era indetectable. Esto está de acuerdo con un epítipo estructural en lugar de una secuencia de reconocimiento lineal de NI-202.3G12. Estos hallazgos demuestran que los anticuerpos de alfa-sinucleína humanos recombinantes descritos en la presente invención pueden ser altamente específicos.

Todos los experimentos posteriores se efectuaron con el anticuerpo quimérico de ratón NI-202.12F4.

### **Ejemplo 3: Especificidades de unión del anticuerpo NI-202.12F4**

60 Unión específica a  $\alpha$ -sinucleína humana con preferencia por la especie de  $\alpha$ -sinucleína agregada Para valorar la unión

de NI-202.12F4 a  $\alpha$ -sinucleína humana y de ratón, se prepararon extractos cerebrales a partir de ratones de tipo silvestre y transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T y se analizó la unión de anticuerpo por transferencia Western. NI-202.12F4 detecta una banda destacada correspondiente a  $\alpha$ -sinucleína en extractos cerebrales de ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T humana, mientras que tal banda está prácticamente ausente en extractos cerebrales de ratones de tipo silvestre (Figura 5A), sugiriendo unión específica a  $\alpha$ -sinucleína humana pero no de ratón. Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo LB509 comercialmente disponible (Jakes y col., Neuroscience Letters 269 (1999), 13-16) dirigido contra un epítipo específico de  $\alpha$ -sinucleína humana. En contraposición, el anticuerpo comercialmente disponible clon 42 (van der Putten y col., J. Neurosci. 20 (2000), 6021-6029), que se reseñó que se une a  $\alpha$ -sinucleína de ambas especies, detectaba proteína  $\alpha$ -sinucleína humana así como de ratón. Estos datos sugieren que NI-202.12GF4 se une preferentemente a  $\alpha$ -sinucleína humana.

Para valorar la unión de NI-202.12F4 a formas fisiológicas así como agregados patológicos de  $\alpha$ -sinucleína humana, se prepararon extractos cerebrales corticales de un sujeto de control sano y un paciente de demencia con cuerpos de Lewy (DCL), así como extractos cerebrales de ratones de tipo silvestre y ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A30P humanos (Kahle y col. J. Neurosci. 20 (2000), 6365-73), se separaron por electroforesis en gel-SDS y se analizaron por transferencia Western. NI-202.12F4 detecta con alta sensibilidad una mancha destacada que refleja las formas oligomérica y fibrilar de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en extracto cerebral de DCL y transgénico de  $\alpha$ -sinucleína A30P pero no en extractos de control sano y control de tipo silvestre (Figura 5B). En contraposición, se observó una unión mínima a formas monoméricas de  $\alpha$ -sinucleína en tejidos humanos o de ratón de tipo silvestre y una unión moderada en extractos cerebrales transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A30P de alta sobreexpresión de proteína  $\alpha$ -sinucleína. En contraposición, el anticuerpo clon 42 mostraba el patrón de unión opuesto en análisis de transferencia Western, detectando formas monoméricas y fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína con una alta sensibilidad y mala unión a especies de  $\alpha$ -sinucleína agregadas. Estos resultados sugieren que NI-202.12F4 se une preferentemente a agregados patológicos de  $\alpha$ -sinucleína tales como oligómeros y fibrillas frente a monómeros de  $\alpha$ -sinucleína fisiológicos.

**NI-202.12F4 se une a alfa-sinucleína humana de tipo silvestre y mutantes causantes de enfermedad con alta afinidad.**

Se determinó la concentración semimáxima efectiva (CE50) para  $\alpha$ -sinucleína de tipo silvestre así como mutantes de  $\alpha$ -sinucleína humana causantes de enfermedad usando un ELISA de  $\alpha$ -sinucleína directo. Se observó unión de alta afinidad para tipo silvestre así como las formas mutantes A30P, E46K y A53T de  $\alpha$ -sinucleína humana (Figura 6).

**NI-202.12F4 recombinante se une preferentemente a formas patológicas de  $\alpha$ -sinucleína en cerebro.**

La unión de NI-202.12F4 a  $\alpha$ -sinucleína se caracterizó adicionalmente por tinción inmunohistoquímica de secciones cerebrales de ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína y pacientes con enfermedad de Parkinson o demencia con cuerpos de Lewy neuropatológicamente confirmada. NI-202.12F4 muestra una destacada tinción de patologías de  $\alpha$ -sinucleína incluyendo cuerpos de Lewy e inclusión de tipo neurita de Lewy, así como pequeñas acumulaciones somatodendríticas y sinápticas de  $\alpha$ -sinucleína en secciones flotantes de ratones transgénicos que expresan  $\alpha$ -sinucleína A53T (Figura 7A) o A30P (Figura 7B) humana, así como en tejidos cerebrales humanos de enfermedad de Parkinson y demencia con cuerpos de Lewy (Figura 7C, D). En contraposición con el anticuerpo Syn211 comercialmente disponible (Giasson y col., J. Neurosci. Res. 59 (2000), 528-33), que detecta también  $\alpha$ -sinucleína sináptica fisiológica con una alta sensibilidad (Figura 7E), NI-202.12F4 se une preferentemente a agregados patológicos de  $\alpha$ -sinucleína como se ejemplifica por tinción inmunohistoquímica de ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A30P humanos (Figura 7B). La unión de NI-202.12F4 está prácticamente ausente en secciones cerebrales de ratones de tipo silvestre (Figura 7F) comparables a la tinción de control solo con anticuerpo secundario (Figura 7G), confirmando la unión preferente a  $\alpha$ -sinucleína humana frente a ratón como se observó en el análisis de transferencia Western (Figura 5). En contraposición, el anticuerpo comercialmente disponible clon 42 (van der Putten y col., J. Neurosci. 20 (2000), 6021-6029), que se reseñó que se unía a  $\alpha$ -sinucleína de origen humano así como de ratón, mostraba una tinción sináptica destacada de proteína  $\alpha$ -sinucleína de ratón en secciones cerebrales de ratones de tipo silvestre (Figura 7H).

**NI-202.12F4 muestra unión preferente a  $\alpha$ -sinucleína humana a altas concentraciones de recubrimiento, lo que apunta a un epítipo conformacional**

La concentración semimáxima efectiva (CE50) que indica la potencia de un anticuerpo se determinó para altas y bajas concentraciones de recubrimiento de  $\alpha$ -sinucleína recombinante usando un ELISA de  $\alpha$ -sinucleína directo. Se observó alta afinidad de unión de NI-202.12F4 recombinante con una CE50 de 100 pM para densidades de recubrimiento altas de proteína  $\alpha$ -sinucleína (20  $\mu$ g/ml). A menores concentraciones de recubrimiento de  $\alpha$ -sinucleína, se observó una brusca caída de afinidad, con un aumento correspondiente de la CE50 de cerca de 100 veces (Figura 8A). En contraposición, el anticuerpo Syn211 comercialmente disponible (Giasson y col., J. Neurosci. Res. 59 (2000), 528-33),

dirigido contra un epítipo lineal en el extremo C de  $\alpha$ -sinucleína, no mostraba disminución de la afinidad de unión a menores densidades de recubrimiento de alfa-sinucleína (Figura 8B). Estos hallazgos sugieren que NI-202.12F4 se orienta preferentemente a un epítipo estructural de  $\alpha$ -sinucleína que se forma a altas concentraciones de  $\alpha$ -sinucleína. Los resultados son consistentes con las características de unión inmunohistoquímica de NI-202.12F4, lo que sugiere una preferencia por conformaciones patológicas de agregados de  $\alpha$ -sinucleína tales como fibrillas u oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína. Como se observó para  $\alpha$ -sinucleína de longitud completa, la unión de NI-202.12F4 a  $\alpha$ -sinucleína truncada 1-60 muestra una dependencia equivalente de la concentración de recubrimiento, apuntando a un epítipo conformacional que está contenido en los aminoácidos 1-60 de la proteína  $\alpha$ -sinucleína (Figura 8C). Sin embargo, no puede excluirse que los aminoácidos 60-140 de  $\alpha$ -sinucleína puedan influir en la formación del epítipo N-terminal. De forma notable, los aminoácidos N-terminales 1-60 de  $\alpha$ -sinucleína humana que contienen la mutación A53T son 100 % idénticos al extremo N de  $\alpha$ -sinucleína de ratón. Por tanto, la preferencia observada por  $\alpha$ -sinucleína humana frente al ortólogo de ratón podría deberse a la influencia de la parte C-terminal de la sinucleína sobre la accesibilidad o formación del epítipo de NI-202.12F4 preferido en el extremo N. Los estudios de cartografía epitópica que usan fragmentos derivados N-terminales menores de  $\alpha$ -sinucleína (aminoácidos 1-20; 21-40; 41-60; 11-30 31-50) no revelaron unión del anticuerpo NI-202.12F4 a ninguno de los péptidos, sugiriendo que estas regiones no son suficientes para la unión de NI-202.12F4 (Figura 8D).

#### **Ejemplo 4: El anticuerpo derivado humano recombinante contra alfa-sinucleína mejora el rendimiento motor y el comportamiento en laberinto elevado en cruz en un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Parkinson**

Para valorar los efectos farmacológicos del tratamiento de NI-202.12F4, se trataron ratones transgénicos de 10,5 meses de edad que sobreexpresan el transgén de  $\alpha$ -sinucleína A537 humana (Giasson y col., *Neuron* 34 (2002), 521-533) semanalmente i.p. con 5 mg/kg de anticuerpo NI-202.12F4 quimérico recombinante o control de vehículo durante un total de 4 meses. Después de 2 meses de tratamiento, se evaluó el rendimiento motor en la prueba del poste. Los ratones tratados con NI-202.12F4 mostraron una mejora significativa en el rendimiento motor en comparación con el grupo tratado con vehículo con un tiempo significativamente reducido para girar en el poste (Tgiro;  $p < 0,001$ ;  $n = 17-19$  animales por grupo) así como el tiempo total para descender a la jaula de alojamiento (Ttotal;  $p < 0,05$ ;  $n = 17-19$  animales por grupo) como se muestra en la Figura 9. En una segunda prueba de comportamiento, se analizaron los efectos del tratamiento sobre el rendimiento en laberinto elevado en cruz. Se reseñó anteriormente que los ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T exhibían un comportamiento deteriorado de laberinto elevado en cruz, gastando más tiempo en los brazos abiertos en comparación con los controles de tipo silvestre (George y col., *Exp. Neurol.*, 210 (2008), 788-92). Como se muestra en la Figura 10, el tratamiento crónico con NI-202.12F4 conduce a una mejora significativa del comportamiento en laberinto elevado en cruz en animales transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T. Los ratones tratados con anticuerpo gastan significativamente menos tiempo y cubrían una distancia significativamente menor en los brazos abiertos en comparación con animales tratados con vehículo ( $p < 0,05$ ;  $n = 17-19$  animales por grupo), mientras que los niveles de actividad eran equivalentes para ambos grupos. Estos resultados demuestran que el tratamiento crónico con el anticuerpo NI-202.12F4 conduce a mejoras significativas del rendimiento motor y libera del comportamiento anormal en laberinto elevado en cruz en modelos de ratón transgénico de  $\alpha$ -sinucleína de enfermedad de Parkinson.

#### **Ejemplo 5: El anticuerpo NI-202.12F4 aumenta los niveles plasmáticos de sinucleína en modelos de ratón transgénico de sinucleína de enfermedad de Parkinson**

Se trataron ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T de 10,5 meses de edad semanalmente i.p. durante 2 meses con NI-202.12F4 quimérico 5 mg/kg o PBS. 24 h después de la última inyección, se prepararon muestras plasmáticas y se determinaron las concentraciones plasmáticas de anticuerpo de tratamiento y  $\alpha$ -sinucleína humana por ELISA (Figura 11). Los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -sinucleína aumentaban significativamente más de 10 veces en comparación con animales tratados con vehículo ( $25 \pm 4,1$  ng/ml para el grupo de tratamiento con NI-202.12F4 frente a  $1,9 \pm 1,2$  ng/ml para el grupo de PBS,  $p = 0,0002$ ), demostrando la modulación farmacodinámica de la  $\alpha$ -sinucleína tras el tratamiento con NI-202.12F4. Se observaron efectos similares sobre el tratamiento agudo con anticuerpo en los ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A30P. Como en los modelos transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T y A30P la  $\alpha$ -sinucleína humana se expresa predominantemente en el cerebro, el aumento de  $\alpha$ -sinucleína humana en circulación podría deberse a un flujo de entrada neto de  $\alpha$ -sinucleína mediado por NI-202.12F4 del cerebro a la periferia.

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a  $\alpha$ -sinucleína humana en forma agregada y no se une específicamente a  $\beta$ -sinucleína o  $\gamma$ -sinucleína.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo compite por la unión a  $\alpha$ -sinucleína humana con un anticuerpo que tiene la región variable de cadena pesada (VH) expuesta en la SEQ ID NO: 10 y la región variable de cadena ligera (VL) expuesta en la SEQ ID NO: 13.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a un fragmento N-terminal 1-60 de  $\alpha$ -sinucleína humana.
4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo  
15 IgG que comprende en su región variable (i) las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 de la región VH con los residuos de aminoácidos expuestos en los residuos 31-25 de SEQ ID NO: 9, los residuos 50-68 de SEQ ID NO:9, y los residuos 101-102 de SEQ ID NO:9, respectivamente, y (ii) las CDR 1, 2 y 3 de la región variable VL con las secuencias de aminoácidos expuestas en los residuos 23-33 de SEQ ID NO:12, residuos 49-55 de SEQ ID NO:12 y residuos 88-98 de SEQ ID NO:12, respectivamente.
- 20 5. El anticuerpo de la reivindicación 4, donde VH consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10 y VL consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13.
6. El anticuerpo de la reivindicación 4 o 5, donde la cadena pesada de inmunoglobulina comprende un  
25 región constante de cadena pesada de IgG1 humana y la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una región constante de cadena ligera lambda humana.
7. Un polinucleótido o polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 8. Un ADNc o ADNc que comprenden la cadena ligera y pesada del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Un vector de expresión o vectores de expresión que comprenden el polinucleótido o polinucleótidos de  
35 la reivindicación 7 o el ADNc o los ADNc de la reivindicación 8.
10. Una célula huésped que comprende el vector de expresión o vectores de expresión de la reivindicación 9.
- 40 11. Un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana o fragmento de unión a alfa-sinucleína humana del mismo, comprendiendo el procedimiento:  
cultivar la célula huésped de la reivindicación 10 en un cultivo celular; y  
aislar el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana o fragmento de unión a alfa-sinucleína humana del mismo del cultivo celular.
- 45 12. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad sinucleinopática en un sujeto, donde la enfermedad sinucleinopática se selecciona de entre el grupo consistente en enfermedad de Parkinson (EP), demencia por enfermedad de Parkinson (DEP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante con cuerpos de Lewy de la  
50 enfermedad de Alzheimer (VCLEA), atrofia sistémica múltiple (ASM), insuficiencia autonómica pura (IAP), neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral de tipo 1 (NAHC-I), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, distrofia neuroaxonal generalizada de inicio juvenil (enfermedad de Hallervorden-Spatz), esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática y síndrome de Down.
- 55 13. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde la enfermedad sinucleinopática es enfermedad de Parkinson.
14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 60

15. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 enlazado con un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

16. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 enlazado con un agente de diagnóstico para uso en la detección *in vivo* de  $\alpha$ -sinucleína en el cuerpo humano.

17. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde se detecta  $\alpha$ -sinucleína por tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía por emisión de fotón único (SPECT), imagen óptica de infrarrojo cercano (NIR), imagen por resonancia magnética (MRI) o una combinación de los mismos.

**A**

NI-202.3G12-VHB1 (secuencia variable de cadena pesada VHB1; SEQ ID NO: 3)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
**EV**QLVQSGAEVKKPGASVRLSCRASGYNF IDFHIHWVRQAPGEGLEWMGWSNPQSGNSSSAQ

----FR3-----CDR3-----JH-----  
RFQGRVTMTTDTSMSAAYMDLNWLTLDLDTAVYYCTRPHDGAGNYRFDTWGQGTLVTVSS

NI-202.3G12-VHB1-GL (secuencia variable de cadena pesada VHB1, alineada con la secuencia de línea germinal, SEQ ID NO: 4)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
**QV**QLVQSGAEVKKPGASVRLSCRASGYNF IDFHIHWVRQAPGEGLEWMGWSNPQSGNSSSAQ

----FR3-----CDR3-----JH-----  
RFQGRVTMTTDTSMSAAYMDLNWLTLDLDTAVYYCTRPHDGAGNYRFDTWGQGTLVTVSS

NI-202.3G12-VLc1 (secuencia variable de cadena ligera VLc1, SEQ ID NO: 6)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3----  
**QSV**LTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALPKHYAHWYQQKPGQVP IVVIYKDTERPSGIPERFS

-----CDR3-----JK-----  
 GSTSGTTVTLTISGVQAEDEAHYYCQSADVSSTYVVFGGGKLTVL

NI-202.3G12-VLc1 (secuencia variable de cadena ligera VLc1, alineada con la secuencia de línea germinal, SEQ ID NO: 7)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3----  
**SYE**LTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALPKHYAHWYQQKPGQVP IVVIYKDTERPSGIPERFS

-----CDR3-----JK-----  
 GSTSGTTVTLTISGVQAEDEAHYYCQSADVSSTYVVFGGGKLTVL

**Fig. 1**



**B**

NI-202.12F4-VHA1b (secuencia variable de cadena pesada VHA1b; SEQ ID NO: 9)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
 EVQLV**Q**SGGGLVEPPGSLRLSCAVSGFD**FEKAWMSWVRQAPGQGLQWVAR**IKSTADGGTTSY  
 -----FR3-----CDR3-----JH-----  
AAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMN**SLKTEDTAVYYCTSAHWGQGL**TVTVSS

NI-202.12F4-VHA1b-GL (GL, secuencia variable de cadena pesada VHA1b, alineada con la secuencia de línea germinal, SEQ ID NO: 10)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
 EVQLV**E**SGGGLVEPPGSLRLSCAVSGFD**FEKAWMSWVRQAPGQGLQWVAR**IKSTADGGTTSY  
 -----FR3-----CDR3-----JH-----  
AAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMN**SLKTEDTAVYYCTSAHWGQGL**TVTVSS

NI-202.12F4-VLa1 (secuencia variable de cadena ligera VLa1, SEQ ID NO: 12)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
**QSV**LTQPPSVSVSPGQTARITCS**GEALPMQFAHWYQQRPGKAPVIVVYKDSERPSGVP**PERFS  
 -----CDR3-----JK-----  
 GSSSGTTATLTITGV**QAEDEADYYCQSPDSTNTYEV**FGGGTKLTVL

NI-202.12F4-VLa1 (secuencia variable de cadena ligera VLa1, alineada con la secuencia de línea germinal, SEQ ID NO: 13)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----  
**SYE**LTQPPSVSVSPGQTARITCS**GEALPMQFAHWYQQRPGKAPVIVVYKDSERPSGVP**PERFS  
 -----CDR3-----JK-----  
 GSSSGTTATLTITGV**QAEDEADYYCQSPDSTNTYEV**FGGGTKLTVL

**Fig. 1 (continuación)**

**C**

NI-202.3D8-VHE1 (secuencia variable de cadena pesada VHE1; SEQ ID NO: 15)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAISWVRQAPGKGLEWVAIISNDGSRKYYAD  
 ----FR3-----CDR3-----JH-----  
SVKGRFTISRDNSRDTLDLEMNSLRDEDTAVYYCAKKRGTYASRCKAFDFWGQGLTVTVSS

NI-202.3D8-VHE1-GL (secuencia variable de cadena pesada VHE1, alineada con la secuencia de línea germinal, SEQ ID NO: 16)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAISWVRQAPGKGLEWVAIISNDGSRKYYAD  
 ----FR3-----CDR3-----JH-----  
SVKGRFTISRDNSRDTLDLEMNSLRDEDTAVYYCAKKRGTYASRCKAFDFWGQGLTVTVSS

NI-202.3D8-VKa1 (secuencia variable de cadena ligera VKa1; SEQ ID NO: 18)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2----FR3----  
 DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQSISGWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRF  
 -----CDR3----JK-----  
 SSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQYDNYWTFGQGTKVEIK

NI-202.3D8-VKa1-GL (secuencia variable de cadena ligera VKa1, alineada con la secuencia de línea germinal, SEQ ID NO: 19)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2----FR3----  
 DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQSISGWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRF  
 -----CDR3----JK-----  
 SSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQYDNYWTFGQGTKVEIK

**Fig. 1 (continuación)**

**D**

NI-202.3D8-VKc1 (secuencia variable de cadena ligera VKc1; SEQ ID NO: 21)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
EIVMTQSPSSLSASIGDRVFTFCCRASHDISNYLAWFRQQPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SASGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCVQYRTYPLTFGQGTRLEIK
```

NI-202.3D8-VKc1-GL (secuencia variable de cadena ligera VKc1, alineada con la secuencia de línea germinal, SEQ ID NO: 22)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
DIQMTQSPSSLSASIGDRVFTFCCRASHDISNYLAWFRQQPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SASGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCVQYRTYPLTFGQGTRLEIK
```

**Fig. 1 (continuación)**

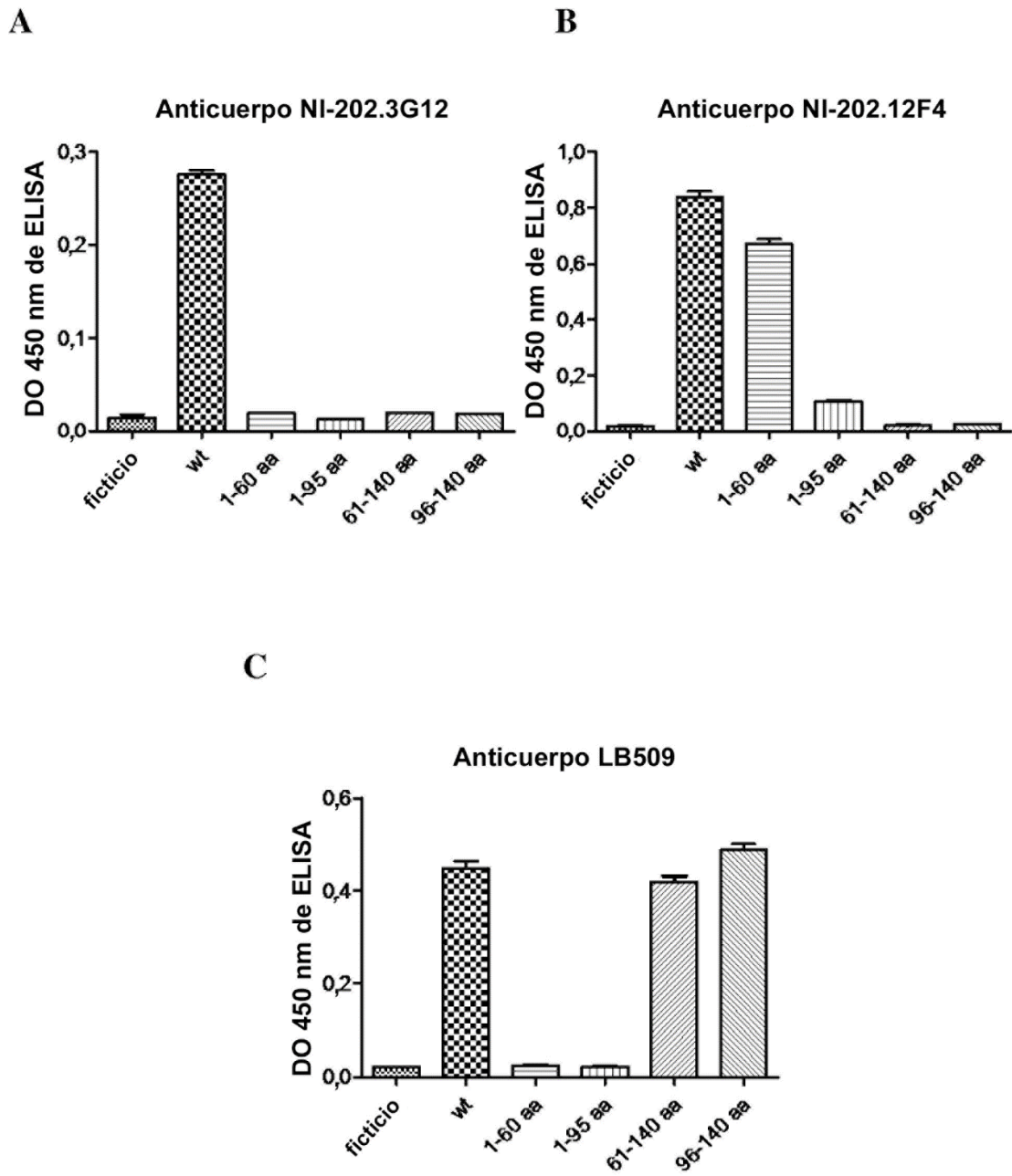
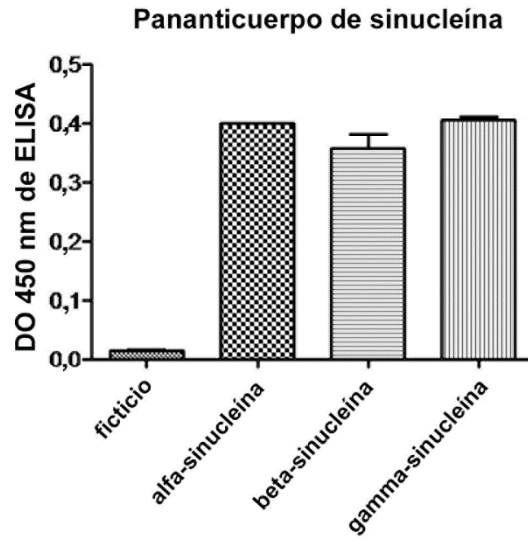
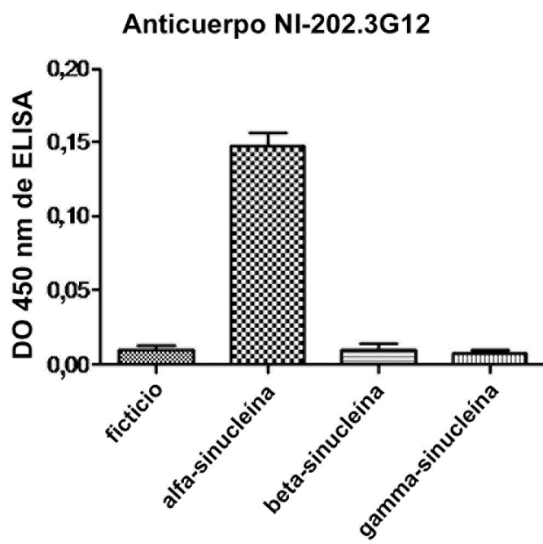


Fig. 2

A



A



B

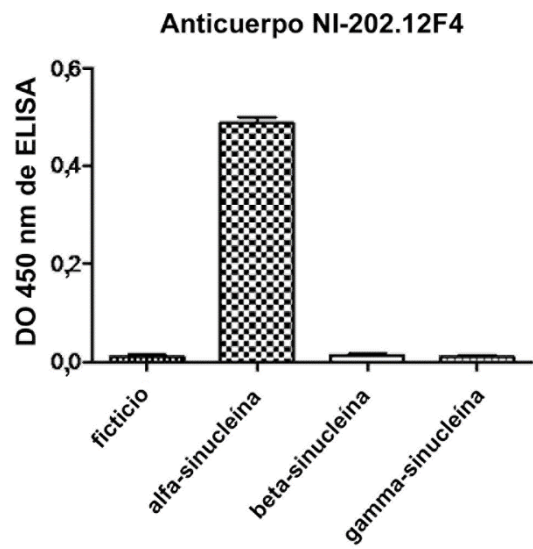


Fig. 3

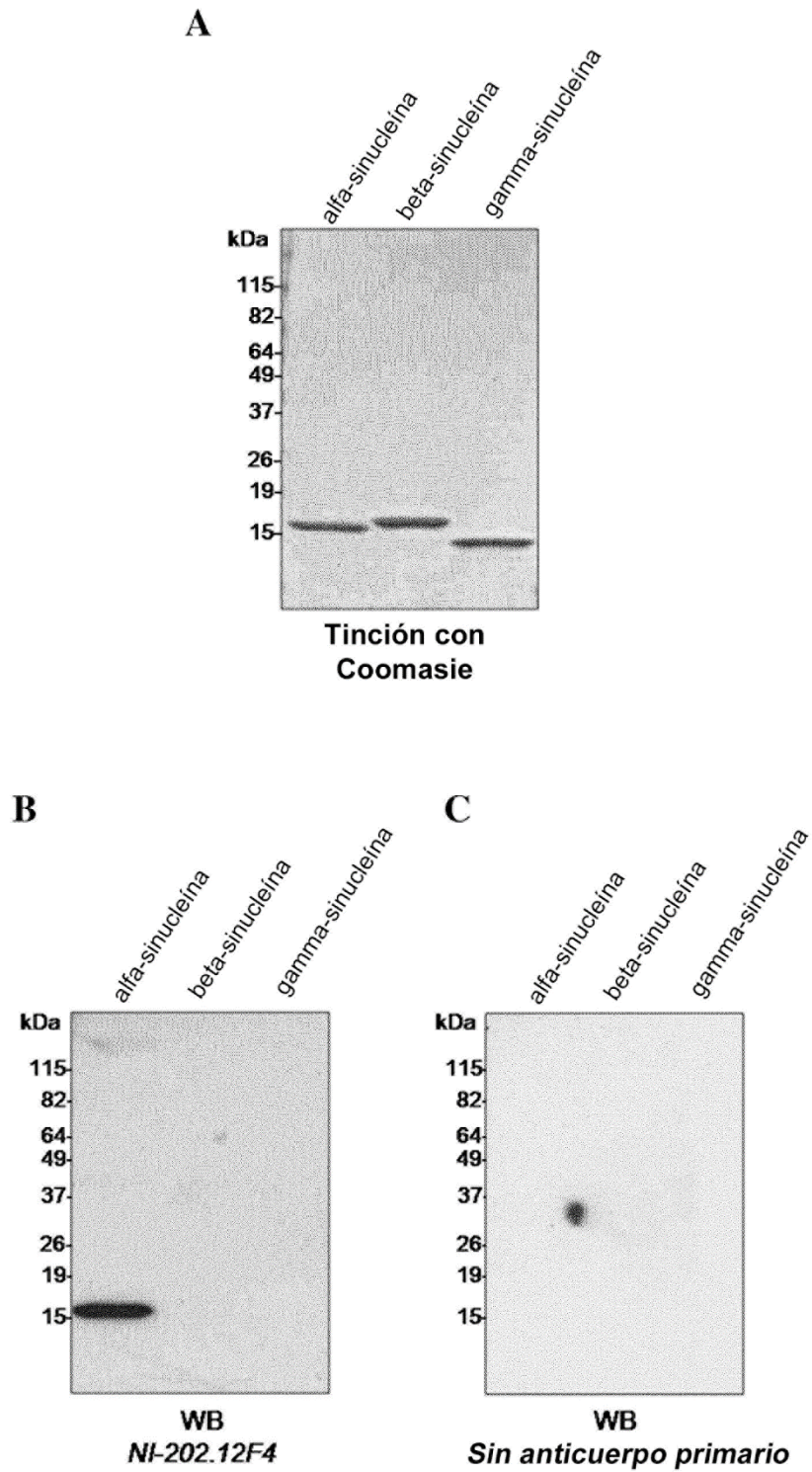
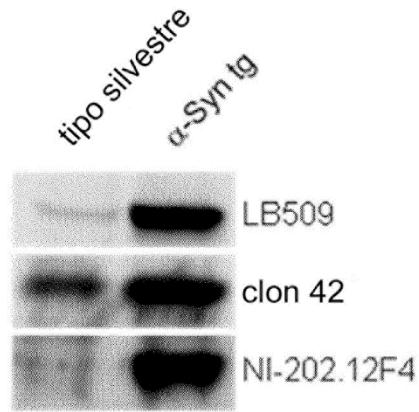


Fig. 4

A



B

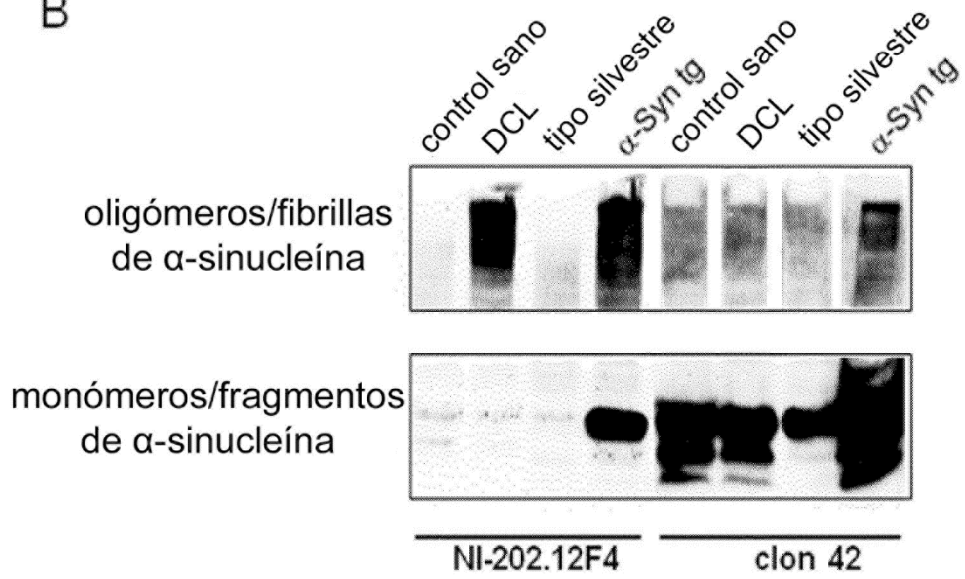


Fig. 5

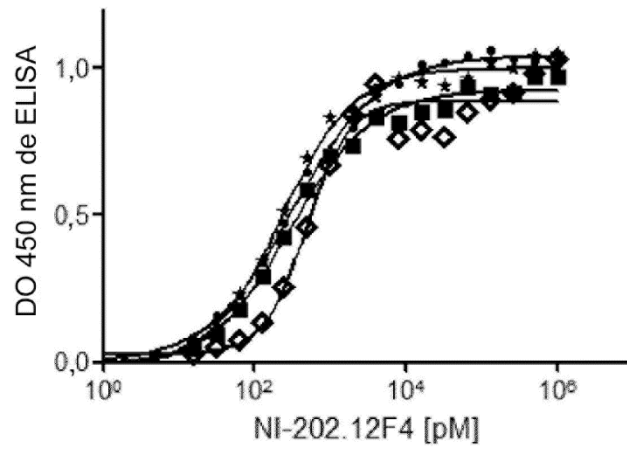


Fig. 6

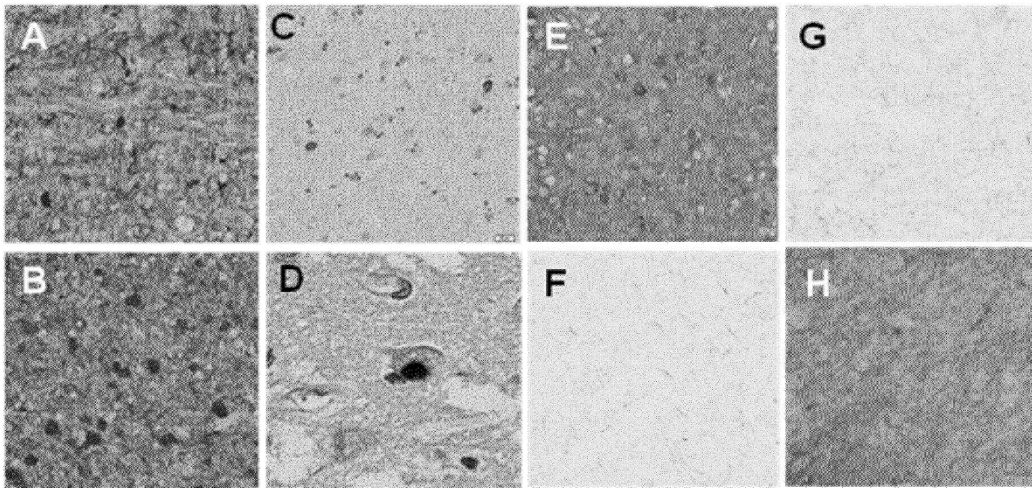


Fig. 7



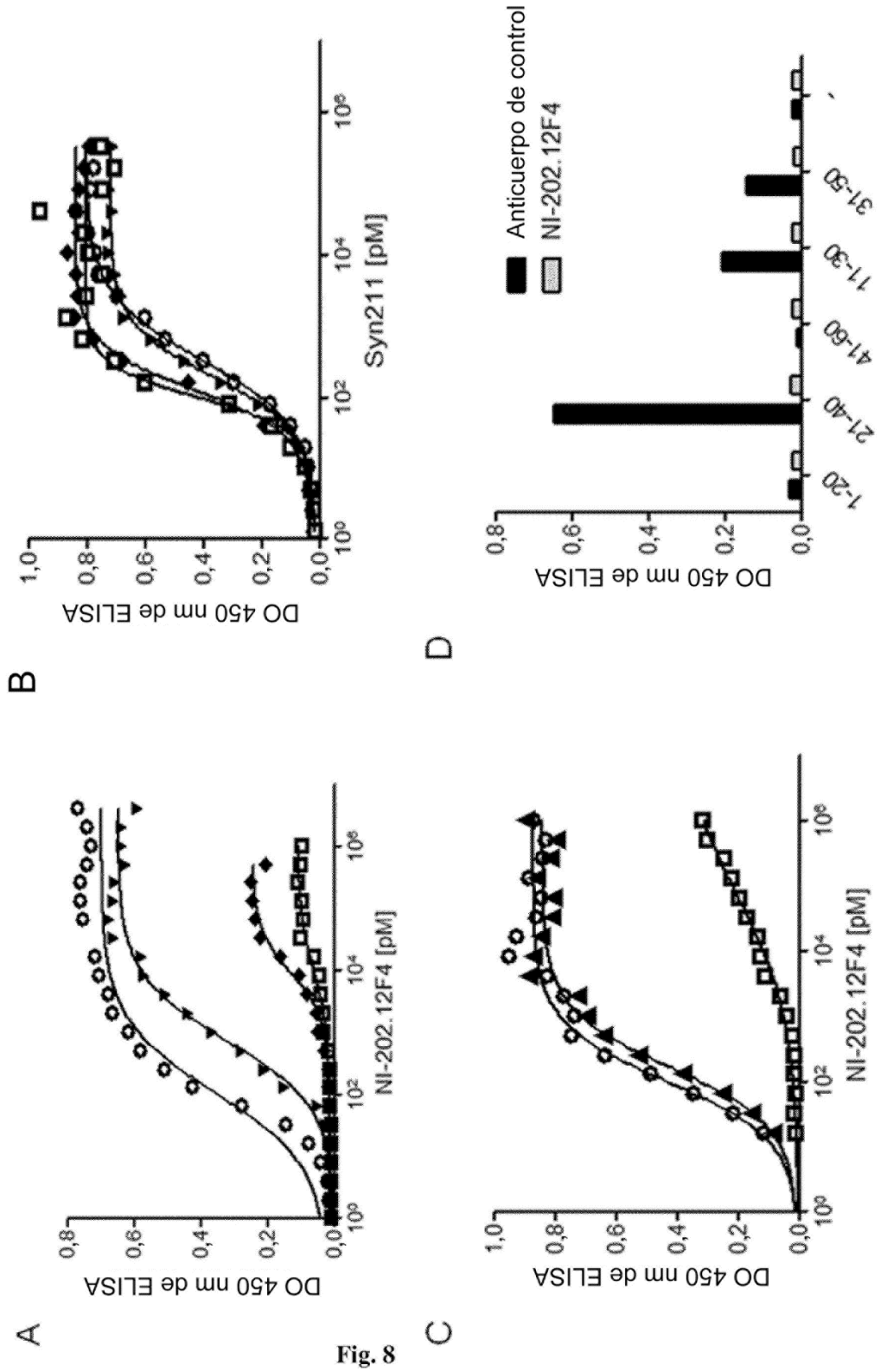


Fig. 8

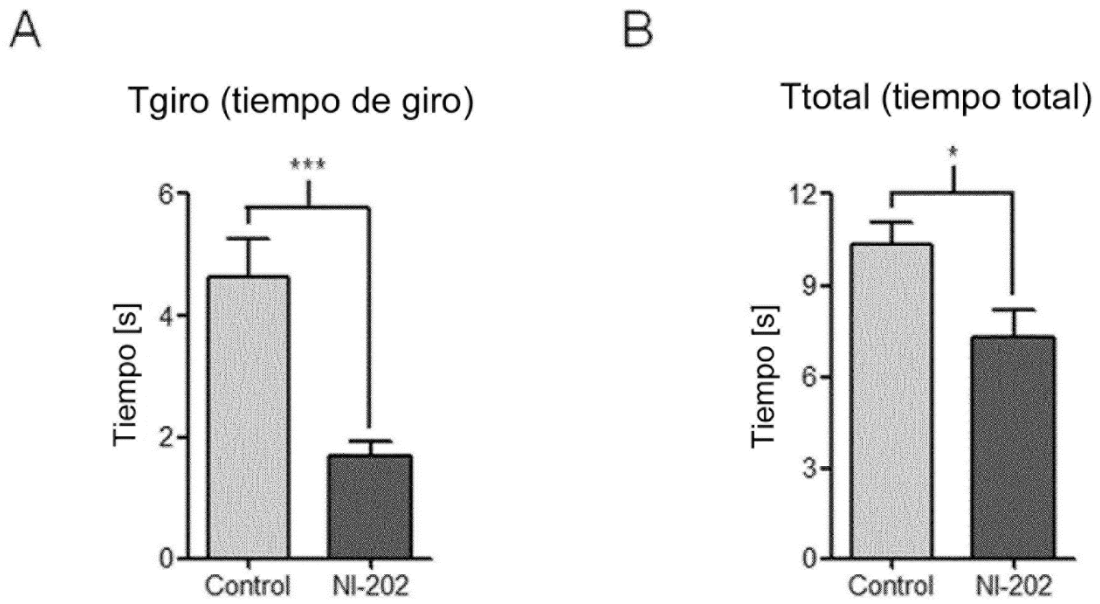


Fig. 9

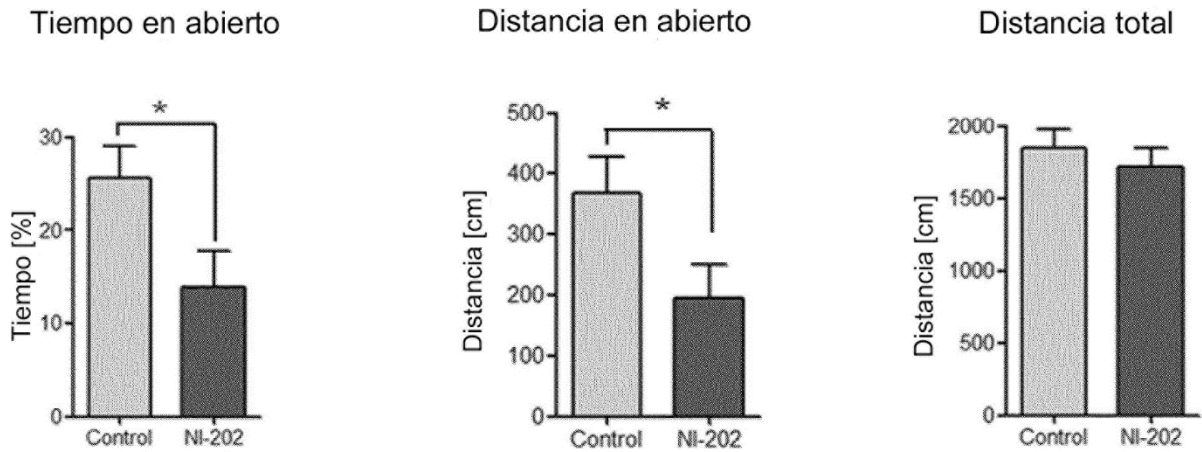


Fig. 10

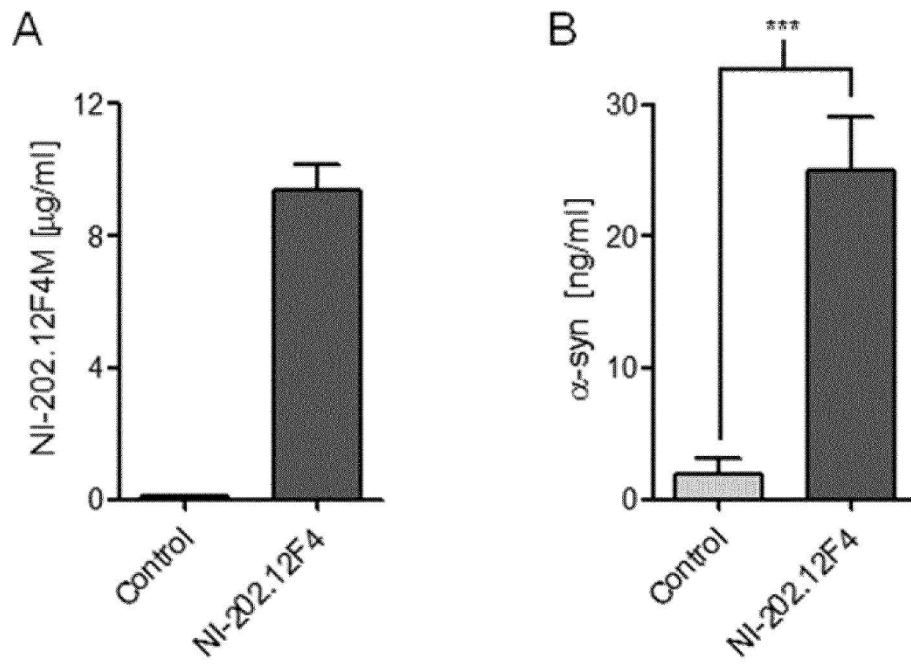


Fig. 11