(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 727 407**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2008 E 16154617 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3067066**

(54) Título: **Prevención y tratamiento de enfermedad sinucleinopática y amiloidogénica**

(30) Prioridad:

23.02.2007 US 710248
06.04.2007 US 697646
01.11.2007 US 984721 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2019

(73) Titular/es:

PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (50.0%)
77 Sir Rogerson's Quay, Block C, Grand Canal Docklands
Dublin 2, D02 T804, IE y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

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

DESCRIPCIÓN

Prevención y tratamiento de enfermedad sinucleinopática y amiloidogénica

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La patología cerebral por alfa-sinucleína (alfa-SN) es una característica evidente de varias enfermedades neurodegenerativas, que incluyen enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA), atrofia multisistémica (AMS) y neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro tipo-1 (NACH-1). Común a todas estas enfermedades, llamadas sinucleinopatías, son inclusiones insolubles proteináceas en las neuronas y la glía que están compuestas principalmente de alfa-SN.

Los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy son inclusiones intraneuronales que están compuestas principalmente de alfa-SN. Los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy son distintivos neuropatológicos de la enfermedad de Parkinson (EP). La EP y otras enfermedades sinucleinopáticas se han denominado conjuntamente enfermedad de cuerpos de Lewy (ECL). La ECL se caracteriza por degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deterioro cognitivo y formación de cuerpos de Lewy (CL) (McKeith et al., Clinical and pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the CDLB International Workshop, Neurology (1996) 47:1113-24). Otras ECL incluyen enfermedad difusa con cuerpos de Lewy (EDCL), variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA), EP y enfermedad de Alzheimer (EA) combinadas, y atrofia multisistémica. La demencia con cuerpos de Lewy (DCL) es un término acuñado para reconciliar diferencias en la terminología de ECL.

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

En los últimos años ha surgido una nueva esperanza para el entendimiento de la patogénesis de EP. Específicamente, varios estudios han mostrado que la proteína sináptica alfa-SN desempeña una función central en la patogénesis de la EP ya que: (1) esta proteína se acumula en CL (Spillantini et al., Nature (1997) 388:839-40; Takeda et al., AM J. Pathol. (1998) 152:367-72; Wakabayashi et al., Neurosci. Lett. (1997) 239:45-8), (2) mutaciones en el gen alfa-SN se co-segregan con formas familiares raras de parkinsonismo (Kruger et al., Nature Gen. (1998) 18:106-8; Polymeropoulos MH, et al., Science (1997) 276:2045-7) y (3) su expresión en exceso en ratones transgénicos (Masliah et al., Science (2000) 287:1265-9) y *Drosophila* (Feany et al., Nature (2000) 404:394-8) imita varios aspectos patológicos de la EP. Así, el hecho de que la acumulación de alfa-SN en el cerebro esté asociada a alteraciones morfológicas y neurológicas similares en especies tan diversas como seres humanos, ratones y moscas sugiere que esta molécula contribuye al desarrollo de EP.

Un fragmento de alfa-SN, previamente determinado por ser un constituyente de las placas de amiloide de EA, se llamó el componente no de amiloide-beta (no Aβ) del amiloide de EA (NAC) (Iwai A., Biochim. Biophys. Acta (2000) 1502:95-109); Masliah et al., AM. J. Pathol (1996) 148:201-10; Uéda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:11282-6). Aunque no se conoce la función precisa de NAC, puede desempeñar una función crítica en acontecimientos sinápticos, tales como la plasticidad neural durante el desarrollo, y el aprendizaje y la degeneración de terminaciones nerviosas bajo afecciones patológicas en ECL, EA y otros trastornos (Hasimoto et al., Alpha-Synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease, Brain Pathol (1999) 9:707-20; Masliah, et al., (2000).

La EA, EP y la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) son los trastornos neurodegenerativos más comúnmente encontrados en los ancianos. Aunque su incidencia continúa aumentando, creando un grave problema para la salud pública, hasta la fecha estos trastornos no son ni curables ni prevenibles. Estudios epidemiológicos recientes han demostrado una estrecha relación clínica entre EA y EP, ya que aproximadamente el 30 % de los pacientes con Alzheimer también tienen EP. En comparación con el resto de la población en envejecimiento, es así más probable que los pacientes con EA desarrollen EP concomitante. Además, los pacientes con EP que se vuelven dementes normalmente han desarrollado EA clásica. Aunque cada enfermedad neurodegenerativa parece tener una predilección por regiones cerebrales específicas y poblaciones de células, produciendo distintas características patológicas, la EP, EA, DCL y ECL también comparten distintivos patológicos comunes. Los pacientes con EA familiar, síndrome de Down o EA esporádica desarrollan CL en la amígdala, que son los distintivos neuropatológicos clásicos de la EP. Adicionalmente, cada enfermedad está asociada a la degeneración de neuronas, conexiones sinápticas interneuronales y con el tiempo muerte celular, el agotamiento de neurotransmisores, y acumulación anormal de proteínas erróneamente plegadas, cuyos precursores participan en la función normal del sistema

nervioso central. Estudios bioquímicos han confirmado el enlace entre EA, EP y DCL.

Las placas neuríticas que son el distintivo patológico clásico de la EA contienen péptido beta-amiloide (Aβ) y péptido de componente no de beta amiloide (NAC). Aβ se deriva de una proteína precursora mayor llamada proteína precursora de amiloide (APP). NAC se deriva de una proteína precursora mayor llamada el componente no de beta amiloide de APP, ahora más comúnmente denominado alfa-SN. NAC comprende los residuos de aminoácidos 60-87 o 61-95 de alfa-SN. Tanto Aβ como NAC se identificaron primero en placas de amiloide como fragmentos proteolíticos de sus proteínas de longitud completa respectivas, para las que se identificaron ADNc de longitud completa y se clonaron.

Alfa-SN es parte de una familia mayor de proteínas que incluyen beta- y gamma-sinucleína y sinoretina. Alfa-SN se expresa en el estado normal asociado a sinapsis y se cree que desempeña una función en la plasticidad neural, aprendizaje y memoria. Se han identificado mutaciones en alfa-SN humana (h) que potencian la agregación de alfa-SN (Ala30Pro y Ala53Thr) y están asociadas a formas raras de formas dominantes autosómicas de EP. Se desconoce el mecanismo por el que estas mutaciones aumentan la propensión de alfa-SN a agregarse.

A pesar del hecho de que varias mutaciones pueden encontrarse en APP y alfa-SN en la población, la mayoría de los casos de EA y EP son esporádicos. Las formas esporádicas más frecuentes de estas enfermedades están asociadas a una acumulación anormal de Aβ y alfa-SN, respectivamente. Sin embargo, los motivos para la acumulación en exceso de estas proteínas son desconocidos. Aβ se secreta de neuronas y se acumula en placas de amiloide extracelulares. Adicionalmente, Aβ puede detectarse dentro de neuronas. Alfa-SN se acumula en inclusiones intraneuronales llamadas CL. Aunque las dos proteínas normalmente se encuentran juntas en placas de EA neuríticas extracelulares, también se encuentran ocasionalmente juntas en inclusiones intracelulares.

No están claros los mecanismos por los que la acumulación de alfa-SN conduce a neurodegeneración y los síntomas característicos de EP. Sin embargo, la identificación de la función de factores que promueven y/o que bloquean la agregación de alfa-SN es crítica para el entendimiento de la patogénesis de ECL y el desarrollo de tratamientos novedosos para sus trastornos asociados. La investigación para identificar tratamientos se ha dirigido hacia la búsqueda de compuestos que reducen la agregación de alfa-SN (Hashimoto, *et al.*) o la prueba de factores de crecimiento que promoverán la regeneración y/o supervivencia de neuronas dopaminérgicas, que son las células principalmente afectadas (Djaldetti et al., New therapies for Parkinson's disease, J. Neurol (2001) 248:357-62; Kirik et al., Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system, J. Neurosci (2000) 20:4686-4700). Estudios recientes en un modelo de ratón transgénico de EA han mostrado que los anticuerpos contra Aβ 1-42 facilitan y simulan la eliminación de amiloide del cerebro, mejoran la patología similar a EA y producen rendimiento cognitivo mejorado (Schenk et al., Immunization with amyloid-β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in PDAPP mouse, Nature (1999) 408:173-177; Morgan et al., A-beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal models of Alzheimer's disease, Nature (2000) 408:982-985; Janus et al., A-beta peptide immunization reduces behavioral impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease, Nature (2000) 408:979-82). A diferencia de las placas de amiloide extracelulares encontradas en los cerebros de pacientes con Alzheimer, los cuerpos de Lewy son intracelulares, y los anticuerpos normalmente no entran en la célula. La WO 2007/012061 divulga anticuerpos monoclonales que reconocoen epítopos en los extremos N- y C-terminales de la alfa-sinucleina y que son útiles en el tratamiento de enfermedades sinucleinopáticas y amilodogénicas.

Sorprendentemente, dada la naturaleza intracelular de CL en tejido cerebral, los inventores han tenido éxito en reducir el número de inclusiones en ratones transgénicos inmunizados con sinucleína. La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, al tratamiento de EP y otras enfermedades asociadas a CL por administración de sinucleína, fragmentos de sinucleína, antígenos que imitan la sinucleína o fragmentos de la misma, o anticuerpos para ciertos epítopos de sinucleína para un paciente en condiciones que generan una respuesta inmunitaria beneficiosa en el paciente. Los inventores también han tenido sorprendentemente éxito en reducir el número de inclusiones en ratones transgénicos inmunizados con Aβ. La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, al tratamiento de EP y otras enfermedades asociadas a CL por administración de Aβ, fragmentos de Aβ, antígenos que imitan Aβ o fragmentos de los mismos, o anticuerpos para ciertos epítopos de Aβ a un paciente en condiciones que generan una respuesta inmunitaria beneficiosa en el paciente. La invención cumple una necesidad que se sentía desde hace tiempo para pautas terapéuticas para prevenir o mejorar la neuropatología y, en algunos pacientes, el deterioro cognitivo asociado a EP y otras enfermedades asociadas a CL.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 118-126 de la alfa-sinucleína humana, los residuos siendo numeradso de acuerdo con la SEC ID Nº: 1, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad del cuerpo de Lewy (ECL) seleccionada de enfermedad de Parkinson, incluyendo la enfermedad de Parkinson idiopática, demencia con cuerpos de Lewy (DCL), enfermedad del cuerpo de Lewy difuso (ECLD), variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA), insuficiencia autonómica pura, disfagia del cuerpo de Lewy, ECL incidental, ECL heredada, atrofia del

sistema múltiple, atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome de Shy-Drager, en donde el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal 9E4 por unirse a la alfa-sinucleína humana, en donde el anticuerpo 9E4 es producido por el hibridoma JH17.9E4.3.37:1.14.2 depositado como el número de acceso de ATCC PTA-8221.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro. Tales métodos implican inducir una respuesta inmunogénica contra alfa-SN. Tal inducción puede lograrse por administración activa de un inmunogén o pasiva por administración de un anticuerpo o un derivado de un anticuerpo para sinucleína. En algunos métodos, el paciente es asintomático. En algunos métodos, el paciente tiene la enfermedad y es asintomático. En algunos métodos, el paciente tiene un factor de riesgo para la enfermedad y es asintomático. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson, y la administración del agente mejora las características motoras del paciente. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson, administrando el agente se previene el deterioro de las características motoras del paciente. En algunos métodos, el paciente está libre de enfermedad de Alzheimer.

Para el tratamiento de pacientes que padecen los cuerpos de Lewy o la agregación de alfa-SN en el cerebro, una pauta de tratamiento implica administrar una dosis de alfa-SN o un fragmento activo de la misma al paciente para inducir la respuesta inmunitaria. En algunos métodos, la alfa-SN o un fragmento activo de la misma se administra en múltiples dosis durante un periodo de al menos seis meses. La alfa-SN o un fragmento activo de la misma puede administrarse, por ejemplo, periféricamente, intraperitonealmente, por vía oral, subcutáneamente, intracranealmente, intramuscularmente, tópicamente, intranasalmente o intravenosamente. En algunos métodos, la alfa-SN o un fragmento activo de la misma se administra con un adyuvante que potencia la respuesta inmunitaria a la alfa-SN o un fragmento activo de la misma. En algunos métodos, el respuesta inmunogénica comprende anticuerpos para alfa-SN o un fragmento activo de la misma.

En algunos métodos, el agente es los aminoácidos 35-65 de alfa-SN. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 130-140 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos totales, o menos de 30 aminoácidos totales. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 130-136 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos totales, o menos de 30 aminoácidos totales. En algunos métodos, los aminoácidos del extremo C del agente son el aminoácido del extremo C de alfa-SN. En algunos de los métodos anteriores, la alfa-SN o fragmento activo está ligada a un vehículo en el extremo N de la alfa-SN o fragmento activo.

En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 91-99 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos totales, o menos de 30 aminoácidos totales. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 118-126 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos totales, o menos de 30 aminoácidos totales. En algunos métodos, el agente comprende los aminoácidos 1-10 de alfa-SN y tiene menos de 40 aminoácidos totales, o menos de 30 aminoácidos totales. En algunos métodos, los aminoácidos del extremo N del agente son el aminoácido del extremo N de alfa-SN. En algunos de los métodos anteriores, la alfa-SN o fragmento activo está ligada a un vehículo en el extremo C de alfa-SN o fragmento activo. En algunos de los métodos anteriores, la alfa-SN o fragmento activo está ligada a una molécula de vehículo para formar un conjugado.

En algunos métodos, el agente se administra a un paciente administrando un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende un fragmento de alfa-SN.

Para el tratamiento de pacientes que padecen cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro, una pauta de tratamiento implica administrar una dosis de un anticuerpo para alfa-SN o un fragmento activo de la misma al paciente para inducir la respuesta inmunitaria. El anticuerpo usado puede ser humano, humanizado, quimérico o policlonal y puede ser monoclonal o policlonal. En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es una IgG1 humana. En algunos métodos, el anticuerpo se prepara a partir de un ser humano inmunizado con el péptido alfa-SN y el ser humano puede ser el paciente que va a tratarse con el anticuerpo. En algunos métodos, el anticuerpo se une a la superficie externa de células neuronales que tienen los cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el anticuerpo es internalizado dentro de las células neuronales que tienen los cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy.

En algunos métodos, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como composición farmacéutica. En algunos métodos, el anticuerpo se administra a una dosificación de 0,0001 a 100 mg/kg, preferentemente, al menos 1 mg/kg de peso corporal de anticuerpo. En algunos métodos, el anticuerpo se administra en múltiples dosis durante un periodo prolongado, por ejemplo, al menos seis meses. En algunos métodos, los anticuerpos pueden administrarse como una composición de liberación sostenida. El anticuerpo puede administrarse, por ejemplo, periféricamente, intraperitonealmente, por vía oral, subcutáneamente, intracranealmente, intramuscularmente, tópicamente, intranasalmente o intravenosamente. En algunos métodos, el paciente se monitoriza para el nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

En algunos métodos, el anticuerpo se administra administrando un polinucleótido que codifica al menos una

cadena de anticuerpo al paciente. El polinucleótido se expresa para producir la cadena de anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el polinucleótido codifica cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y el polinucleótido se expresa para producir las cadenas pesadas y ligeras en el paciente.

La presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos para alfa-SN descritos en la presente solicitud y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro que comprende administrar un agente que induce una respuesta inmunogénica contra alfa-SN, y que comprende además administrar un segundo agente que induce una respuesta inmunogénica contra Aβ al paciente. En algunos métodos, el agente es Aβ o un fragmento activo del mismo. En algunos métodos, el agente es un anticuerpo para Aβ.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-SN en el cerebro que comprende administrar un agente que induce una respuesta inmunogénica contra Aβ a un paciente. En algunos métodos, el agente es Aβ o un fragmento activo del mismo. En algunos métodos, el agente es un anticuerpo para Aβ. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, el paciente está libre de enfermedad de Alzheimer y no tiene factores de riesgo de la misma. En algunos métodos, comprende además monitorizar un signo o síntoma de la enfermedad de Parkinson en el paciente. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson y la administración del agente produce mejora en un signo o síntoma de la enfermedad de Parkinson.

Sse proporcionan además composiciones farmacéuticas que comprenden un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica contra un componente de un cuerpo de Lewy en un paciente, tal como se ha descrito anteriormente, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En algunos compuestos, el agente es alfa-SN o un fragmento activo, por ejemplo, NAC, o cualquiera de los fragmentos descritos en la solicitud. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo específico para un componente de un cuerpo de Lewy.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un agente eficaz para provocar una respuesta inmunitaria contra un componente de sinucleína-NAC de una placa de amiloide en un paciente. En algunos compuestos, el agente es alfa-SN o un fragmento activo, por ejemplo, NAC, o cualquiera de los fragmentos de alfa sinucleína descritos en la solicitud, y, opcionalmente, un adyuvante. En otros compuestos, el agente es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a alfa-SN o un fragmento de la misma, y, opcionalmente, un vehículo farmacéutico.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de cribado de un anticuerpo para actividad en prevenir o tratar una enfermedad asociada a cuerpos de Lewy. Tales métodos implican poner en contacto una célula neuronal que expresa sinucleína con el anticuerpo. Entonces se determina si la puesta en contacto reduce los depósitos de sinucleína en las células en comparación con células de control no puestas en contacto con el anticuerpo.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de cribado de un anticuerpo para actividad en el tratamiento o prevención de una enfermedad de cuerpos de Lewy en el cerebro de un paciente. Tales métodos implican poner en contacto el anticuerpo con un polipéptido que comprende al menos cinco aminoácidos contiguos de alfa-SN. Entonces se determina si el anticuerpo se une específicamente al polipéptido, proporcionando la unión específica una indicación de que el anticuerpo tiene actividad en el tratamiento de la enfermedad.

Adicionalmente se proporcionan métodos de efectuar profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. El método comprende administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1, efectuando así la profilaxis o tratamiento de la enfermedad.

Opcionalmente, el fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína está libre de los residuos 1-69 de alfa sinucleína, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa sinucleína humana dentro de un epítopo seleccionado del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128 y SN124-140, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica está libre de anticuerpos que se unen específicamente a residuos de alfa sinucleína humana fuera del epítopo seleccionado. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene de 5-20, 5-25 ó 5-30 aminoácidos contiguos entre las posiciones 70-140 de alfa-sinucleína, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene de 5-20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 120-140 de alfa sinucleína, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende un segmento de alfa sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN87-97, SN111-121,

SN114-124 y SN128-136, y contiene no más de 40, o no más de 30, residuos contiguos en total de alfa sinucleína, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende un segmento de alfa sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN124-134, SN 91-99 y SN118-126 y contiene no más de 40, o no más de 30, residuos contiguos en total de alfa sinucleína, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1 Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende SN125-140 y contiene no más de 40, o no más de 30, residuos contiguos en total de alfa sinucleína, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende SN130-140 y contiene no más de 40, o no más de 30, residuos contiguos en total de alfa sinucleína, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico comprende SN83-140, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

Opcionalmente, el fragmento inmunogénico está seleccionado de un grupo que consiste en SN124-140, SN125-140, SN126-140, SN127-140, SN128-140, SN129-140, SN130-140, SN131-140, SN132-140, SN133-140, SN134-140, SN135-140, SN136-140, SN137-140, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN129-139, SN130-139, SN131-139, SN132-139, SN133-139, SN134-139, SN135-139, SN136-139, SN137-139, SN124-138, SN124-138, SN125-138, SN126-138, SN127-138, SN128-138, SN129-138, SN130-138, SN131-138, SN132-138, SN133-138, SN134-138, SN135-138, SN136-138, SN124-137, SN125-137, SN126-137, SN127-137, SN128-137, SN129-137, SN130-137, SN131-137, SN132-137, SN133-137, SN134-137, SN135-137, SN124-136, SN125-136, SN126-136, SN127-136, SN128-136, SN129-136, SN130-136, SN131-136, SN132-136, SN133-136 y SN134-136, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa sinucleína humana dentro de un epítopo seleccionado del grupo que consiste en SN1-20, SN2-21, SN2-23 y SN1-40, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica está libre de anticuerpos que se unen específicamente a residuos de alfa sinucleína humana dentro de la región SN25-69, SN25-140, SN40-69, SN40-140 o SN70-140. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene de 5-20, 5-25 ó 5-30 aminoácidos contiguos entre las posiciones 1-40 de alfa sinucleína, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

Opcionalmente, el fragmento inmunogénico tiene de 5-20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 1 y 20 y de 5-20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 120 y 140 de alfa sinucleína, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico contiene no más de 40, o no más de 30, residuos contiguos en total de alfa sinucleína, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa sinucleína humana dentro de un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y dentro de un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa sinucleína humana dentro de un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y dentro de un epítopo dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica no comprende anticuerpos que se unen específicamente a alfa sinucleína humana dentro de un epítopo dentro de los residuos 41 y 119 de alfa-sinucleína humana.

Opcionalmente, el fragmento inmunogénico está ligado a un vehículo para formar un conjugado. Opcionalmente, el polipéptido comprende el fragmento inmunogénico fusionado con el vehículo. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico está ligado a la molécula de vehículo en el extremo C del fragmento de alfa-sinucleína. Opcionalmente, múltiples copias del fragmento están interconectadas con múltiples copias del vehículo. Opcionalmente, el fragmento inmunogénico se administra con un adyuvante. Opcionalmente, la etapa de administración efectúa la eliminación al menos parcial de cuerpos de Lewy. Opcionalmente, la etapa de administración desagrega cuerpos de Lewy. Opcionalmente, la etapa de administración reduce los niveles de oligómeros de alfa sinucleína en sinapsis. Opcionalmente, la etapa de administración elimina sinucleína por la activación de una vía lisosómica.

Opcionalmente, la respuesta inmunogénica se induce por la administración de un único polipéptido o proteína de fusión. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica se induce por la administración de más de un polipéptido (por ejemplo, dos polipéptidos). Opcionalmente, la respuesta inmunogénica se induce por la administración de un primer polipéptido que comprende un primer fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana, y administrar un polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140, y preferentemente los residuos 120-140, de alfa-sinucleína humana.

Opcionalmente, la respuesta inmunogénica se induce por la administración de dos o más polipéptidos en combinación. Opcionalmente, los dos o más polipéptidos se co-administran y/o co-formulan.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende un primer polipéptido que

comprende un primer fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína y un segundo polipéptido que comprende un segundo fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína, en la que el primer fragmento inmunogénico es eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y el segundo fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína es eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, la composición está libre de un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína que comprende los residuos 25-69 de alfa-sinucleína. El primer y segundo fragmentos inmunogénicos pueden estar físicamente ligados (por ejemplo, como conjugado o proteína de fusión). El primer y segundo fragmentos inmunogénicos pueden estar coformulados.

La divulgación proporciona además métodos de efectuar la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. En una realización, los métodos comprenden administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad una pauta eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Si el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1, opcionalmente el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 83-140 de alfa sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 120-140 de alfa sinucleína humana. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente dentro de un epítopo dentro de un segmento de alfa sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128, SN118-126, SN 91-99, SN124-134 y SN124-140, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

En otro realización más, los métodos comprenden administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad una pauta eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-40 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Si el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-40 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1, opcionalmente el anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20, o dentro de los residuos 1-10, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

En otra realización adicional, los métodos comprenden administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad una pauta eficaz de un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-40 de alfa-sinucleína humana y un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

Si un primer anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-40 de alfa-sinucleína humana y un segundo anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1, opcionalmente el segundo anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se administran simultáneamente. Opcionalmente, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se administran en el mismo ciclo de tratamiento.

Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Opcionalmente, el anticuerpo es una población policlonal de anticuerpos que carece de unión específica a residuos de alfa sinucleína fuera del epítopo. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Opcionalmente, el anticuerpo es anticuerpo humano. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG1 humana. Opcionalmente, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como composición farmacéutica. Opcionalmente, el anticuerpo se administra a una dosificación de 0,0001 a 100 mg/kg, preferentemente, al menos 1 mg/kg de peso corporal de anticuerpo. Opcionalmente, el anticuerpo se administra en múltiples dosificaciones durante al menos seis meses. Opcionalmente, el anticuerpo se administra como una composición de liberación sostenida. Opcionalmente, el anticuerpo se administra intraperitonealmente, por vía oral, subcutáneamente, intracranealmente, intramuscularmente, tópicamente, intranasalmente o intravenosamente. Opcionalmente, el anticuerpo es internalizado dentro de las células neuronales que tienen los cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, el anticuerpo se une a la superficie externa de células neuronales que tienen los cuerpos de Lewy, disipando así los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, el anticuerpo se une a alfa sinucleína sobre la superficie externa de células neuronales que promueven la reticulación de la alfa sinucleína, en los que la etapa de administración desagrega los cuerpos de Lewy. Opcionalmente, la etapa de administración reduce los niveles de oligómeros de alfa sinucleína humana en las sinapsis. Opcionalmente, la etapa de administración elimina alfa sinucleína humana por activación de una vía lisosómica. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a alfa-sinucleína humana desnaturalizada como se ha determinado por inmunotransferencia. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a alfa-sinucleína humana desnaturalizada con una afinidad de al menos 10^9 M^{-1}. Opcionalmente, el anticuerpo se une específicamente a sinapsis como se ha determinado por inmunocitoquímica.

La divulgación también proporciona una composición para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad

caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, que comprende un primer anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y un segundo anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 (y preferentemente residuos 120-140) de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

La divulgación también proporciona un kit para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, que comprende un primer recipiente que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y un segundo recipiente que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 (y preferentemente residuos 120-140) de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

La divulgación proporciona además métodos para efectuar la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro. Los métodos comprenden administrar a un paciente que padece o está en riesgo de la enfermedad una pauta eficaz de un agente que induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1, efectuando así la profilaxis o tratamiento de la enfermedad. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica está libre de anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-69 de alfa sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente dentro de un segmento de alfa sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN83-101, SN107-125, SN110-128, SN118-126, SN 91-99, SN124-134 y SN124-140, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

La divulgación proporciona además métodos de cribado para un agente que tiene actividad útil en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy. Los métodos comprenden poner en contacto el agente con un animal no humano transgénico dispuesto para desarrollar una característica de una enfermedad de cuerpos de Lewy con el agente; y determinar si el agente afecta el grado o tasa de desarrollo de la característica con respecto a un animal no humano transgénico de control. El agente es (i) un fragmento de alfa sinucleína que induce anticuerpos que se unen específicamente a al menos un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa sinucleína humana o (ii) un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo con residuos 70-140 de alfa sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1.

Opcionalmente, el animal no humano transgénico comprende un transgén que expresa alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, el método comprende además el cribado de una pluralidad de anticuerpos de prueba para unirse a alfa sinucleína humana desnaturalizada, y seleccionar el anticuerpo de mayor unión como agente. Opcionalmente, el método comprende además cribar una pluralidad de anticuerpos de prueba para unirse a depósitos de sinucleína en una sección de tejido por inmunocitoquímica, y seleccionar el anticuerpo de mayor unión como agente.

La divulgación proporciona además un método de humanizar un anticuerpo monoclonal seleccionado de 8A5, 6H7, 9E4, 1H7 y 11A5 que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de regiones CDR del anticuerpo monoclonal; seleccionar un anticuerpo aceptor; y producir un anticuerpo humanizado que comprende las CDR del anticuerpo monoclonal y regiones estructurales de la región variable del anticuerpo aceptor.

La divulgación proporciona además un método de producción de una forma quimérica de un anticuerpo monoclonal seleccionado de 8A5, 6H7, 9E4, 1H7 y 11A5, que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal; seleccionar la región constante de la cadena pesada y ligera; producir un anticuerpo quimérico que comprende una cadena ligera que comprende la región variable de la cadena ligera fusionada con la región constante de la cadena ligera, y una cadena pesada que comprende la región variable de la cadena pesada fusionada con la región constante de la cadena pesada.

La divulgación proporciona métodos de efectuar la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, comprendiendo el método administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad una pauta eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 110-130 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, el anticuerpo se une a un epítopo dentro de los residuos 118-126 de alfa-sinucleína humana. Opcionalmente la enfermedad es enfermedad de Parkinson. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. Opcionalmente, el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal de ratón 9E4 (número de acceso ATCC PTA-8221) para unirse a alfa-sinucleína humana. Opcionalmente, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 9E4 (número de acceso ATCC PTA-8221) o humanizado o quimérico 9E4. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG1 humana. Opcionalmente, el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como composición farmacéutica. Opcionalmente, el anticuerpo se administra a una dosificación de 0,0001 a 100 mg de

anticuerpo/kg de peso corporal. Opcionalmente, el anticuerpo se administra en múltiples dosificaciones durante al menos seis meses. Opcionalmente, el anticuerpo se administra intraperitonealmente, por vía oral, subcutáneamente, intracranealmente, intramuscularmente, tópicamente, intranasalmente o intravenosamente. Opcionalmente, el anticuerpo se administra por una vía periférica. Opcionalmente, el anticuerpo se administra a una dosis de 1-10 mg/kg.

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal 9E4 (número de acceso ATCC PTA-8221) o humanizado o quimérico 9E4.

La divulgación también proporciona un método de humanizar el anticuerpo monoclonal 9E4 (número de acceso ATCC PTA-8221) que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de regiones CDR del anticuerpo monoclonal; seleccionar un anticuerpo aceptor; y producir un anticuerpo humanizado que comprende las CDR del anticuerpo monoclonal y regiones estructurales de la región variable del anticuerpo aceptor.

La divulgación también proporciona un método de producción de una forma quimérica del anticuerpo monoclonal 9E4 (número de acceso ATCC PTA-8221), que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal; seleccionar la región constante de la cadena pesada y ligera; y producir un anticuerpo quimérico que comprende una cadena ligera que comprende la región variable de la cadena ligera fusionada con la región constante de la cadena ligera, y una cadena pesada que comprende la región variable de la cadena pesada fusionada con la región constante de la cadena pesada.

La divulgación proporciona además un anticuerpo monoclonal anti-sinucleína producido por el hibridoma JH17.9E4.3.37.1.14.2 (número de acceso ATCC PTA-8221), hibridoma JH17.1H7.4.24.34 (número de acceso ATCC PTA-8220) o hibridoma JH22.11 A5.6.29.70.54.16.14 (número de acceso ATCC PTA-8222).

La divulgación proporciona además un anticuerpo quimérico o humanizado de un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma JH17.1H7.4.24.34 (número de acceso ATCC PTA-8220) o el hibridoma JH22.11 A5.6.29.70.54.16.14 (número de acceso ATCC PTA-8222).

La divulgación proporciona además un método de humanizar un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma JH17.1H7.4.24.34 (número de acceso ATCC PTA-8220) o el hibridoma 1H22.11A5.6.29.70.54.16.14 (número de acceso ATCC PTA-8222) que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de regiones CDR del anticuerpo monoclonal; seleccionar un anticuerpo aceptor; y producir un anticuerpo humanizado que comprende las CDR del anticuerpo monoclonal y regiones estructurales de la región variable del anticuerpo aceptor.

La divulgación proporciona además un método de producción de una forma quimérica de un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma JH17.1H7.4.24.34 (número de acceso ATCC PTA-8220) o el hibridoma JH22.11A5.6.29.70.54.16.14 (número de acceso ATCC PTA-8222), que comprende: determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal; seleccionar la región constante de la cadena pesada y ligera; producir un anticuerpo quimérico que comprende una cadena ligera que comprende la región variable de la cadena ligera fusionada con la región constante de la cadena ligera, y una cadena pesada que comprende la región variable de la cadena pesada fusionada con la región constante de la cadena pesada.

La divulgación proporciona además una célula de hibridoma JH17.9E4.3.37.1.14.2 (número de acceso ATCC PTA-8221). La divulgación también proporciona una célula de hibridoma JH17.1H7.4.24.34 (número de acceso ATCC PTA-8220), o hibridoma JH22.111A5.6.29.70.54.16.14 (número de acceso ATCC PTA-8222).

La divulgación proporciona además un uso de un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 110-130 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa sinucleína por el cual el anticuerpo se administra por una vía periférica, y reduce los cuerpos de Lewy intracelulares o la agregación de alfa sinucleína por una vía lisosómica. Opcionalmente, el anticuerpo entra en una célula que contiene un cuerpo de Lewy o agregación de alfa sinucleína por endocitosis. Opcionalmente, el anticuerpo se une a membrana unida a alfa sinucleína del exterior de la célula y un complejo de anticuerpo y alfa sinucleína se endocitosan en la célula y se combinan con un lisosoma dentro de la célula. Opcionalmente, el anticuerpo y la alfa sinucleína se endocitosan por separado y se combinan con un lisosoma dentro de la célula.

La divulgación proporciona además un método de efectuar la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro, comprendiendo el método administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad una pauta eficaz de un agente que induce un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 110-130 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. Opcionalmente, el agente es un fragmento de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el fragmento no tiene más de 30 residuos contiguos totales de alfa-sinucleína. Opcionalmente, el fragmento induce un anticuerpo para un epítopo dentro de los residuos 118-126 de alfa-sinucleína. Opcionalmente,

el fragmento comprende los residuos 118-126 de alfa sinucleína. Opcionalmente, el fragmento está ligado a un vehículo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La FIG. 2 muestra secciones de cerebro inmunohistoteñidas de ratones no transgénicos (paneles A, E y I), ratones transgénicos para alfa-SN inmunizados con adyuvante solo (paneles B, F, J) y ratones transgénicos para alfa-SN inmunizados con alfa-SN que desarrollaron bajos títulos (paneles C, G y K) y altos títulos (paneles D, H y I) de anticuerpos para alfa-SN. Las secciones se sometieron a tinción con un anticuerpo anti-alfa-sinucleína para detectar niveles de sinucleína (paneles A-D), un anticuerpo anti-IgG para determinar niveles de IgG total presentes en la sección (paneles E-H) y para proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), un marcador de células de la astroglía.

Las FIGS. 3A-D muestran los efectos de anticuerpo policlonal anti-m-sin sobre la agregación de sinucleína en células GT1-7 transfectadas como se observa por microscopía óptica.

La FIG. 4 es una transferencia Western de niveles de sinucleína en el citoplasma (C) y membranas (P) de células de α-sin GT1-7 tratadas con suero preinmune y con el anticuerpo 67-10 a una concentración de (1:50) durante 48 horas antes del análisis.

La FIG. 5 muestra los resultados de estudios del efecto de la inmunización con Aβ1-42 de la deposición de amiloide en los cerebros de ratones no transgénicos, transgénicos para SIN, APP y SIN/APP. Los niveles de amiloide detectables observados en ratones APP y SIN/APP se reducen por la inmunización con Aβ1-42.

La FIG. 6 muestra los resultados de estudios del efecto de la inmunización con Aβ1-42 sobre la formación de inclusiones de sinucleína en los cerebros de ratones no transgénicos, transgénicos para SIN, APP y SIN/APP. Las inclusiones de sinucleína detectadas en ratones SIN y SIN/APP se reducen por inmunización con Aβ1-42.

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

La FIG. 8 muestra el mapeo de epítopos de anticuerpos. Anticuerpos de ratones que expresan altos títulos y anticuerpos anti-α-sinucleína humana de alta afinidad se mapearon usando una técnica de ELISA. En la mayoría de las muestras de antisuero de ratones vacunados, los epítopos reconocidos estuvieron dentro de la región del extremo C de α-sinucleína humana. En los sueros de controles tratados con CFA no se detectaron epítopos.

La FIG. 9 muestra análisis de imágenes de los niveles de inmunorreactividad de α-sinucleína humana y otros marcadores de neurodegeneración. (A) Número medio de inclusiones positivas para hα-sinucleína en la corteza temporal. La vacunación con α-sinucleína humana produjo una disminución significativa en el número de inclusiones en comparación con los controles. Este efecto fue más pronunciado en ratones del grupo II a diferencia del grupo I. (B) Área en porcentaje del neuropilo ocupado por terminaciones inmunorreactivas con sinaptofisina en la corteza frontal. En ratones transgénicos (tg) tratados con CFA solo, el número de terminaciones marcadas con sinaptofisina disminuyó el 20 %, mientras que los niveles de inmunorreactividad para sinaptofisina por sinapsis no cambió. (C) Los niveles de inmunorreactividad de CD45 (marcador de la microglía) en la corteza temporal fueron ligeramente superiores en los cerebros de ratones vacunados con α-sinucleína humana. (D) Área en porcentaje del neuropilo ocupado por terminaciones inmunorreactivas de α-sinucleína humana en la corteza temporal. En ratones tg vacunados con α-sinucleína humana hubo una disminución en la acumulación de α-sinucleína en terminaciones inmunorreactivas para sinaptofisina. * = diferencia significativa en comparación con ratones tg para α-sinucleína humana tratados con CFA solo ($p<0,05$, prueba de la *t* de Student).

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

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

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

La FIG. 13 muestra la eliminación de agregados de α-sinucleína intraneuronales en la neocorteza de ratones transgénicos que expresan en exceso α-sinucleína humana por anticuerpos monoclonales anti-α-sinucleína 8A5, 9E4 y 6H7.

La FIG. 14 muestra la agregación de α-sinucleína en la membrana y localización de α-sinucleína en lisozomas en ratones para α-sinucleína humana después de una única inyección intravenosa con 9E4-FITC.

La FIG. 15 muestra niveles reducidos de oligómeros de α-sin y se encontraron formas insolubles de α-sin en los cerebros de ratones tg inyectados intraperitonealmente con 9E4 a una dosificación de 1 mg/kg durante seis meses.

La FIG. 16 muestra que aumentaron los niveles de beclina-1, la escisión de LC3 y Atg5 y se co-localizaron con los agregados de α-sin en las neuronas de ratones tg inmunizados.

La Fig. 17 muestra cómo un anticuerpo contra un epítopo en o cerca del extremo C de α-sin circula en el SNC, reconoce agregados en neuronas afectadas y desencadena la eliminación mediante una vía lisosómica, tal como autofagia.

DEFINICIONES

El término “identidad sustancial” significa que dos secuencias de péptidos, cuando están óptimamente alineadas, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de huecos por defecto, comparten al menos el 65 por ciento de identidad de secuencias, preferentemente al menos el 80 o el 90 por ciento de identidad de secuencias, más preferentemente al menos el 95 por ciento de identidad de secuencias o más (por ejemplo, el 99 por ciento de identidad de secuencias o mayor). Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas se diferencian por sustituciones de aminoácidos conservativas.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa de secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Si se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se entran en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencias para la(s) secuencia(s) de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa diseñados.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, para el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por la búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (véase generalmente Ausubel et al., arriba). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y la similitud de secuencias es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). El software para realizar los análisis de BLAST está públicamente disponible mediante la página web del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI). Normalmente, pueden usarse parámetros de programa por defecto para realizar la comparación de secuencias, aunque también pueden usarse parámetros personalizados. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915 (1989)).

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

Los agentes terapéuticos de la invención normalmente están sustancialmente puros de contaminante no deseado. Mediante cualquier medio un agente normalmente tiene al menos aproximadamente el 50 % en peso/peso (peso/peso) de pureza, además de estar sustancialmente libre de proteínas y contaminantes interferentes. Algunas veces los agentes tienen al menos aproximadamente el 80 % en peso/peso y, más preferentemente al menos el 90 o

aproximadamente el 95 % en peso/peso de pureza. Sin embargo, usando técnicas de purificación de proteínas convencionales pueden obtenerse péptidos homogéneos de al menos el 99 % en peso/peso.

La expresión que una molécula “se une específicamente a” una diana se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la molécula en presencia de una población heterogénea de otros agentes biológicos. Así, bajo condiciones de inmunoensayo designadas, una molécula especificada se une preferencialmente a una diana particular y no se une en una cantidad significativa a otros agentes biológicos presentes en la muestra. La unión específica de un anticuerpo a una diana bajo tales condiciones requiere seleccionar el anticuerpo por su especificidad por la diana. Puede usarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan rutinariamente inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para determinar inmunorreactividad específica. Unión específica entre dos entidades significa una afinidad de al menos 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1}. Se prefieren afinidades superiores a 10^8 M^{-1} .

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

APP^{695}, APP^{751} y APP^{770} se refieren, respectivamente, a los polipéptidos de 695, 751 y 770 residuos de aminoácidos de longitud codificados por el gen APP humano. Véanse Kang et al., Nature, 325, 773 (1987); Ponte et al., Nature, 331, 525 (1988); y Kitaguchi et al., Nature, 331, 530 (1988). A los aminoácidos dentro de la proteína precursora de amiloide (APP) humana se asignan números según la secuencia de la isoforma de APP770. Términos tales como Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 y Aβ43 se refieren a un péptido Aβ que contiene los residuos de aminoácidos 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 y 1-43.

Un “antígeno” es una entidad a la que se une específicamente un anticuerpo.

El término “epítopo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio sobre un antígeno al que responden los linfocitos B y/o T. Pueden formarse epítopos de linfocitos B tanto a partir de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente son retenidos tras la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo normalmente incluye al menos 3, y más normalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Métodos de determinación de la conformación espacial de epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítopo pueden identificarse en un simple inmunoensayo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. Los linfocitos T reconocen epítopos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para células CD8 o aproximadamente 13-15 aminoácidos para células CD4. Los linfocitos T que reconocen el epítopo pueden identificarse por ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente de antígeno, como se ha determinado por la incorporación de ^{3}H-timidina por linfocitos T sensibilizados en respuesta a un epítopo (Burke et al., J. Inf. Dis., 170, 1110-19 (1994)), por destrucción dependiente de antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges et al., J. Immunol., 156, 3901-3910) o por secreción de citocinas.

El término respuesta “inmunológica” o “inmunitaria” es el desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpo) y/o celular (mediada por linfocitos T específicos de antígeno o sus productos de secreción) beneficiosa dirigida contra un péptido amiloide en un paciente receptor. Una respuesta tal puede ser una respuesta activa inducida por la administración de inmunogén o una respuesta pasiva inducida por la administración de anticuerpo o linfocitos T sensibilizados. Una respuesta inmunitaria celular se provoca por la presentación de epítopos de polipéptido en asociación con moléculas del MHC de clase I o clase II para activar linfocitos T $CD4^+$ colaboradores y/o linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ específicos de antígeno. La respuesta también puede implicar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células de la microglía, eosinófilos u

otros componentes de inmunidad innata. La presencia de una respuesta inmunológica mediada por célula puede determinarse por ensayos de proliferación (linfocitos T $CD4^+$) o ensayos de CTL (linfocitos T citotóxicos) (véase Burke, arriba; Tigges, arriba). Las contribuciones relativas de respuestas humorales y celulares al efecto protector o terapéutico de un inmunogén pueden distinguirse aislando por separado anticuerpos y linfocitos T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Un “agente inmunogénico” o “inmunogén” puede inducir una respuesta inmunológica contra sí mismo tras la administración a un mamífero, opcionalmente conjuntamente con un adyuvante.

El término “all- D” se refiere a péptidos que tienen ≥ 75 %, ≥ 80 %, ≥ 85 %, ≥ 90 %, ≥ 95 % y 100 % de aminoácidos de configuración D.

El término “polinucleótido desnudo” se refiere a un polinucleótido no complejado con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos se clonan algunas veces en un vector plasmídico.

El término “adyuvante” se refiere a un compuesto que, cuando se administra conjuntamente con un antígeno, aumenta la respuesta inmunitaria al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmunitaria al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunitaria por varios mecanismos que incluyen reclutamiento de linfocitos, estimulación de linfocitos B y/o T, y estimulación de macrófagos.

El término “paciente” incluye sujetos humanos y otros sujetos mamíferos que reciben tanto tratamiento profiláctico como terapéutico.

La competición entre anticuerpos se determina por un ensayo en el que la inmunoglobulina de prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como alfa-SN. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto (RIA) en fase sólida, enzimoinmunoensayo directo o indirecto (EIA) en fase sólida, ensayo de competición de sándwich (véase Stahli et al., Methods in Enzymology, 9:242-253 (1983)); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (véase Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614-3619 (1986)); ensayo de marcado directo en fase sólida, ensayo de sándwich de marcado directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marca directa en fase sólida usando marca de I-125 (véase Morel et al., Molec. Immunol. 25(1):7-15 (1988)); EIA directo de biotina-avidina en fase sólida (Cheung et al., Virology, 176:546-552 (1990)); y RIA de marcado directo (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol., 32:77-82 (1990)). Normalmente, un ensayo tal implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marca unida a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Normalmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Anticuerpos identificados por el ensayo de competición (anticuerpos de competición) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítopo adyacente suficientemente proximal al epítopo unido por el anticuerpo de referencia para que se produzca impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo de competencia está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común al menos el 50 % o el 75 %.

El término “síntoma” o “síntoma clínico” se refiere a una evidencia subjetiva de una enfermedad, tal como marcha alterada, como se percibe por el paciente. Un “signo” se refiere a la evidencia subjetiva de una enfermedad como se observa por un médico.

El término “en combinación”, cuando se refiere a la administración de dos o más anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana (es decir, que reconoce cada uno un epítopo diferente) o la administración de dos o más polipéptidos o inmunógenos que inducen una respuesta de anticuerpos contra alfa-sinucleína humana, incluye administración simultánea y administración en el mismo ciclo de tratamiento. La administración simultánea de agentes engloba la administración de los agentes como una proteína de fusión o conjugado (por ejemplo, físicamente unidos entre sí), una co-formulación (por ejemplo, en la que los agentes se combinan o combinan en una forma de dosificación, por ejemplo, una formulación de liberación sostenida o de liberación prolongada), administración como composiciones separadas en el plazo de algunos minutos o dos horas el uno con respecto al otro (co-administración), o la administración como composiciones separadas el mismo día. Administración en el mismo ciclo de tratamiento significa que ambos agentes se administran a un paciente para el tratamiento o la profilaxis de la misma afección. Cada agente puede administrarse una vez o múltiples veces. Por ejemplo, un agente podría administrarse primero y el segundo agente administrarse al día siguiente o la semana siguiente. Similarmente, los dos agentes podrían administrarse cada uno más de una vez, por ejemplo, en días secuenciales, días alternos, semanas alternas, o según otros programas (por ejemplo, de forma que se espera que el beneficio al paciente supere al de la administración de cualquier agente solo).

Un fragmento designado en la forma SNx-y significa un fragmento de alfa sinucleína que empieza en el aminoácido X y termina en el aminoácido Y. Un fragmento tal puede unirse a un polipéptido heterólogo pero no a

otros aminoácidos de alfa sinucleína humana de forma que el fragmento empiece antes de X o termine después de Y.

Los residuos en alfa-sinucleína o un fragmento de la misma se numeran según SEC ID Nº: 1 cuando la alfa-sinucleína o el fragmento se alinea máximamente con SEC ID Nº: 1 como se ha descrito anteriormente usando parámetros por defecto.

Las composiciones o métodos “que comprenden” uno o más elementos citados pueden incluir otros elementos no específicamente citados. Por ejemplo, una composición que comprende el péptido alfa-SN engloba tanto el péptido alfa-SN aislado como el péptido alfa-SN como componente de una secuencia de polipéptidos mayor.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. GENERAL

La divulgación proporciona métodos para prevenir o tratar varias enfermedades y afecciones caracterizadas por la presencia de depósitos del péptido alfa-SN agregados en una masa insoluble en el cerebro de un paciente, en forma de cuerpos de Lewy. Tales enfermedades se denominan conjuntamente enfermedades de cuerpos de Lewy (ECL) e incluyen enfermedad de Parkinson (EP). Tales enfermedades se caracterizan por agregados de alfa-SN que tienen una estructura de hoja plegada β y se tiñen con tioflavina-S y rojo Congo (véase Hasimoto, arriba). La divulgación proporciona métodos para prevenir o tratar tales enfermedades usando un agente que puede generar una respuesta inmunogénica a alfa-SN. La respuesta inmunogénica actúa previniendo la formación de, o eliminando, depósitos de sinucleína dentro de células en el cerebro. Aunque un entendimiento del mecanismo no es esencial para la práctica de la invención, la respuesta inmunogénica puede inducir la eliminación como resultado de anticuerpos para sinucleína que son internalizados dentro de células solas o con alfa sinucleína. Los resultados presentados en los ejemplos muestran que los anticuerpos para alfa sinucleína administrados periféricamente cruzan la barrera hematoencefálica y son internalizados, tanto solos como con alfa sinucleína, dentro de células que contienen depósitos de alfa sinucleína. Los anticuerpos internalizados pueden promover la degradación de alfa sinucleína mediante la activación de vías lisosómicas. Los anticuerpos internalizados con afinidad por alfa sinucleína en forma desnaturalizada también pueden estabilizar la molécula en forma sin agregar. Alternativamente o adicionalmente, los anticuerpos pueden interferir con la agregación de sinucleína sobre la superficie exterior de la célula. Por ejemplo, los anticuerpos para alfa-sinucleína pueden reconocer y reticular proteínas anormalmente conformadas en la superficie de células neuronales. En algunos métodos, la respuesta de eliminación puede efectuarse al menos en parte por fagocitosis mediada por receptor de Fc. La inmunización con sinucleína puede reducir la acumulación de sinucleína en la sinapsis y cuerpos de células neuronales en el cerebro. Aunque un entendimiento del mecanismo no es esencial para la práctica de la invención, este resultado puede explicarse por anticuerpos para sinucleína que son captados por células neuronales (por ejemplo, por vesículas sinápticas).

Opcionalmente, pueden usarse agentes que generan una respuesta inmunogénica contra alfa-SN en combinación con agentes que generan una respuesta inmunogénica a Aβ. La respuesta inmunogénica es útil en eliminar depósitos de Aβ en individuos que tienen tales depósitos (por ejemplo, individuos que tienen tanto enfermedad de Alzheimer como de Parkinson); sin embargo, la respuesta inmunogénica también tiene actividad en eliminar depósitos de sinucleína. Así, tales agentes pueden usarse solos, o en combinación con agentes que generan una respuesta inmunogénica a alfa-SN en individuos con ECL, pero que no padecen o están en riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

La divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas y métodos para prevenir y tratar enfermedad amiloidogénica. Se ha mostrado que la alfa- y beta sinucleína participan en la nucleación de depósitos de amiloide en ciertas enfermedades de amiloide, particularmente enfermedad de Alzheimer (Clayton, D.F., et al., TINS 21(6): 249-255, 1998). Más específicamente, un fragmento del dominio de NAC de alfa- y beta-sinucleína (residuos 61-95) ha sido aislado de placas de amiloide en pacientes con Alzheimer; de hecho, este fragmento comprende aproximadamente el 10 % de la placa que sigue insoluble después de la solubilización con dodecilsulfato de sodio (SDS) (George, J.M., et al. Neurosci. News 1: 12-17, 1995). Además, se ha informado que tanto alfa-SN de longitud completa como el fragmento de NAC de la misma aceleran la agregación del péptido β-amiloide en amiloide insoluble *in vitro* (Clayton, arriba). El componente de NAC de placas de amiloide sirve de diana para tratamientos inmunológicamente basados de la presente divulgación, como se detalla a continuación. Según un aspecto, la divulgación incluye composiciones farmacéuticas que comprenden agentes eficaces para provocar una respuesta inmunitaria contra un componente de sinucleína-NAC de una placa de amiloide en un paciente. Tales composiciones pueden ser eficaces en prevenir, retardar o reducir la deposición de placas en enfermedad amiloide.

II. AGENTES QUE GENERAN UNA RESPUESTA INMUNOGÉNICA CONTRA ALFA SINUCLEÍNA

Una respuesta inmunogénica puede ser activa, como cuando un inmunogén se administra para inducir anticuerpos reactivos con alfa-SN en un paciente, o pasiva, como cuando se administra un anticuerpo que por sí mismo se une a alfa-SN en un paciente.

1. Agentes que inducen respuesta inmunitaria activa

Los agentes terapéuticos inducen una respuesta inmunogénica específicamente dirigida a ciertos epítopos dentro del péptido alfa-SN. Agentes preferidos son el propio péptido alfa-SN y fragmentos del mismo. La publicación de patente de Estados Unidos US20060259986A1 y la publicación de patente PCT WO 05/013889 divulgan novedosos fragmentos de alfa-sinucleína útiles en métodos de prevención y tratamiento de enfermedad sinucleinopática y amiloidogénica. Opcionalmente, estos fragmentos pueden usarse en combinación con un adyuvante.

La alfa sinucleína se identificó originalmente en cerebros humanos como la proteína precursora del componente no β-amiloide de (NAC) de placas de EA. (Uéda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (23):11282-11286 (1993). La alfa-SN, también llamada el precursor del componente no de Aβ de amiloide de EA (NACP), es un péptido de 140 aminoácidos. La alfa-SN tiene la secuencia de aminoácidos:

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVV
HGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNE
EGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA (SEQ ID NO:1)

(Uéda et al., arriba; número de acceso de GenBank: P37840).

El componente no de Aβ de amiloide de EA (NAC) se deriva de alfa-SN. El NAC, un dominio altamente hidrófobo dentro de alfa sinucleína, es un péptido que consiste en al menos 28 residuos de aminoácidos (residuos 60-87) (SEC ID Nº: 3) y opcionalmente 35 residuos de aminoácidos (residuos 61-95) (SEC ID Nº: 2). Véase la Fig. 1. NAC muestra una tendencia a formar una estructura de hoja beta (Iwai, et al., Biochemistry, 34:10139-10145). Jensen et al. han informado de que NAC tiene la secuencia de aminoácidos:

EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV (SEC ID Nº: 2)
(Jensen et al., Biochem. J. 310 (Pt 1): 91-94 (1995); número de acceso de GenBank S56746).

Uéda *et al.* han informado que NAC tiene la secuencia de ácidos:

KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (SEC ID Nº: 3)
(Uéda et al., PNAS USA 90:11282-11286 (1993).

Alfa-SN desagregada o fragmentos de la misma, que incluyen NAC, significa unidades de péptidos monoméricos. La alfa-SN desagregada o fragmentos de la misma son generalmente solubles, y pueden auto-agregarse para formar oligómeros solubles. Los oligómeros de alfa-SN y fragmentos de la misma son normalmente solubles y existen predominantemente como hélices alfa. La alfa-SN monomérica puede prepararse *in vitro* disolviendo péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La disolución resultante se centrifuga para eliminar cualquier partícula insoluble. La alfa-SN desagregada o fragmentos de la misma, que incluyen NAC, significa oligómeros de alfa-SN o fragmentos de la misma que se han asociado en ensamblajes de hoja beta insolubles. Alfa-SN agregada o fragmentos de la misma, que incluyen NAC, significa también polímeros fibrilares. Las fibrillas son normalmente insolubles. Algunos anticuerpos se unen tanto a alfa-SN soluble como a fragmentos de la misma o alfa-SN agregada o fragmentos de la misma. Algunos anticuerpos se unen a oligómeros de alfa-sinucleína más fuertemente que a formas monoméricas o formas fibrilares. Algunos anticuerpos se unen tanto a alfa-SN soluble como agregada o fragmentos de la misma, y opcionalmente a formas oligoméricas también.

La alfa-SN, el principal componente de los cuerpos de Lewy característicos de EP, y fragmentos epitópicos de la misma, tales como, por ejemplo, NAC, o fragmentos distintos de NAC, tales como fragmentos en o cerca del extremo N o en o cerca del extremo C, puede usarse para inducir una respuesta inmunogénica. Preferentemente, tales fragmentos comprenden cuatro o más aminoácidos de alfa-SN o análogo de la misma.

También pueden usarse otros componentes de los cuerpos de Lewy, por ejemplo, sinfilina-1, parkina, ubiquitina, neurofilamento, beta-cristalina y fragmentos epitópicos de los mismos, para inducir una respuesta inmunogénica.

Como se ha observado, ciertos fragmentos de alfa-sinucleína preferidos son de la región del extremo C de la molécula. Tales fragmentos carecen de los residuos 1-69 de alfa-sinucleína humana. La inmunización con tales fragmentos genera una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos para uno o más epítopos dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. Algunos fragmentos activos incluyen un epítopo en o cerca del extremo C de alfa-SN (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 70-140, 100-140, 120-140, 130-140 ó 135-140). Algunos fragmentos activos incluyen un epítopo en o cerca de la región reconocida por el anticuerpo monoclonal 8A5.
Algunos fragmentos activos incluyen un epítopo en o cerca de la región reconocida por el anticuerpo monoclonal 9E4 (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 90-140, 98-140, 108-136, 110-130 ó 118-126). Algunos

fragmentos activos incluyen un epítopo en o cerca de la región reconocida por el anticuerpo monoclonal 1H7 (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 70-119, 80-109, 88-101 ó 91-99). En algunos fragmentos activos, el residuo del extremo C del epítopo es el residuo del extremo C de alfa-SN.

Algunos fragmentos de alfa sinucleína generan anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de uno o más de: SN83-101, SN107-125, SN110-128, SN124-140, SN110-130, SN85-105, SN118-126 y SN91-99 de alfa sinucleína humana. Algunos fragmentos generan anticuerpos que se unen exclusivamente específicamente dentro de uno de los fragmentos anteriores. Por ejemplo, el fragmento SN83-101 empieza en el residuo 83 y termina en los residuos 101 de alfa-sinucleína y genera solo anticuerpos que se unen específicamente a SN83-101. Los fragmentos de la región del extremo C inmunogénicos incluyen SN85-99, SN109-123, SN112-126 y SN126-138 (como se muestra en la Fig. 8), SN110-130, SN85-105 y otros fragmentos que se diferencian de uno de estos por hasta dos aminoácidos adicionales o menos en cualquier extremo. Otro fragmento preferido SN83-140, que incluye todos estos epítopos.

Algunos fragmentos no tienen más de 40, o no más de 30, residuos contiguos en total de alfa sinucleína. Algunos de tales fragmentos comprenden SN125-140, SN130-140, SN87-97, SN111-121, SN114-124 o SN128-136. Algunos fragmentos tienen un total de 5-20, 5-25 ó 5-30 aminoácidos contiguos de la mitad del extremo C de alfa sinucleína (es decir, residuos 70-140). Algunos fragmentos tienen 5-20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 120-140 de alfa sinucleína. Fragmentos particularmente preferidos incluyen SN124-140, SN125-140, SN126-140, SN127-140, SN128-140, SN129-140, SN130-140, SN131-140, SN132-140, SN133-140, SN134-140, SN135-140, SN136-140, SN137-140, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN129-139, SN130-139, SN131-139, SN132-139, SN133-139, SN134-139, SN135-139, SN136-139, SN137-139, SN124-138, SN124-138, SN125-138, SN126-138, SN127-138, SN128-138, SN129-138, SN130-138, SN131-138, SN132-138, SN133-138, SN134-138, SN135-138, SN136-138, SN124-137, SN125-137, SN126-137, SN127-137, SN128-137, SN129-137, SN130-137, SN131-137, SN132-137, SN133-137, SN134-137, SN135-137, SN124-136, SN125-136, SN126-136, SN127-136, SN128-136, SN129-136, SN130-136, SN131-136, SN132-136, SN133-136 y SN134-136.

Algunos fragmentos tienen 5-20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 118-126, 108-136 y 98-140 de alfa sinucleína. Algunos fragmentos tienen 5-20 aminoácidos contiguos entre las posiciones 70-99, 91-131, 136 ó 91-99 de alfa sinucleína.

Como se muestra en los Ejemplos IX y X, la administración de 6H7, un anticuerpo que reconoce el extremo amino de alfa-sinucleína, o de 8A5, un anticuerpo que reconoce el extremo carboxi de alfa-sinucleína, o 9E4, un anticuerpo que reconoce un epítopo en la región del extremo C de sinucleína, redujo la agregación de alfa-sinucleína en el cerebro de ratones transgénicos que expresan en exceso alfa-sinucleína humana. Se espera que la inmunización con fragmentos de alfa-sinucleína que comprenden secuencias en o cerca de las regiones terminales de alfa-sinucleína produzca similarmente tal eliminación de agregados y/o prevenga la formación de agregados.

Otros fragmentos de alfa-sinucleína útiles para efectuar la profilaxis o tratar una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro (por ejemplo, enfermedad de Parkinson) son de la región del extremo N de la molécula. La inmunización con los fragmentos genera una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos para uno o más epítopos dentro de los residuos 1-20 o, en algunos casos, uno o más epítopos dentro de los residuos 1-10. Como se muestra en el Ejemplo IX, la administración de 6H7, un anticuerpo que reconoce el extremo amino de la alfa-sinucleína, redujo la agregación de alfa-sinucleína en el cerebro de ratones transgénicos que expresan en exceso alfa-sinucleína humana. Se espera que la inmunización con fragmentos de alfa-sinucleína que comprenden la región del extremo amino de alfa-sinucleína produzca similarmente tal eliminación de agregados y/o prevenga la formación de agregados.

Así, en un aspecto, la divulgación proporciona un método de efectuar la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro administrando a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad un polipéptido que comprende un fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-40, residuos 1-20, o residuos 1-10 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº: 1. En una realización, el fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína está libre de los residuos 70-140 de alfa sinucleína. En una realización, el fragmento inmunogénico está libre de los residuos 41-140 de alfa-sinucleína. En una realización, el fragmento inmunogénico está libre de los residuos 25-140 de alfa-sinucleína.

Inmunógenos adecuados para efectuar la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro incluyen, pero no se limitan a, fragmentos que comprenden de 5 a 20 residuos de aminoácidos contiguos del extremo amino de alfa sinucleína. En una realización preferida, el fragmento comprende el primer residuo (del extremo amino) de alfa sinucleína. Así, fragmentos a modo de ejemplo incluyen la secuencia de residuos 1 a N_a de SEC ID Nº: 1, en la que N_a es 5 a 20 (por ejemplo, MDVFMKGLSKAKE GVVAAAE; MDVFMKG LSKAKEGWAAA; MDVFMKGLSKAKEGVVAA;

MDVFMKGLSKAKEGVVA; MDVFMKGLSKAKEGVV; MDVFMKGLSKAKEGV; MDVFMKGLSKAKEG; MDVFMKGLSKAK; MDVFMKGLSKA; MDVFMKGLSK; MDVFMKGLS; MDVFMKGL; MDVFMKG; MDVFMK; y MDVFM. En otras realizaciones preferidas, el fragmento no comprende el residuo del extremo amino de alfa sinucleína, pero comprende el segundo y/o tercer residuo de alfa sinucleína. Así, fragmentos a modo de ejemplo tienen la secuencia de residuos 2 a N_b, y 3 a N_c de SEC ID Nº: 1, en la que N_b es 6 a 21 y N_c es 7 a 22 (por ejemplo, DVFMKGLSKAKEGWAAAEK; DVFMKGLSKAKEGVVAAAE; DVFMKGLSKAKEGWAAA; DVFMKGLSKAKEGVVAA; DVFMKGLSKAKEGVVA; DVFMKGLSKAKEGW; DVFMKGLSKAKEGV; DVFMKGLSKAKEG; DVFMKGLSKAK; DVFMKGLSKA; DVFMKGLSK; DVFMKGLS; DVFMKGL; DVFMKG; DVFMK, VFMKGLSKAKEGVVAAAEKT; VFMKGLSKAKEGVVAAAEK; VFMKGLSKAKEGVVAAAE; VFMKGL SKAKEGVVAAA; VFMKGLSKAKEGVVAA; VFMKGLSKAKEGWA; VFMKGLSKAKEGW; VFMKGLSKAKEGV; VFMKGLSKAKEG; VFMKGLSKAK; VFMKGLSKA; VFMKGLSK; VFMKGLS; VFMKGL; y VFMKG). Como se trata más adelante, los fragmentos anteriormente mencionados pueden ligarse a una molécula de vehículo (por ejemplo, un conjugado o proteína de fusión, véase la Sec. II(3)). Alternativamente, como se trata más adelante, un fragmento anteriormente mencionado puede administrarse vacunando el sujeto con un ácido nucleico que codifica el fragmento (véase la Sec. II(4)).

Otros fragmentos de alfa-sinucleína útiles para efectuar la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro (por ejemplo, enfermedad de Parkinson) son de la región cerca de la serina 129 de alfa-SN. La inmunización con fragmentos que incluyen este residuo, en su forma fosforilada (por ejemplo, SN124-134 con Ser129 fosforilada genera una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos para uno o más epítopos que incluyen Ser129 fosforilada. Algunos fragmentos activos inducen anticuerpos que reconocen un epítopo en o cerca de la región reconocida por el anticuerpo monoclonal 11A5.

Para facilitar la referencia, fragmentos y epítopos de alfa-SN pueden denominarse basándose en su posición en la molécula, por ejemplo y sin limitación, fragmentos que contienen el aminoácido del extremo N de alfa-SN, fragmentos que contienen el aminoácido del extremo C, fragmentos de NAC como se han descrito anteriormente, fragmentos que no contienen ni el aminoácido del extremo N ni el aminoácido del extremo C, fragmentos de la mitad del extremo C de alfa-SN, fragmentos de la mitad del extremo N de alfa-SN, fragmentos dentro de los 40 residuos del extremo N de alfa-SN. En ciertas realizaciones, los fragmentos pueden contener de 5 a 100 residuos contiguos de alfa-SN, por ejemplo, en el intervalo limitado por un límite inferior de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30 ó 40 residuos contiguos y un límite superior de 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 ó 100 residuos contiguos, en el que el límite superior es superior al límite inferior. Preferentemente, el fragmento contiene al menos 5, al menos 8, al menos 10, o al menos 15 o al menos 20 residuos contiguos de alfa-SN.

Referencia a alfa-SN incluye las secuencias de aminoácidos humanas naturales indicadas anteriormente, además de análogos que incluyen variantes alélicas, de especies e inducidas, formas de longitud completa y fragmentos inmunogénicos de la misma. La alfa sinucleína humana, que significa una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos que SEC ID Nº: 1 o variantes alélicas de la misma, se prefiere en todas las realizaciones. Los análogos normalmente se diferencian de péptidos que se producen naturalmente en una, dos o algunas posiciones, frecuentemente en virtud de sustituciones conservativas. Los análogos normalmente presentan al menos el 80 o el 90 % de identidad de secuencias con péptidos naturales. A las posiciones de aminoácidos en análogos de alfa sinucleína natural se asignan los números de aminoácidos correspondientes en alfa sinucleína natural cuando el análogo y la alfa sinucleína natural se alinean máximamente. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos del extremo N o C en una, dos o algunas posiciones. Por ejemplo, el residuo de ácido glutámico natural en la posición 139 de alfa-SN puede sustituirse con ácido iso-aspártico. Ejemplos de aminoácidos no naturales son aminoácidos D,alfa,alfa-disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetil-lisina, épsilon-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, omega-N-metilarginina, beta-alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma-aminobutírico, homoserina, citrulina y ácido isoaspártico. Los agentes terapéuticos también incluyen análogos de fragmentos de alfa-SN. Algunos agentes terapéuticos de la divulgación son péptidos all-D, por ejemplo, alfa-SN all-D o NAC all-D, y de análogos de péptido all-D. Los análogos se unen específicamente a una población policlonal de anticuerpos para alfa sinucleína humana natural. Pueden cribarse fragmentos y análogos para eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales transgénicos en comparación con controles sin tratar o de placebo como se describe a continuación.

Alfa-SN, sus fragmentos y análogos pueden sintetizarse por síntesis de péptidos en fase sólida o expresión recombinante, o pueden obtenerse de fuentes naturales. Están comercialmente disponibles sintetizadores de péptidos automáticos de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, Foster City, California. La expresión recombinante puede ser en bacterias, tales como *E. coli*, levadura, células de insecto o células de mamífero. Procedimientos para la expresión recombinante se describen por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989). Algunas formas del péptido alfa-SN también están disponibles comercialmente, por ejemplo, en BACHEM y American Peptide Company, Inc.

Los agentes terapéuticos también incluyen polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un fragmento activo del péptido alfa-SN, junto con otros aminoácidos. Por ejemplo, agentes preferidos incluyen proteínas de fusión

que comprenden un segmento de alfa-SN fusionado con una secuencia de aminoácidos heteróloga que induce una respuesta de linfocitos T colaboradores contra la secuencia de aminoácidos heteróloga y así una respuesta de linfocitos B contra el segmento de alfa-SN. Tales polipéptidos pueden cribarse para eficacia profiláctica o terapéutica en modelos animales en comparación con controles sin tratar o de placebo como se describe más adelante. El péptido alfa-SN, análogo, fragmento activo u otro polipéptido puede administrarse en forma asociada o multimérica o en forma disociada. Los agentes terapéuticos también incluyen multímeros de agentes inmunogénicos monoméricos. Los agentes terapéuticos de la divulgación pueden incluir secuencias de polilisina.

En otra variación, un péptido inmunogénico, tal como un fragmento de alfa-SN, puede ser presentado por un virus o bacterias como parte de una composición inmunogénica. Un ácido nucleico que codifica el péptido inmunogénico se incorpora en un genoma o episoma del virus o bacterias. Opcionalmente, el ácido nucleico se incorpora de un modo tal que el péptido inmunogénico se exprese como una proteína secretada o como una proteína de fusión con una proteína de la superficie externa de un virus o una proteína transmembranaria de bacterias de manera que el péptido se exprese. Los virus o bacterias usados en tales métodos deben ser no patógenos o atenuados. Virus adecuados incluyen adenovirus, VHS, virus de la encefalitis equina venezolana y otros alfa virus, virus de la estomatitis vesicular, y otros rabdovirus, variolovacuna y viruela aviar. Bacterias adecuadas incluyen Salmonella y Shigella. La fusión de un péptido inmunogénico a HBsAg del VHB es particularmente adecuada.

Los agentes terapéuticos también incluyen péptidos y otros compuestos que necesariamente no tienen una similitud de secuencias de aminoácidos significativa con alfa-SN, pero sin embargo sirven de miméticos de alfa-SN e inducen una respuesta inmunitaria similar. Por ejemplo, cualquier péptido y proteína que forme hoja plegada beta puede cribarse para idoneidad. También pueden usarse anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos monoclonales para alfa-SN o otros componentes de cuerpos de Lewy. Tales anticuerpos anti-Id imitan el antígeno y generan una respuesta inmunitaria a él (véase Essential Immunology, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., p. 181). Los agentes distintos de alfa-SN deben inducir una respuesta inmunogénica contra uno o más de los segmentos preferidos de alfa-SN enumerados anteriormente (por ejemplo, NAC). Preferentemente, tales agentes inducen una respuesta inmunogénica que se dirige específicamente a uno de estos segmentos sin ser dirigida a otros segmentos de alfa-SN.

También pueden cribarse bibliotecas al azar de péptidos u otros compuestos para idoneidad. Pueden producirse bibliotecas combinatorias para muchos tipos de compuestos que pueden sintetizarse en un modo etapa a etapa. Tales compuestos incluyen polipéptidos, miméticos de giro beta, polisacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteroides, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas N-sustituidas oligoméricas y oligocarbamatos. Pueden construirse bibliotecas combinatorias mayores de los compuestos por el método de bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) descrito en Affymax, documento WO 95/12608, Affymax, documento WO 93/06121, Universidad de Columbia, documento WO 94/08051, Farmacopea, documento WO 95/35503 y Scripps, documento WO 95/30642. También pueden generarse bibliotecas de péptidos por métodos de expresión en fago. Véase, por ejemplo, Devlin, documento WO 91/18980.

Las bibliotecas combinatorias y otros compuestos se criban inicialmente para idoneidad determinando su capacidad para unirse a anticuerpos o linfocitos (B o T) conocidos por ser específicos para alfa-SN u otros componentes de cuerpos de Lewy. Por ejemplo, pueden realizarse cribados iniciales con cualquier suero policlonal o anticuerpo monoclonal para alfa-SN o un fragmento de la misma. Las bibliotecas se criban preferentemente para la capacidad para unirse a anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 ó 70-140 de alfa sinucleína humana. Los compuestos pueden entonces cribarse para la unión específica a un epítopo específico dentro de alfa-SN (por ejemplo, SN1-20, SN83-101, SN107-125, SN110-128, SN124-140, SN118-126 y SN91-99 de alfa sinucleína). Los compuestos pueden probarse por los mismos procedimientos descritos para mapear especificidades de epítopos de anticuerpo. Entonces, los compuestos identificados por tales cribados se analizan adicionalmente para la capacidad para inducir anticuerpos o linfocitos reactivos para alfa-SN o fragmentos de la misma. Por ejemplo, pueden probarse múltiples diluciones de sueros sobre placas de microtitulación que se han recubierto previamente con alfa-SN o un fragmento de la misma y puede realizarse un ELISA estándar para probar anticuerpos reactivos para alfa-SN o el fragmento. Entonces, los compuestos pueden probarse para eficacia profiláctica y terapéutica en animales transgénicos predispuestos a una enfermedad asociada a la presencia de cuerpo de Lewy, como se describe en los ejemplos. Tales animales incluyen, por ejemplo, ratones transgénicos que expresan en exceso alfa-SN o mutante de la misma (por ejemplo, sustitución de alanina a treonina en la posición 53) como se describe, por ejemplo, en el documento WO 98/59050, Masliah, et al., Science 287: 1265-1269 (2000), y van der Putter, et al., J. Neuroscience 20: 6025-6029 (2000), o tales ratones transgénicos que también expresan en exceso APP o un mutante de la misma. Particularmente se prefieren tales ratones transgénicos para sinucleína que llevan una mutación 717 de APP descrita por Games et al., Nature 373, 523 (1995) y ratones que llevan una mutación sueca 670/671 de APP tal como se describe por McConlogue et al., documento US 5.612.486 y Hsiao et al., Science 274, 99 (1996); Staufenbiel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13287-13292 (1997); Borchelt el al., Neuron 19, 939-945 (1997)). Ejemplos de tales animales transgénicos para sinucleína/APP se proporcionan en el documento WO 01/60794. Modelos animales adicionales de EP incluyen modelos animales de 6-hidroxidopamina, rotenona y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-

tetrahidropiridina (MPTP) (M. Flint Beal, Nature Reviews Neuroscience 2:325-334 (2001)). Puede usarse el mismo enfoque de cribado en otros posibles análogos de alfa-SN y péptidos más largos que incluyen fragmentos de alfa-SN, descritos anteriormente, y otros componentes de cuerpos de Lewy y análogo o fragmentos de los mismos.

Como se describe en el presente documento, la administración de anticuerpos que reconocen epítopos en las regiones del extremo amino y extremo carboxi de alfa-sinucleína (es decir, 8A5 y 6H7) redujeron los agregados de alfa-sinucleína en los cerebros de ratones transgénicos que expresan en exceso alfa-sinucleína humana (véase, por ejemplo, el Ejemplo IX). Basándose en parte en este descubrimiento, se contempla que inducir una respuesta inmunitaria contra epítopos en ambos extremos de alfa-sinucleína tendrá ventajas en la profilaxis y terapia. Así, en un aspecto, la divulgación proporciona un método para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro induciendo una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20, o alternativamente residuos 1-10, de alfa-sinucleína humana y un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. En una realización preferida, la respuesta inmunogénica comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Una respuesta inmunitaria que comprende anticuerpos contra epítopos en ambas regiones terminales de la proteína puede denominarse una respuesta inmunitaria “dual”. Una respuesta inmunitaria dual puede inducirse de varias formas y la presente divulgación no se limita a ningún método particular de iniciar una respuesta tal.

Una respuesta inmunitaria dual puede inducirse por vacunación con un único polipéptido que es eficaz para inducir una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. En realizaciones preferidas, los anticuerpos se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 y/o dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Puede usarse un polipéptido que carece de al menos los residuos 25-69 de alfa-sinucleína humana, al menos los residuos 30-110 de alfa-sinucleína humana, o al menos los residuos 21-119 de alfa-sinucleína humana. Cuando se usan tales polipéptidos, la respuesta inmunogénica no incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 25-69 de alfa-sinucleína humana.

También puede inducirse una respuesta inmunitaria dual por vacunación en combinación de dos (o más) polipéptidos en los que un polipéptido induce una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. En realizaciones preferidas, los anticuerpos se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 y/o dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Así, puede efectuarse tratamiento o profilaxis administrando un primer fragmento inmunogénico de alfa-sinucleína que induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y un segundo fragmento inmunogénico que induce una respuesta inmunogénica que comprende anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 (o 120-140) de alfa-sinucleína humana. Los fragmentos de alfa-sinucleína humana pueden administrarse en combinación, como se trata anteriormente (por ejemplo, administrando como una proteína de fusión o conjugado, en una co-formulación, o en el mismo ciclo de terapia).

La divulgación proporciona composiciones útiles para iniciar una respuesta inmunitaria contra epítopos en cualquiera o ambos extremos de alfa-sinucleína. Las composiciones incluyen formas de dosificación y formulaciones que contienen dos o más polipéptidos, tal como se ha descrito anteriormente, en las que un polipéptido induce una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. En realizaciones preferidas, los polipéptidos inducen anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-10 y/o dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Se conocen en la técnica formulaciones a modo de ejemplo (adecuadas para co-formular polipéptidos) e incluyen aquellas descritas más adelante en la Sección VII (“Pautas de tratamiento”).

La divulgación también proporciona kits para iniciar una respuesta inmunitaria contra epítopos en ambos extremos de alfa-sinucleína. Los kits incluyen dos o más agentes que inducen una respuesta inmunogénica que incluye anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana y anticuerpos que se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. Los agentes pueden combinarse en una única preparación para uso simultáneo. Los agentes pueden ocupar recipientes separados (por ejemplo, viales, jeringas, tubos o similares) que contiene cada uno un polipéptido diferente para uso simultáneo, secuencial o separado. Estos agentes pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de enfermedad de cuerpos de Lewy. Los kits también pueden incluir agentes que aumentan el paso de los agentes de la divulgación a través de la barrera hematoencefálica, otros adyuvantes y materiales para administración al paciente.

2. Agentes para respuesta inmunitaria pasiva

Los agentes terapéuticos de la divulgación también incluyen anticuerpos que se unen específicamente a alfa-SN o otros componentes de los cuerpos de Lewy. La presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a un componente de sinucleína-NAC de una placa de amiloide. Se conocen anticuerpos inmunorreactivos para alfa-SN (véase, por ejemplo, Arima, et al., Brian Res. 808: 93-100 (1998); Crowther et al., Neuroscience Lett. 292: 128-130 (2000); Spillantini, et al. Nature 388: 839-840 (1997). Tales anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Algunos de tales anticuerpos se unen específicamente a agregados insolubles de alfa-SN sin que se unan específicamente a la forma monomérica soluble. Algunos se unen específicamente a la forma monomérica soluble sin unirse a la forma agregada insoluble. Algunos se unen específicamente a tanto formas agregadas como monoméricas solubles. Algunos de tales anticuerpos se unen específicamente a una forma corta que se produce naturalmente de alfa-SN (por ejemplo, NAC) sin unirse a una alfa-SN de longitud completa que se produce naturalmente. Algunos anticuerpos se unen específicamente a una forma larga sin unirse a una forma corta. Algunos anticuerpos se unen específicamente a alfa-SN sin unirse a otros componentes de CL. Algunos anticuerpos se unen específicamente a alfa-SN sin unirse específicamente a otros componentes de placas de amiloide. Véase la publicación de patente de EE.UU. US20060259986A1 y la publicación de patente PCT WO 05/013889, proporciona anticuerpos específicos para fin que se unen específicamente a fragmentos de alfa-sinucleína sin unirse específicamente a alfa-sinucleína intacta por sí misma. Estos anticuerpos son útiles en métodos de prevención y tratamiento de enfermedad sinucleinopática y amiloidogénica.

En los experimentos llevados a cabo en soporte de la invención, se usó un ensayo *ex vivo* predictivo (Ejemplo VII) para probar la eliminación de un anticuerpo que se une específicamente a una sinucleína-NAC. Un anticuerpo para NAC se puso en contacto con una muestra de tejido cerebral que contiene placas de amiloide y células de la microglía. Se usó suero de conejo como control. La posterior monitorización mostró una marcada reducción en el número y tamaño de placas indicativo de eliminación de actividad del anticuerpo.

A partir de estos datos, es evidente que la carga de placas de amiloide asociada a enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades de amiloide puede ser enormemente reducida por la administración de reactivos inmunitarios dirigidos contra epítopos de NAC, que son eficaces para reducir la carga de placas de amiloide. Se entiende adicionalmente que puede usarse una amplia variedad de anticuerpos en tales composiciones. Como se trata anteriormente, la publicación de patente de EE.UU. US20060259986A1 y la publicación de patente PCT WO 05/013889 proporcionan anticuerpos específicos para fin que se unen específicamente a fragmentos de alfa-sinucleína sin que se unan específicamente a alfa-sinucleína intacta por sí misma.

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

Los sueros policlonales normalmente contienen poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen a varios epítopos a lo largo de la longitud de alfa-SN. Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos para un segmento de alfa-SN particular, tal como NAC. Los sueros policlonales que son específicos para un segmento particular contienen anticuerpos que se unen específicamente a ese segmento y carecen de anticuerpos que se unen específicamente a otros segmentos de alfa-SN. Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítopo específico dentro de alfa-SN que puede ser un epítopo conformacional o no conformacional. Epítopos no conformacionales siguen presentes cuando la alfa-SN se desnaturaliza con SDS. La eficacia profiláctica y terapéutica de los anticuerpos puede probarse usando los procedimientos de modelo animal transgénicos descritos en los ejemplos, algunos anticuerpos monoclonales se unen a un epítopo dentro de NAC. En algunos métodos se usan múltiples anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por diferentes epítopos. Tales anticuerpos pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente. También pueden usarse anticuerpos para componentes de cuerpos de Lewy distintos de alfa-SN. Por ejemplo, los anticuerpos pueden dirigirse a neurofilamento, ubiquitina o sinfilina. Los agentes terapéuticos también incluyen anticuerpos producidos contra análogos de alfa-SN y fragmentos de la misma. Algunos agentes terapéuticos de la divulgación son péptidos all-D, por ejemplo, alfa-SN all-D o NAC all-D.

Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítopo dentro de residuos especificados, tales como alfa-SN1-5, por ejemplo, lo que se indica es que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los residuos especificados (es decir, alfa-SN1-5 en este ejemplo). Un anticuerpo tal no se pone necesariamente en contacto con cada residuo dentro de alfa-SN1-5. Ni cada sustitución de un único aminoácido o deleción en alfa-SN1-5 afecta necesariamente significativamente la afinidad de unión. La especificidad por epítopo de un anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, formando una biblioteca de expresión en fago en la que diferentes miembros muestran diferentes subsecuencias de alfa-SN. La biblioteca de expresión en fago se selecciona entonces para miembros que se unen específicamente a un anticuerpo en ensayo. Se aísla una familia de secuencias. Normalmente, una familia

tal contiene una secuencia central común, y longitudes variables de secuencias flanqueantes en diferentes miembros. La secuencia central más corta que muestra unión específica al anticuerpo define el epítopo unido por el anticuerpo. Los anticuerpos también pueden probarse para especificidad por epítopo en un ensayo de competición con un anticuerpo cuya especificidad por epítopo ya se ha determinado.

Algunos anticuerpos de la divulgación se unen específicamente a un epítopo dentro de NAC. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítopo dentro de una forma glucosilada de 22 kilodalton de sinucleína, por ejemplo, P22-sinucleína (H. Shimura et al., Science 2001 Jul 13:293(5528):224-5).

Algunos anticuerpos de la divulgación se unen a un epítopo en el extremo N de alfa-SN (por ejemplo, un epítopo dentro de los aminoácidos 1-20 o los aminoácidos 1-10 de alfa-sinucleína como se numera según SEC ID Nº: 1). Algunos anticuerpos se unen a un epítopo en el que el residuo del extremo N del epítopo es el residuo del extremo N de alfa-SN de longitud completa. Tales anticuerpos no se unen a mutantes de deleción de alfa sinucleína en los que falta el residuo 1. Algunos de tales anticuerpos no se unen a alfa sinucleína de longitud completa en la que el aminoácido del extremo N se une a un polipéptido heterólogo. Algunos anticuerpos de la divulgación se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-69 o residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítopo con un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado de los residuos 1 a N_a de SEC ID Nº: 1, en la que N_a es 5 a 20; residuos 2 a N_b de SEC ID Nº: 1, en la que N_b es 6 a 21; o residuos 3-N_c de SEC ID Nº: 1 en la que N_c es 7 a 22. Algunos anticuerpos se unen a un epítopo dentro de un segmento de alfa sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN1-5, SN1-6, SN1-7, SN1-8, SN1-9, SN1-10, SN1-11, SN1-12, SN1-13, SN1-14 SN1-15, SN1-16, SN1-17, SN1-18, SN1-19 y SN1-20.

Algunos anticuerpos se unen a un epítopo en o cerca del extremo C de alfa-SN (por ejemplo, dentro de los aminoácidos 70-140, 100-140, 120-140, 130-140 ó 135-140). Algunos anticuerpos se unen a un epítopo en el que el residuo del extremo C del epítopo es el residuo del extremo C de alfa-SN (de longitud completa). Tales anticuerpos no se unen a mutantes de deleción de alfa sinucleína en los que falta el residuo 140. Algunos de tales anticuerpos no se unen a alfa sinucleína de longitud completa en la que el aminoácido del extremo C se une a un polipéptido heterólogo. En algunos métodos, el anticuerpo se une específicamente a NAC sin unirse a alfa-SN de longitud completa.

Algunos anticuerpos de la divulgación se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 ó 83-140 de alfa sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítopo dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítopo con un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado de 83-101, 107-125, 110-128 y 124-140. Algunos anticuerpos se unen a un epítopo dentro de un segmento de alfa sinucleína humana seleccionado del grupo que consiste en SN124-140, SN125-140, SN126-140, SN127-140, SN128-140, SN129-140, SN130-140, SN131-140, SN132-140, SN133-140, SN134-140, SN135-140, SN136-140, SN137-140, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN124-139, SN125-139, SN126-139, SN127-139, SN128-139, SN129-139, SIN130-139, SN131-139, SN132-139, SN133-139, SN134-139, SN135-139, SN136-139, SN137-139, SN124-138, SN124-138, SN125-138, SN126-138, SN127-138, SN128-138, SN129-138, SN130-138, SN131-138, SN132-138, SN133-138, SN134-138, SN135-138, SN136-138, SN124-137, SN125-137, SN126-137, SN127-137, SN128-137, SN129-137, SN130-137, SN131-137, SN132-137, SN133-137, SN134-137, SN135-137, SN124-136, SN125-136, SN126-136, SN127-136, SN128-136, SN129-136, SN130-136, SN131-136, SN132-136, SN133-136 y SN134-136.

Algunos anticuerpos se unen a un epítopo dentro de un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado de los aminoácidos 90-140, 98-140, 108-136, 110-130 ó 118-126 de alfa sinucleína.

Algunos anticuerpos se unen a un epítopo con un segmento de alfa-sinucleína humana seleccionado de SN 70-119, 80-109, 88-101 ó 91-99 ó 70-99.

Anticuerpos monoclonales que se unen a los epítopos de la región del extremo C se unen preferentemente con alta afinidad, por ejemplo, al menos 10^8, 10^9 ó 10^{10} M^{-1} a alfa sinucleína humana.

Algunos anticuerpos de la divulgación reconocen específicamente alfa-SN fosforilada en la posición 129 (serina) y no se unen específicamente a alfa-SN sin fosforilar. Algunos anticuerpos se unen a un epítopo dentro del segmento SN120-130 de alfa-sinucleína humana seleccionado de, tal como SN124-134.

Anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen específicamente a un segmento preferido de alfa-SN sin que se unan específicamente a otras regiones de alfa-SN tienen varias ventajas con respecto a anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o sueros policlonales para alfa-SN intacta. Primero, para dosificaciones másicas iguales, las dosificaciones de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una dosificación molar mayor de anticuerpos eficaz en eliminar placas de amiloide. Segundo, los anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una eliminación de respuesta contra CL sin inducir una respuesta de eliminación contra alfa-SN intacta, reduciendo así las posibilidades de efectos secundarios.

Opcionalmente, los anticuerpos pueden cribarse para actividad profiláctica o terapéutica en animales transgénicos de enfermedad de CL como se ha descrito anteriormente. Opcionalmente, un conjunto de anticuerpos se criba previamente para unión relativa a alfa sinucleína humana desnaturalizada o un fragmento de la misma. Las afinidades de unión relativas pueden estimarse a partir de las intensidades relativas de señal en una inmunotransferencia. Un anticuerpo que tiene afinidad de unión relativa por encima de la media, o preferentemente el anticuerpo que tiene la mayor afinidad de unión probada, se selecciona para cribado adicional en animales transgénicos. Puede realizarse cribado previo similar para probar anticuerpos para su unión a agregados de alfa-sinucleína en secciones de tejido por inmunocitoquímica. Pueden obtenerse secciones de tejido del cerebro de un paciente enfermo o un modelo de animal transgénico.

En una realización, el anticuerpo designado 6H7, o un anticuerpo que compite con 6H7 por la unión específica a alfa sinucleína, se usa para inmunización pasiva. En una realización, el anticuerpo designado 8A5, o un anticuerpo que compite con 8A5 para unión específica a alfa sinucleína, se usa para inmunización pasiva. En una realización, el anticuerpo designado 9E4, o un anticuerpo que compite con 9E4 para unión específica a alfa sinucleína, se usa para inmunización pasiva. En una realización, el anticuerpo designado 1H7, o un anticuerpo que compite con 1H7 para unión específica a alfa sinucleína, se usa para inmunización pasiva. En una realización, el anticuerpo designado 11A5, o un anticuerpo que compite con 11A5 para unión específica a alfa sinucleína, se usa para inmunización pasiva. En algunas realizaciones, un anticuerpo anteriormente mencionado se usa en combinación entre sí o con otros anticuerpos anti-alfa sinucleína.

Como se describe en el presente documento, la administración de anticuerpos que reconocen epítopos en las regiones del extremo amino y extremo carboxi de alfa-sinucleína (es decir, 8A5 y 6H7) redujeron los agregados de alfa-sinucleína en los cerebros de ratones transgénicos que expresan en exceso alfa-sinucleína humana (véase, por ejemplo, Ejemplo IX). Basándose en parte en este descubrimiento, se contempla que la administración en combinación de anticuerpos que reconocen un epítopo del extremo N (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente) y anticuerpos que reconocen un epítopo del extremo C (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente) serán particularmente eficaces en la profilaxis y terapia. Así, en un aspecto, la divulgación proporciona un método para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro administrando en combinación a un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad una pauta eficaz de un primer anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 1-20 de alfa-sinucleína humana, residuos que se numeran según SEC ID Nº:; administrando un segundo anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 70-140 de alfa-sinucleína humana. Preferentemente, el primer anticuerpo se une a un epítopo de alfa-sinucleína dentro de la secuencia de residuos 1 a N_a de SEC ID Nº: 1, en la que N_a es 5 a 20; dentro de la secuencia de residuos 2 a N_b de SEC ID Nº: 1, en la que N_b es 6 a 21; y/o dentro de la secuencia de residuos 3 a N_c de SEC ID Nº: 1, y N_c es 7 a 22. Preferentemente, el segundo anticuerpo se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 120-140 de alfa-sinucleína humana. El primer y segundo anticuerpos pueden administrarse simultáneamente (por ejemplo, co-formularse), el mismo día, el mismo mes y/o como parte del mismo ciclo de terapia.

La divulgación proporciona composiciones para la profilaxis o tratamiento de una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy o agregación de alfa-sinucleína en el cerebro que comprenden uno o más anticuerpos que se unen en una región terminal de alfa-sinucleína, por ejemplo, que tienen una especificidad descrita anteriormente. Las composiciones incluyen formas de dosificación y formulaciones que contienen dos o más anticuerpos. Formulaciones a modo de ejemplo (adecuadas para co-formular anticuerpos) se conocen en la técnica e incluyen aquellas descritas más adelante en la Sección VII (“Pautas de tratamiento”).

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

i. Características generales de inmunoglobulinas

Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción del extremo carboxi de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican como tanto kappa como lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos (véase generalmente Fundamental Immunology, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7).

Las regiones variables de cada par de cadenas ligeras / pesadas forman el sitio de unión al anticuerpo. Así, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Las cadenas presentan todas la misma estructura general de regiones estructurales (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones estructurales, permitiendo la unión a un epítopo específico. Del extremo N al extremo C, ambas cadenas ligeras y pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991); Chotia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); o Chotia et al., Nature 342:878-883 (1989).

ii. Producción de anticuerpos no humanos

Los anticuerpos quiméricos y humanizados tienen la misma especificidad de unión y afinidad o similar que un anticuerpo de ratón u otro anticuerpo no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos no humanos pueden humanizarse injertando CDR no humanas sobre regiones estructurales y constantes humanas, o incorporando los dominios variables no humanos enteros (opcionalmente "ocultándolos" con una superficie tipo humana por sustitución de residuos expuestos, en los que el resultado es un anticuerpo "inactivado"). Véase Gonzales et al., Minimizing the immunogenicity of antibodies for clinical application, Tumour Biol. 26(1):31-43 (2005). Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de las cadenas ligeras y pesadas se han construido, normalmente por ingeniería genética, a partir de segmentos del gen de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes (C) humanos, tales como IgG1 y IgG4. Se prefiere el isotipo humano IgG1. En algunos métodos, el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana. Los anticuerpos IgM también pueden usarse en algunos métodos. Un anticuerpo quimérico típico es así una proteína híbrida que consiste en el dominio V o de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio C o efector de un anticuerpo humano.

Los anticuerpos humanizados tienen residuos de la región estructural de la región variable sustancialmente de un anticuerpo humano (llamado un anticuerpo aceptor) y regiones determinantes de la complementariedad sustancialmente de un anticuerpo de ratón (denominado la inmunoglobulina donante). Véase Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989), documentos WO 90/07861, US 5.693.762, US 5.693.761, US 5.585.089, US 5.530.101 y Winter, documento US 5.225.539. La(s) región (regiones) constante(s), si está(n) presente(s), también son sustancialmente o completamente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos se eligen normalmente de anticuerpos humanos cuyas secuencias de la región estructural presentan un alto grado de identidad de secuencias con los dominios de la región variable murinos de los que se derivaron las CDR. Los residuos de la región estructural de la región variable de la cadena pesada y ligeras pueden derivarse de las mismas secuencias de anticuerpo humano o diferentes. Las secuencias de anticuerpo humano pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos que se producen naturalmente o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Carter et al., documento WO 92/22653. Ciertos aminoácidos de los residuos de la región estructural de la región variable humana se seleccionan para sustitución basándose en sus posibles influencias sobre la conformación de CDR y/o unión al antígeno. La investigación de tales posibles influencias es por modelado, examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, u observación empírica de los efectos de sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido se diferencia entre un residuo de la región estructural de la región variable murina y un residuo de la región estructural de la región variable humana seleccionado, el aminoácido de la región estructural humana debe normalmente estar sustituido por el aminoácido de la región estructural equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

(1) se una no covalentemente al antígeno directamente,
(2) sea adyacente a una región CDR,
(3) interaccione de otro modo con una región CDR (por ejemplo, esté dentro de aproximadamente 6 A de una región CDR), o
(4) participe en la interfase VL-VH.

Otros candidatos para sustitución son aminoácidos de la región estructural humana aceptores que son poco usuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden estar sustituidos con

aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donante de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Otros candidatos para sustitución son aminoácidos de la región estructural humana aceptores que son poco usuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. La regiones estructurales de la región variable de inmunoglobulinas humanizadas normalmente muestran al menos el 85 % de identidad de secuencias con una secuencia de la región estructural de la región variable humana o consenso de tales secuencias.

Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) derivadas del anticuerpo monoclonal de ratón mAb 6H7. La línea celular designada JH17.6H7.1,54.28 que produce el anticuerpo 6H7 tiene el número de acceso ATCC PTA-6910 que se ha depositado bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) el 4 de agosto de 2005.

Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) derivadas del anticuerpo monoclonal de ratón mAb 8A5. La línea celular designada JH4.8A5.25.7.36 que produce el anticuerpo 8A5 tiene el número de acceso ATCC PTA-6909 que se ha depositado el 4 de agosto de 2005.

Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) derivadas del anticuerpo monoclonal de ratón mAb 9E4. La línea celular designada JH17.9E4.3.37.1.14.2 que produce el anticuerpo 9E4 tiene el número de acceso ATCC PTA-8221 que se ha depositado bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) el 26 de febrero de 2007.

Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) derivadas del anticuerpo monoclonal de ratón mAb 11A5. La línea celular designada JH22.11A5.6.29.70.54.16.14 que produce el anticuerpo 11A5 tiene el número de acceso ATCC PTA-8222 que se ha depositado bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) el 26 de febrero de 2007.

Algunos anticuerpos humanizados comprenden secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) derivadas del anticuerpo monoclonal de ratón mAb 1H7. La línea celular designada JH17.1H7.4.24.34 que produce el anticuerpo 1H7 tiene el número de acceso ATCC PTA-8220 que se ha depositado bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) el 26 de febrero de 2007.

Como se observa anteriormente, se conocen varios métodos para producir anticuerpos quiméricos y humanizados usando una línea celular que expresa anticuerpos (por ejemplo, hibridoma). Por ejemplo, las regiones variables de inmunoglobulina de los anticuerpos 8A5 y/o 6H7 y/o 9E4 de ratón pueden clonarse y secuenciarse usando métodos muy conocidos. Asimismo, las regiones variables de inmunoglobulina de los anticuerpos 1H7 ó 11A5 de ratón pueden clonarse y secuenciarse usando métodos muy conocidos. En un método, para ilustración y no limitación, la región variable VH de la cadena pesada se clona por RT-PCR usando ARNm preparado a partir de células de hibridoma. Se emplean cebadores consenso para el péptido conductor de la región VH que engloba el codón de iniciación de la traducción como el cebador de 5' y regiones constantes g2b específicas para el cebador de 3'. Cebadores a modo de ejemplo se describen en la publicación de patente de EE.UU. US 2005/0009150 por Schenk et al. (en lo sucesivo, “Schenk”). Las secuencias de múltiples clones independientemente derivados pueden compararse para garantizar que no se introduzcan cambios durante la amplificación. La secuencia de la región VH también puede determinarse o confirmarse por secuenciación de un fragmento VH obtenido por metodología de 5' RACE RT-PCR y el cebador específico de 3' g2b.

La región variable VL de la cadena ligera de 8A5, 6H7, 9E4, 1 H7 o 11A5 puede clonarse de una manera análoga a la región VH. En un enfoque, un conjunto de cebadores consenso diseñado para la amplificación de regiones VL murinas se diseña para hibridarse con la región VL que engloba el codón de iniciación de la traducción, y un cebador de 3' específico para la región Ck murina en la dirección 3’ de la región de unión V-J. En un segundo enfoque, se emplea metodología de 5' RACE RT-PCR para clonar una VL que codifica ADNc. Cebadores a modo de ejemplo se describen en Schenk. Las secuencias clonadas se combinan entonces con secuencias que codifican regiones constantes humanas.

En un enfoque, las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se re-manipulan para codificar secuencias donantes de corte y empalme en la dirección 3’ de los empalmes de VDJ o VJ respectivos, y se clonan en el vector de expresión de mamífero, tal como pCMV-hγl para la cadena pesada, y pCMV-sκk1 para la cadena ligera. Estos vectores codifican regiones constantes γ1 y Ck humanas como fragmentos exónicos en la dirección 3’ del casete de la región variable insertado. Tras la verificación de secuencias, los vectores de expresión de la cadena pesada y cadena ligera pueden co-transfectarse en células COS para producir anticuerpos quiméricos. Se recoge medio acondicionado 48 h después de la transfección y se ensaya por análisis de transferencia Western para la

producción de anticuerpos o ELISA para la unión al antígeno. Los anticuerpos quiméricos se humanizan como se ha descrito anteriormente.

iii. Anticuerpos humanos

Se proporcionan anticuerpos humanos contra alfa-SN mediante una variedad de técnicas descritas a continuación. Algunos anticuerpos humanos se seleccionan por experimentos de unión competitiva, o de otro modo, para tener la misma especificidad por epítopo que un anticuerpo de ratón particular, tal como uno de los anticuerpos monoclonales de ratón descritos en los Ejemplos IX y X. Los anticuerpos humanos también pueden cribarse para una especificidad por epítopo particular usando solo un fragmento de alfa-SN como inmunogén, y/o por cribado de anticuerpos contra un conjunto de mutantes de deleción de alfa-SN. Los anticuerpos humanos tienen preferentemente especificidad por isotipo IgG1 humana.

(1) Metodología de triomas

Se han descrito el enfoque básico y un componente de fusión celular a modo de ejemplo, SPAZ-4, para su uso en este enfoque por Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, patente de EE.UU. nº 4.634.664; y Engleman et al., patente de EE.UU. 4.634.666. Las líneas celulares productoras de anticuerpo obtenidas por este método se llaman triomas, debido a que descienden de tres células - dos humanas y una de ratón. Inicialmente, un línea de mieloma de ratón se fusiona con un linfocito B humano para obtener una célula híbrida xenógena no productora de anticuerpos, tal como la línea celular SPAZ-4 descrita por Oestberg, arriba. Entonces, la célula xenógena se fusiona con un linfocito B humano inmunizado para obtener una línea celular de trioma productora de anticuerpos. Se ha encontrado que los triomas producen anticuerpo más establemente que los hibridomas habituales hechos de células humanas.

Los linfocitos B inmunizados se obtienen de la sangre, bazo, ganglios linfáticos o médula ósea de un donante humano. Si se desean anticuerpos contra un antígeno o epítopo específico, es preferible usar ese antígeno o epítopo del mismo para la inmunización. La inmunización puede ser tanto *in vivo* como *in vitro*. Para la inmunización *in vivo*, los linfocitos B normalmente se aíslan de un ser humano inmunizado con alfa-SN, un fragmento de la misma, polipéptido mayor que contiene alfa-SN o fragmento, o un anticuerpo antiidiotípico para un anticuerpo para alfa-SN. En algunos métodos, los linfocitos B se aíslan del mismo paciente que por último lugar va a administrarse con la terapia de anticuerpos. Para la inmunización *in vitro*, los linfocitos B normalmente se exponen a antígeno durante un periodo de 7-14 días en un medio tal como RPMI-1640 (véase Engleman, arriba) complementado con 10 % de plasma humano.

Los linfocitos B inmunizados se fusionan con una célula híbrida xenógena tal como SPAZ-4 por métodos muy conocidos. Por ejemplo, las células se tratan con 40-50 % de polietilenglicol de MW 1000-4000, a aproximadamente 37 ºC, durante aproximadamente 5-10 min. Las células se separan de la mezcla de fusión y se propagan en medios selectivos para los híbridos deseados (por ejemplo, HAT o AH). Los clones que secretan anticuerpos que tienen la especificidad de unión requerida se identifican ensayando el medio de cultivo de trioma para la capacidad para unirse a alfa-SN o un fragmento de la misma. Los triomas que producen anticuerpos humanos que tienen la especificidad deseada se subclonan por la técnica de dilución limitante y se cultivan *in vitro* en medio de cultivo. Las líneas celulares de trioma obtenidas se prueban entonces para la capacidad para unirse a alfa-SN o un fragmento de la misma.

Aunque los triomas son genéticamente estables, no producen anticuerpos a niveles muy altos. Los niveles de expresión pueden aumentarse clonando genes de anticuerpo del trioma en uno o más vectores de expresión, y transformando el vector en líneas celulares estándar de mamífero, bacterianas o de levadura.

(2) Mamíferos no humanos transgénicos

También pueden producirse anticuerpos humanos contra alfa-SN a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de inmunoglobulina humana. Normalmente, el locus de inmunoglobulina endógena de tales mamíferos transgénicos está funcionalmente inactivado. Preferentemente, el segmento del locus de la inmunoglobulina humana incluye secuencias sin reorganizar de componentes de la cadena pesada y ligera. Tanto la inactivación de genes de inmunoglobulina endógena como la introducción de genes de inmunoglobulina exógena pueden lograrse por recombinación homóloga dirigida, o por introducción de cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos resultantes de este proceso son capaces de reorganizar funcionalmente las secuencias de componentes de inmunoglobulina, y expresar un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humana, sin expresar genes de inmunoglobulina endógena. La producción y propiedades de mamíferos que tienen estas propiedades se describen en detalle por, por ejemplo, Lonberg et al., documentos WO93/1222, US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, documento WO 91/10741. Ratones transgénicos son particularmente adecuados. Se obtienen anticuerpos anti-alfa-SN inmunizando

un mamífero no humano transgénico, tal como se describe por Lonberg o Kucherlapati, arriba, con alfa-SN o un fragmento de la misma. Los anticuerpos monoclonales se preparan por, por ejemplo, fusionando linfocitos B de tales mamíferos con líneas de células de mieloma adecuadas usando tecnología convencional de Kohler-Milstein. También pueden proporcionarse anticuerpos policlonales humanos en forma de suero de seres humanos inmunizados con un agente inmunogénico. Opcionalmente, tales anticuerpos policlonales pueden concentrarse por purificación por afinidad usando alfa-SN u otro péptido amiloide como reactivo de afinidad.

(3) Métodos de expresión en fago

Otro enfoque para obtener anticuerpos humanos anti-alfa-SN es cribar una biblioteca de ADN de linfocitos B humanos según el protocolo general brevemente expuesto por Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989). Como se describe para la metodología de triomas, tales linfocitos B pueden obtenerse de un ser humano inmunizado con alfa-SN, fragmentos, polipéptidos más largos que contienen alfa-SN o fragmentos o anticuerpos antiidiotípicos. Opcionalmente, tales linfocitos B se obtienen de un paciente que por último lugar recibe el tratamiento con anticuerpos. Se seleccionan anticuerpos que se unen a alfa-SN o un fragmento de la misma. Entonces se clonan y se amplifican las secuencias que codifican tales anticuerpos (o fragmentos de unión). El protocolo descrito por Huse se vuelve más eficaz en combinación con tecnología de expresión en fago. Véase, por ejemplo, Dower et al., documento WO 91/17271 y McCafferty et al., documentos WO 92/01047, US 5.877.218, US 5.871.907, US 5.858.657, US 5.837.242, US 5.733.743 y US 5.565.332. En estos métodos, se producen bibliotecas de fago en las que los miembros muestran diferentes anticuerpos sobre sus superficies externas. Los anticuerpos se expresan normalmente como fragmentos Fv o Fab. Los anticuerpos de expresión en fago con una especificidad deseada se seleccionan por enriquecimiento por afinidad dando un péptido alfa-SN o fragmento de la misma.

En una variación del método de expresión en fago, pueden producirse anticuerpos humanos que tienen especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado. Véase Winter, documento WO 92/20791. En este método, tanto la región variable de la cadena pesada como ligeras del anticuerpo murino seleccionado se usan como material de partida. Si, por ejemplo, una región variable de la cadena ligera se selecciona como material de partida, se construye una biblioteca de fagos en la que los miembros muestran la misma región variable de la cadena ligera (es decir, el material de partida murino) y una región variable de la cadena pesada diferente. Las regiones variables de la cadena pesada se obtienen de una biblioteca de regiones variables de la cadena pesada humanas reorganizadas. Se selecciona un fago que muestra unión específica fuerte por alfa-SN (por ejemplo, al menos 10^8 y preferentemente al menos 10^9 M^{-1}). La región variable de la cadena pesada humanas de este fago sirve entonces de material de partida para construir otra biblioteca de fagos. En esta biblioteca, cada fago muestra la misma región variable de la cadena pesada (es decir, la región identificada de la primera biblioteca de expresión) y una región variable de la cadena ligera diferente. Las regiones variables de las cadena ligeras se obtienen de una biblioteca de regiones variables de las cadenas ligeras humanas reorganizadas. De nuevo, se selecciona el fago que muestra fuerte unión específica para alfa-SN. Estos fagos expresan regiones variables de anticuerpos anti-alfa-SN completamente humanos. Estos anticuerpos normalmente tienen la misma especificidad por epítopo o similar que el material de partida murino.

iv. Selección de región constante

Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos pueden ligarse a al menos una porción de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea toxicidad mediada por el complemento dependiente de anticuerpo y/o celular. Por ejemplo, los isótopos IgG1 y IgG3 tienen actividad de complemento y los isotipos IgG2 y IgG4 no. La elección del isotipo también puede afectar el paso del anticuerpo al cerebro. Se prefiere isotipo IgG1 humana. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')2 y Fv, o como anticuerpos monocatenarios en los que los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras están unidos mediante un espaciador.

v. Expresión de anticuerpos recombinantes

Normalmente se producen anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos por expresión recombinante. Construcciones de polinucleótidos recombinantes normalmente incluyen una secuencia de control de la expresión operativamente ligada a las secuencias codificantes de cadenas de anticuerpos, que incluyen regiones promotoras naturalmente asociadas o heterólogas. Preferentemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas de promotor eucariota en vectores que pueden transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recogida y purificación de los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada.

Estos vectores de expresión normalmente son replicables en los organismos huésped bien como episomas o bien como parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contienen

marcadores de selección, por ejemplo, resistencia a ampicilina o resistencia a higromicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

E. coli es un huésped procariota particularmente útil para clonar las secuencias de ADN de la presente divulgación. Microbios, tales como levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, teniendo vectores adecuados secuencias de control de la expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato cinasa y otras enzimas glicolíticas. Promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

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

Alternativamente, pueden incorporarse secuencias codificantes de anticuerpos en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y posterior expresión en la leche del animal transgénico (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.741.957, US 5.304.489, US 5.849.992). Transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas en enlace operable con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta-lactoglobulina.

Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés pueden transferirse a la célula huésped por métodos muy conocidos, dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, comúnmente se utiliza transfección con cloruro de calcio para células procariotas, mientras que puede usarse tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus para otros huéspedes celulares. Otros métodos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección (véase generalmente Sambrook *et al.*, arriba). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden microinyectarse en ovocitos fecundados, o pueden incorporarse en el genoma de citoblastos embrionarios, y transferirse los núcleos de tales células a ovocitos enucleados.

Una vez expresados, los anticuerpos pueden purificarse según procedimientos convencionales en la materia, que incluyen purificación por HPLC, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase generalmente, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

3. Conjugados

Algunos agentes para inducir una respuesta inmunitaria contienen el epítopo apropiado para inducir una respuesta inmunitaria contra LB, pero son demasiado pequeños para ser inmunogénicos. En esta situación, un inmunogén de péptido puede ligarse a una molécula portadora adecuada para formar un conjugado que ayuda a provocar una respuesta inmunitaria. Vehículos adecuados incluyen albúminas de suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, o un toxoide de otras bacterias patógenas, tales como difteria, *E. coli,* cólera o *H. pilori,* o un derivado de toxina atenuada. Los epítopos de linfocitos T también son moléculas portadoras adecuadas. Pueden formarse algunos conjugados enlazando agentes con una molécula de polímero inmunoestimulante (por ejemplo, tripalmitoil-S-glicerina-cisteína (Pam_3Cys), manano (un polímero de manosa) o glucano (un polímero beta 1→2)), citocinas (por ejemplo, IL-1, péptidos alfa y beta de IL-1, IL-2, gamma-INF, IL-10, GM-CSF) y quimiocinas (por ejemplo, MIP1alfa y beta, y RANTES). También pueden ligarse agentes inmunogénicos a péptidos que potencian el transporte a través de tejidos, como se describe en O'Mahony, documentos WO 97/17613 y WO 97/17614. Pueden ligarse inmunógenos a los vehículos con o sin aminoácidos espaciadores (por ejemplo, gly-gly).

Pueden formarse algunos conjugados enlazando agentes a al menos un epítopo de linfocitos T. Algunos epítopos de linfocitos T son promiscuos, mientras que otros epítopos de linfocitos T son universales. Los epítopos de linfocitos T promiscuos pueden potenciar la inducción de la inmunidad de linfocitos T en una amplia variedad de sujetos que expresan diversos tipos de HLA. A diferencia de los epítopos de linfocitos T promiscuos, los epítopos de linfocitos T universales pueden potenciar la inducción de inmunidad de linfocitos T en un gran porcentaje, por ejemplo, al menos el 75 %, de sujetos que expresan diversas moléculas de HLa codificadas por diferentes alelos de HLA-DR.

Existe un gran número de epítopos de linfocitos T que se producen naturalmente, tales como toxoide tetánico (por ejemplo, los epítopos P2 y P30), antígeno de superficie de la hepatitis B, pertussis, toxoide, proteína F del virus del sarampión, proteína de la membrana externa mayor de *Chlamydia trachomatis*, toxoide diftérico, circumsporozoito T de *Plasmodium falciparum*, antígeno CS de *Plasmodium falciparum*, triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni*, TraT de *Escherichia coli* y hemaglutinina del virus de la gripe (HA). Los péptidos inmunogénicos de la divulgación también pueden conjugarse con los epítopos de linfocitos T descritos en Sinigaglia F. et al., Nature, 336:778-780 (1988); Chicz R.M. et al., J. Exp. Med., 178:27-47 (1993); Hammer J. et al., Cell 74:197-203 (1993); Falk K. et al., Immunogenetics, 39:230-242 (1994); documento WO 98/23635; y Southwood S. et al. J. Immunology, 160:3363-3373 (1998). Otros ejemplos incluyen:

Hemaglutinina de la gripe: $HA_{307-319}$ PKYVKQNTLKLAT (SEC ID Nº: 4)
CS de malaria: epítopo T3 EKKIAKMEKASSVFNV (SEC ID Nº: 5)
Antígeno de superficie de la hepatitis B: $HBsAg_{19-28}$ FFLLTRILT1 (SEC ID Nº: 6)
Proteína 65 de choque térmico: $hsp65_{153-171}$ DQSIGDLIAEAMDKVGNEG (SEC ID Nº: 7)
Bacilo de Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL (SEC ID Nº: 8)
Toxoide tetánico: $TT_{830-844}$ QYIKANSKFIGITEL (SEC ID Nº: 9)
Toxoide tetánico: $TT_{947-967}$ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEC ID Nº: 10)
gp120 T1 del VIH: KQIINMWQEVGKAMYA (SEC ID Nº: 11).

Alternativamente, los conjugados pueden formarse enlazando agentes de la invención con al menos un epítopo de linfocitos T artificial que puede unirse a una gran proporción de moléculas de clase II del MHC, tales como el epítopo pan DR ("PADRE"). PADRE se describe en los documentos US 5.736.142, WO 95/07707 y Alexander J et al., Immunity, 1:751-761 (1994). Un péptido PADRE preferido es AKXVAAWTLKAAA (SEC ID Nº: 12) (residuos comunes en negrita) en el que X es preferentemente ciclohexilalanina tirosina o fenilalanina, siendo más preferida ciclohexilalanina.

Los agentes inmunogénicos pueden ligarse a vehículos por reticulación química. Técnicas para ligar un inmunogén a un vehículo incluyen la formación de enlaces disulfuro usando N-succinimidil-3-(2-piridil-tio)propionato (SPDP) y 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, éste puede proporcionarse mediante la adición de un residuo de cisteína). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre ellos mismos y la cisteína del péptido reside sobre una proteína y un enlace amida mediante el épsilon-amino sobre una lisina, u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Una variedad de tales agentes formadores de disulfuro/amida se describe por Immun. Rev. 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en vez de un enlace disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tioéter están comercialmente disponibles e incluyen ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético y ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos carboxilo pueden activarse combinándolos con succinimida o sal de sodio del ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico.

La inmunogenicidad puede mejorarse mediante la adición de residuos espaciadores (por ejemplo, Gly-Gly) entre el epítopo T_h y el inmunogén de péptido de la divulgación. Además de separar físicamente el epítopo T_h del epítopo de linfocitos B (es decir, el inmunogén de péptido), los residuos de glicina pueden alterar cualquier estructura secundaria artificial creada por la unión del epítopo T_h con el inmunogén de péptido, y así eliminar la interferencia entre las respuestas de linfocitos T y/o B. La separación conformacional entre el epítopo colaborador y el dominio que provoca el anticuerpo permite así interacciones más eficaces entre el inmunogén presentado y los linfocitos T_h y B apropiados.

Para potenciar la inducción de inmunidad de linfocitos T en un gran porcentaje de sujetos que expresan diversos tipos de HLA para un agente de la presente divulgación, puede prepararse una mezcla de conjugados con diferentes epítopos de linfocitos T_h. La mezcla puede contener una mezcla de al menos dos conjugados con diferentes epítopos de linfocitos T_h, una mezcla de al menos tres conjugados con diferentes epítopos de linfocitos T_h, o una mezcla de al menos cuatro conjugados con diferentes epítopos de linfocitos T_h. La mezcla puede administrarse con un adyuvante.

También pueden expresarse péptidos inmunogénicos como proteínas de fusión con vehículos (es decir, péptidos heterólogos). El péptido inmunogénico puede ligarse en su extremo amino, su extremo carboxilo, o ambos, a un vehículo. Opcionalmente, pueden estar presentes múltiples repeticiones del péptido inmunogénico en la proteína de fusión. Opcionalmente, puede ligarse un péptido inmunogénico a múltiples copias de un péptido heterólogo, por ejemplo, en tanto los extremos N como C del péptido. Algunos péptidos portadores sirven para inducir una respuesta de linfocitos T colaboradores contra el péptido portador. Los linfocitos T colaboradores inducidos inducen a su vez una respuesta de linfocitos B contra el péptido inmunogénico ligado al vehículo.

También pueden expresarse péptidos inmunogénicos como proteínas de fusión con vehículos (es decir, péptidos heterólogos). El péptido inmunogénico puede ligarse en su extremo amino, su extremo carboxilo, o ambos, a un vehículo. Opcionalmente, pueden estar presentes múltiples repeticiones del péptido inmunogénico en la proteína de fusión. Opcionalmente, un péptido inmunogénico puede ligarse a múltiples copias de un péptido

heterólogo, por ejemplo, en tanto los extremos N como C del péptido. Algunos péptidos portadores sirven para inducir una respuesta de linfocitos T colaboradores contra el péptido portador. Los linfocitos T colaboradores inducidos inducen a su vez una respuesta de linfocitos B contra el péptido inmunogénico ligado al péptido portador.

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

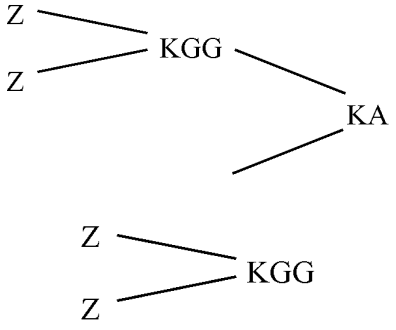
Algunos agentes comprenden una proteína de fusión en que un fragmento del extremo C de alfa-SN está ligado en su extremo N a un péptido portador. En tales agentes, el residuo del extremo C del fragmento de alfa-SN constituye el residuo del extremo C de la proteína de fusión. Por consiguiente, tales proteínas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

En algunas proteínas de fusión, NAC está fusionado en su extremo N a un péptido portador heterólogo. En algunas proteínas de fusión, NAC está fusionado en su extremo C a un péptido portador heterólogo. Algunas proteínas de fusión comprenden un péptido heterólogo ligado al extremo N o extremo C de NAC, que está a su vez ligado a uno o más segmentos de NAC adicionales de alfa-SN en tándem. Algunas proteínas de fusión comprenden múltiples copias de un péptido de alfa sinucleína del extremo C, como se ha descrito anteriormente, y múltiples copias de un péptido heterólogo conectadas entre sí.

En algunas proteínas de fusión, un fragmento de alfa-SN que no incluye ni el extremo C o extremo N (por ejemplo, SN110-130, SN 85-105) está fusionado en su extremo N con un péptido portador heterólogo. En algunas proteínas de fusión, el fragmento está fusionado en su extremo C con un péptido portador heterólogo. Algunas proteínas de fusión comprenden un péptido heterólogo ligado al extremo N o extremo C del fragmento, que está a su vez ligado a uno o más fragmentos adicionales de alfa-SN en tándem. Algunas proteínas de fusión comprenden múltiples copias de un péptido de alfa sinucleína, como se ha descrito anteriormente, y múltiples copias de un péptido heterólogo conectadas entre sí.

A continuación se muestran algunos ejemplos de proteínas de fusión. Algunas de estas proteínas de fusión comprenden segmentos de alfa-SN (incluyendo cualquiera de los fragmentos descritos anteriormente) ligados a epítopos del toxoide tetánico tal como se describe en los documentos US 5.196.512, EP 378.881 y EP 427.347. Algunas proteínas de fusión comprenden segmentos de alfa-SN ligados a al menos un PADRE. Algunos péptidos heterólogos son epítopos de linfocitos T promiscuos, mientras que otros péptidos heterólogos son epítopos de linfocitos T universales. En algunos métodos, el agente para administración es simplemente una única proteína de fusión con un segmento de alfa-SN ligado a un segmento heterólogo en configuración lineal. Los agentes terapéuticos de la divulgación pueden representarse usando una fórmula. Por ejemplo, en algunos métodos, el agente es multímero de proteínas de fusión representadas por la fórmula 2^x, en la que x es un número entero de 1-5. Preferentemente, x es 1, 2 ó 3, siendo 2 el más preferido. Si x es dos, un multímero tal tiene cuatro proteínas de fusión ligadas en una configuración preferida denominada MAP4 (véase el documento US 5.229.490).

La configuración de MAP4 se muestra a continuación, en la que estructuras ramificadas se producen iniciando la síntesis de péptidos en tanto el extremo N como las aminas de la cadena lateral de lisina. Dependiendo del número de veces que la lisina se incorpora en la secuencia y se deja que se ramifique, la estructura resultante presentará múltiples extremos N. En este ejemplo, se han producido cuatro extremos N idénticos sobre el núcleo que contiene lisina ramificada. Tal multiplicidad potencia enormemente la sensibilidad de linfocitos B relacionados.



Z se refiere al péptido NAC, un fragmento del péptido NAC, u otro fragmento activo de alfa-SN como se describe en la Sección I.2 anteriormente. Z puede representar más de un fragmento activo, por ejemplo:

Z = péptido alfa-SN 60-72 (región de NAC) = NH2-KEQVTNVCGGAVVT-COOH (SEC ID Nº: 13)
Z = péptido alfa-SN 73-84 (región de NAC) = NH2-GVTAVAQKTVECG-COOH (SEC ID Nº: 14)
Z = péptido alfa-SN102-112 = NH2-C-ácido amino-heptanoico-KNEEGAPCQEG-COOH (SEC ID Nº: 15)
péptido alfa-SN128-140

Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

Z-Toxoide tetánico 830-844 en una configuración de MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL (SEC ID Nº: 16)

Z-Toxoide tetánico 947-967 en una configuración de MAP4:

Z-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEC ID Nº: 17)

Z-Toxoide tetánico$_{830-844}$ en una configuración de MAP4:

Z-QY1KANSKFIGITEL (SEC ID Nº: 18)

Z-Toxoide tetánico$_{830-844}$ + Toxoide tetánico$_{947-967}$ en una configuración lineal:

Z-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEC ID Nº: 19)

El péptido PADRE (todo en las configuraciones lineales), en el que X es preferentemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la ciclohexilalanina la más preferida -Z:

AKXVAAWTLKAAA-Z (SEC ID Nº: 20)
Péptido 3Z-PADRE:
Z-Z-Z-AKXVAAWTLKAAA (SEC ID Nº: 21)

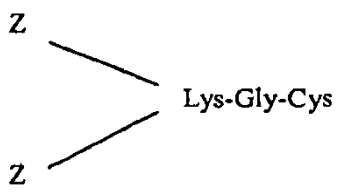
Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen:

AKXVAAWTLKAAA-Z-Z-Z-Z (SEC ID Nº: 22)
Z-AKXVAAWTLKAAA (SEC ID Nº: 23)
Z-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEC ID Nº: 24)
PKYVKQNTLKLAT-Z-Z-Z (SEC ID Nº: 25)
Z-PKYVKQNTLKLAT-Z (SEC ID Nº: 26)
Z-Z-Z-PKYVKQNTLKLAT (SEC ID Nº: 27)
Z-Z-PKYVKQNTLKLAT (SEC ID Nº: 28)

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

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

Z-QYIKANSKFIGITEL (SEC ID Nº: 31) en una resina de 2 ramas:



EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR (SEC ID Nº: 32)

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

Pueden usarse las mismas proteínas transportadoras o similares y métodos de enlace para generar inmunógenos que van a usarse en la generación de anticuerpos contra alfa-SN para su uso en inmunización pasiva. Por ejemplo, alfa-SN o un fragmento ligado a un vehículo a un animal de laboratorio en la producción de anticuerpos monoclonales para alfa-SN.

4. Agentes terapéuticos que codifican ácidos nucleicos

También pueden inducirse respuestas inmunitarias contra cuerpos de Lewy por administración de ácidos nucleicos que codifican segmentos del péptido alfa-SN, y fragmentos del mismo, otros inmunógenos de péptido, o anticuerpos y sus cadenas componentes usadas para inmunización pasivas. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunogén está normalmente ligado a elementos reguladores, tales como un promotor y potenciador, que permiten la expresión del segmento de ADN en las células diana previstas de un paciente. Para la expresión en glóbulos sanguíneos, como se desea para la inducción de una respuesta inmunitaria, elementos promotores y potenciadores de genes de inmunoglobulina de la cadena ligera o pesada o el promotor temprano intermedio principal del CMV y potenciador son adecuados para dirigir la expresión. Los elementos reguladores y secuencias codificantes ligados se clonan frecuentemente en un vector. Para la administración de anticuerpos bicatenarios, las dos cadenas pueden clonarse en el mismo vector o en vectores separados. El ácido nucleico que codifica agentes terapéuticos de la divulgación también puede codificar al menos un epítopo de linfocitos T. Las divulgaciones en el presente documento que se refieren al uso de adyuvantes y el uso de se aplican, cambiando lo que haya que cambiar, a su uso con el ácido nucleico que codifica los agentes terapéuticos de la presente divulgación.

Están disponibles varios sistemas de vectores virales que incluyen sistemas retrovirales (véase, por ejemplo, Lawrie y Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)); vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Bett et al., J. Virol. 67, 5911 (1993)); vectores de virus adenoasociados (véase, por ejemplo, Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)), vectores virales de la familia de la viruela que incluyen virus de la variolovacuna y los virus de la viruela aviar, vectores virales del genero de los alfa-virus tales como aquellos derivados del virus de Sindbis y del bosque de Semliki (véase, por ejemplo, Dubensky et al., J. Virol. 70, 508-519 (1996)), virus de la encefalitis equina venezolana (véase el documento US 5.643.576) y rabdovirus, tales como virus de la estomatitis vesicular (véase el documento WO 96/34625) y virus del papiloma (Ohe et al., Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo et al., documento WO 94/12629 y Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

El ADN que codifica un inmunogén, o un vector que contiene el mismo, puede encapsidarse en liposomas. Lípidos adecuados y análogos relacionados se describen por los documento US 5.208.036, US 5.264.618, US 5.279.833 y US 5.283.185. Los vectores y el ADN que codifica un inmunogén también pueden adsorberse a o asociarse a vehículos particulados, ejemplos de los cuales incluyen polímeros de poli(metacrilato de metilo) y polilactidas y poli(lactida-co-glicolidas), (véase, por ejemplo, McGee et al., J. Micro Encap. 1996).

Pueden administrarse vectores de terapia génica o polipéptidos desnudos *in vivo* por administración a un paciente individual, normalmente por administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o administración tópica (véase, por ejemplo, el documento US 5.399.346). Tales vectores pueden incluir adicionalmente agentes facilitadores tales como bupivacina (véase, por ejemplo, el documento US 5.593.970). También puede administrarse ADN usando una pistola de genes. Véase Xiao & Brandsma, arriba. El ADN que codifica un inmunogén se precipita sobre la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles son acelerados con una onda de choque o expandiendo gas helio, y penetran en los tejidos a una profundidad de varias capas de células. Por ejemplo, es adecuado The Accel™ Gene Delivery Device fabricado por Agracetus, Inc. Middleton WI. Alternativamente, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel en la corriente sanguínea simplemente goteando el ADN sobre la piel con irritación química o mecánica (véase el documento WO 95/05853).

En otra variación, vectores que codifican inmunógenos pueden administrarse a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea y biopsia de tejido) o citoblastos hematopoyéticos de donante universal, seguido de reimplantación de las células en un paciente, normalmente después de la selección de células que han incorporado el vector.

III. AGENTES PARA INDUCIR RESPUESTA INMUNOGÉNICA CONTRA Aβ

Aβ, también conocido como péptido amiloide β, o péptido A4 (véase el documento US 4.666.829; Glenner & Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 1131 (1984)), es un péptido de 39-43 aminoácidos, que es el principal componente de las placas características de la enfermedad de Alzheimer. Aβ se genera por procesamiento de una proteína APP más grande por dos enzimas, llamadas secretasas β y γ (véase Hardy, TINS 20, 154 (1997)).

Mutaciones conocidas en APP asociadas a enfermedad de Alzheimer se producen próximas al sitio de secretasa β o γ, o dentro de Aβ. Por ejemplo, la posición 717 está próxima al sitio de escisión por γ-secretasa de APP en su procesamiento a Aβ, y las posiciones 670/671 están próximas al sitio de escisión de β-secretasa. Se cree que las mutaciones producen EA interaccionando con las reacciones de escisión por las que Aβ se forma de manera que aumente la cantidad de la forma de aminoácidos 42/43 de Aβ generada.

Aβ tiene la propiedad inusual de que puede fijar y activar tanto las cascadas del completo clásicas como alternativas. En particular, se une a C1q y por último lugar a C3bi. Esta asociación facilita la unión a macrófagos, conduciendo a la activación de linfocitos B. Además, C3bi se degrada adicionalmente y entonces se une a CR2 sobre linfocitos B de una manera dependiente de linfocitos T que conduce a un aumento de 10.000 en la activación de estas células. Este mecanismo hace que Aβ genere una respuesta inmunitaria en exceso de aquella de otros antígenos.

Aβ tiene varias formas que se producen naturalmente. Las formas humanas de Aβ se denominan Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 y Aβ43. Las secuencias de estos péptidos y su relación con el precursor de APP se ilustran por la Fig. 1 de Hardy et al., TINS 20, 155-158 (1997). Por ejemplo, Aβ42 tiene la secuencia:

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT (SEC ID Nº: 33)

Aβ41, Aβ40 y Aβ39 se diferencian de Aβ42 por la omisión de Ala, Ala-Ile y Ala-Ile-Val, respectivamente, del extremo C. Aβ43 se diferencia de Aβ42 por la presencia de un residuo de Thr en el extremo C.

Agentes análogos a aquellos descritos anteriormente para alfa-SN se han descrito previamente para Aβ (véanse los documentos WO 98/25386 y WO 00/72880). Estos agentes incluyen Aβ y fragmentos activos del mismo, conjugados de Aβ, y conjugados de fragmentos activos de Aβ, anticuerpos para Aβ y fragmentos activos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos de ratón, humanizados, humanos y quiméricos), y ácidos nucleicos que codifican cadenas de anticuerpos. Se prefieren fragmentos activos de la mitad del extremo N de Aβ. Fragmentos inmunogénicos preferidos incluyen Aβ1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 3-7, 1-3 y 1-4. La designación Aβ1-5, por ejemplo, indica un fragmento que incluye los residuos 1-5 de Aβ y que carece de otros residuos de Aβ. Son particularmente preferidos fragmentos que empiezan en los residuos 1-3 de Aβ y que terminan en los residuos 7-11 de Aβ.

Las divulgaciones en el presente documento que se refiere a agentes que inducen una respuesta inmunitaria activa, agentes para inducir una respuesta inmunitaria pasiva, conjugados y ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos (véanse las Secciones II. 1, 2, 3 y 4, anteriormente) se aplican, cambiando lo que haya que cambiar, al uso de Aβ y fragmentos del mismo. Las divulgaciones en el presente documento que se refieren a agentes que inducen una respuesta inmunitaria activa, agentes para inducir una respuesta inmunitaria pasiva, conjugados y ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos (véanse las Secciones II. 1, 2, 3 y 4, anteriormente) se aplican, cambiando lo que haya que cambiar, al uso de Aβ y fragmentos del mismo. Las divulgaciones en el presente documento que se refieren a pacientes aceptados para el tratamiento, y pautas de tratamiento (véanse las Secciones IV y V, más adelante) se aplican, cambiando lo que haya que cambiar, al uso de Aβ y fragmentos del mismo.

Aβ desagregado o fragmentos del mismo significa unidades de péptidos monoméricos. Aβ desagregado o fragmentos del mismo son generalmente solubles, y pueden auto-agregarse para formar oligómeros solubles. Los oligómeros de Aβ y fragmentos de los mismos son normalmente solubles y existen predominantemente como hélices alfa o bobinas al azar. Aβ agregado o fragmentos del mismo significa oligómeros de alfa-SN o fragmentos de la misma que se han asociado en ensamblajes de hoja beta insolubles. Aβ agregado o fragmentos del mismo también significa polímeros fibrilares. Las fibrillas son normalmente insolubles. Algunos anticuerpos se unen tanto a Aβ soluble como a fragmentos del mismo o Aβ agregado o fragmentos del mismo. Algunos anticuerpos se unen tanto a Aβ soluble como a fragmentos del mismo y Aβ agregado o fragmentos del mismo.

Algunos ejemplos de conjugados incluyen:

AN90549 (Aβ1-7-Toxoide tetánico 830-844 en una configuración de MAP4): (SEC ID Nº: 34)
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL

AN90550 (Aβ 1-7-Toxoide tetánico 947-967 en una configuración de MAP4):
DAEFRHD-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEC ID Nº: 35)

AN90542 (Aβ 1-7-Toxoide tetánico 830-844 + 947-967 en una configuración lineal):
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEC ID Nº: 36)

AN90576: (Aβ3-9)-Toxoide tetánico 830-844 en una configuración de MAP4):
EFRHDSG-QYIKANSKFIGITEL (SEC ID Nº: 37)

El péptido PADRE (todos en configuraciones lineales), en el que X es preferentemente ciclohexilalanina, tirosina o fenilalanina, siendo la ciclohexilalanina la más preferida:

AN90562 (PADRE-Aβ1-7):

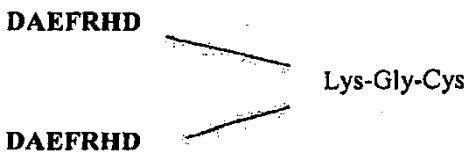
AKXVAAWTLAAA-**DAEFRHD** (SEC ID Nº: 38)

AN90543 (3 PADRE-Aβ1-7):

DAEFRHD-**DAEFRHD-DAEFRHD**-AKXVAAWTLKAAA (SEC ID Nº: 39)

Otros ejemplos de proteínas de fusión (epítopo inmunogénico de Aβ en negrita) incluyen:

AKXVAAWTLKAAA-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (SEC ID Nº: 40)
DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEC ID Nº: 41)
DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEC ID Nº: 42)
FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEC ID Nº: 43)
EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEC ID Nº: 44)
PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (SEC ID Nº: 45)
DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-DAEFRHD (SEC ID Nº: 46)
DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEC ID Nº: 47)
DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEC ID Nº: 48)
DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNVQYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEC ID Nº: 49)
DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELNNFTVSFWLR VPKVSASHLE (SEC ID Nº: 50)
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEC ID Nº: 51)
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD (SEC ID Nº: 52)
DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEC ID Nº: 53) en una resina de 2 ramas.



Anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítopo dentro de los residuos 1-10 de Aβ (designándose 1 el primer residuo del extremo N de Aβ natural). Algunos anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítopo dentro de los aminoácidos 1-5, y algunos a un epítopo dentro de 5-10. Algunos anticuerpos preferidos se unen a epítopos dentro de los aminoácidos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 ó 3-7. Algunos anticuerpos preferidos se unen a un epítopo que empieza en los residuos 1-3 y que termina en los residuos 7-11 de Aβ. Otros anticuerpos incluyen aquellos que se unen a epítopos con los residuos 13-280 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 266). Anticuerpos preferidos tienen isotipo IgG1 humana.

IV. CRIBADO DE ANTICUERPOS PARA LA ELIMINACIÓN DE ACTIVIDAD

La divulgación proporciona métodos de cribado de un anticuerpo para actividad en la eliminación de un cuerpo de Lewy o cualquier otro antígeno, o entidad biológica asociada, para el que se desea actividad de eliminación. Para cribar para actividad contra un cuerpo de Lewy, una muestra de tejido de un cerebro de un paciente con EP o un modelo animal que tiene patología de Parkinson característica se pone en contacto con células fagocíticas que llevan un receptor de Fc, tal como células de la microglía, y el anticuerpo en ensayo en un medio *in vitro*. Las células fagocíticas pueden ser un cultivo primario o una línea celular, tal como BV-2, C8-B4 o THP-1. En algunos métodos, los componentes se combinan sobre un portaobjetos de microscopio para facilitar la monitorización microscópica. En algunos métodos, se realizan múltiples reacciones en paralelo en los pocillos de una placa de microtítulo. En un formato tal, un portaobjetos de microscopio en miniatura separado puede montarse en los pocillos separados, o un formato de detección no microscópico, tal como detección por ELISA de alfa-SN. Preferentemente, se hace una serie de mediciones de la cantidad de cuerpo de Lewy en la mezcla de reacción *in vitro*, a partir de un valor del nivel inicial antes de que avance la reacción, y uno o más valores de prueba durante la reacción. El antígeno puede detectarse por tinción, por ejemplo, con un anticuerpo fluorescentemente marcado para alfa-SN u otros componentes de CL. El anticuerpo usado para la tinción puede o puede no ser el mismo que el anticuerpo que se prueba para actividad de eliminación. Una reducción con respecto al nivel inicial durante la reacción de los CL indica que el anticuerpo en ensayo tiene actividad de eliminación. Es probable que tales anticuerpos sean útiles en prevenir o tratar EP y otras ECL.

Pueden usarse métodos análogos para cribar anticuerpos para actividad en la eliminación de otros tipos de entidades biológicas. El ensayo puede usarse para detectar actividad de eliminación contra prácticamente cualquier tipo de entidad biológica. Normalmente, la entidad biológica tiene alguna función en enfermedad humana o animal. La entidad biológica puede proporcionarse como una muestra de tejido o en forma aislada. Si se proporciona como una muestra de tejido, la muestra de tejido está preferentemente sin fijar para permitir el acceso rápido a componentes de la muestra de tejido y para evitar perturbar la conformación de los componentes fortuitos al fijado. Ejemplos de muestras de tejido que pueden probarse en este ensayo incluyen tejido canceroso, tejido precanceroso, tejido que contiene crecimientos benignos tales como verrugas o lunares, tejido infectado con microorganismos patógenos, tejido infiltrado con células inflamatorias, tejido que lleva matrices patológicas entre células (por ejemplo, pericarditis fibrinosa), tejido que lleva antígenos aberrantes y tejido cicatricial. Ejemplos de entidades biológicas aisladas que pueden usarse incluyen alfa-SN, antígenos virales o virus, proteoglicanos, antígenos de otros microorganismos patógenos, antígenos de tumor y moléculas de adhesión. Tales antígenos pueden obtenerse a partir de fuentes naturales, expresión recombinante o síntesis química, entre otros medios. La muestra de tejido o entidad biológica aislada se pone en contacto con células fagocíticas que llevan receptores de Fc, tales como monocitos o células de la microglía, y un anticuerpo que va a probarse en un medio. El anticuerpo puede dirigirse a la entidad biológica en ensayo o a un antígeno asociado a la entidad. En la última situación, el objetivo es probar si la entidad biológica es indirectamente fagocitada con el antígeno. Normalmente, aunque no necesariamente, el anticuerpo y la entidad biológica (algunas veces con un antígeno asociado) se ponen en contacto entre sí antes de añadir las células fagocíticas. Entonces se monitoriza la concentración de la entidad biológica y/o el antígeno asociado, si está presente, que queda en el medio. Una reducción en la cantidad o concentración de antígeno o la entidad biológica asociada en el medio indica que el anticuerpo tiene una respuesta de eliminación contra el antígeno y/o entidad biológica asociada conjuntamente a las células fagocíticas.

Los anticuerpos u otros agentes también pueden cribarse para actividad en la eliminación de los cuerpos de Lewy usando el ensayo *in vitro* descrito en el Ejemplo II. Las células neuronales transfectadas con un vector de expresión que expresa sinucleína forman inclusiones de sinucleína que pueden visualizarse microscópicamente. La actividad de un anticuerpo u otro agente en la eliminación de tales inclusiones puede determinarse comparando el aspecto o nivel de sinucleína en células transfectadas tratadas con el agente con el aspecto o nivel de sinucleína en células de control no tratadas con el agente. Una reducción en el tamaño o intensidad de inclusiones de sinucleína o una reducción en el nivel de sinucleína señaliza la actividad en la eliminación de sinucleína. La actividad puede monitorizarse tanto visualizando inclusiones de sinucleína microscópicamente como ejecutando extractos celulares sobre un gel y visualizando una banda de sinucleína. Como se indica en el Ejemplo 1, Sección 2, el cambio en el nivel de sinucleína es el más marcado si los extractos se fraccionan en fracciones citosólicas y de membrana, y se analiza la fracción de membrana.

También pueden cribarse anticuerpos u otros agentes para actividad en la eliminación de los cuerpos de Lewy usando el ensayo *in vivo* descrito en el Ejemplo IX. Brevemente, un anticuerpo de prueba se inyecta en la neocorteza de ratones transgénicos que expresan en exceso α-sinucleína humana y tienen agregados de α-sinucleína intraneuronales. En un enfoque, los animales usados son ratones transgénicos heterocigóticos de 4 a 8 meses de edad que expresan en exceso α-sinucleína no mutante humana en el cerebro bajo el control transcripcional del promotor de PDGF (véase Masliah, 2000, Science 287:1265-69). El anticuerpo de prueba y los controles (por ejemplo, anticuerpos de control irrelevantes del mismo isotipo) se disuelven en una disolución adecuada (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato estéril) para inyección en ratones. Para cada ratón, 2 µl de una disolución de anticuerpo 2 mg/ml se inyectan estereotácticamente bajo anestesia en las capas profundas de la neocorteza parietal del hemisferio derecho del cerebro (lado ipsolateral). Los hemisferios izquierdos (lado contralateral) sirven de control del nivel inicial para cada ratón. Los sitios de inyección se suturan y los ratones se monitorizan hasta que se recuperan de la anestesia. Dos semanas después de la inyección, los ratones se sacrifican, sus cerebros se extraen y se fijan en 4 % de paraformaldehído durante 48 h, y se cortan coronalmente a 40 µm de espesor. Las secciones alrededor del sitio de inyección se tiñen con un anticuerpo para α-sinucleína (por ejemplo, ELADW-47, que reconoce los aminoácidos de α-sinucleína 115-122). Para cada sección, se cuentan los agregados de α-sinucleína intraneuronales en 4 campos microscópicos (objetivo 20x) alrededor del sitio de inyección en el hemisferio ipsolateral, y en 4 campos correspondientes a campos en el hemisferio de control contralateral. Para cada animal, se suman las cifras de agregados de α-sinucleína para dos secciones y la diferencia entre la cifra de agregados de α-sinucleína total entre los dos hemisferios es para determinar el efecto del anticuerpo de prueba sobre la eliminación de agregados para cada ratón individual. Una reducción en la cifra de agregados de α-sinucleína total en el hemisferio tratado es indicativa de que los anticuerpos u otro agente tienen actividad en la eliminación de cuerpos de Lewy. Preferentemente, se observa una reducción de al menos el 10 %. Más preferentemente, se observa una reducción de al menos el 20 %, al menos el 40 %, al menos el 60 % o al menos el 80 %.

V. PACIENTES ACEPTADOS PARA PAUTAS DE TRATAMIENTO CON COMPONENTE ANTI-CUERPOS DE LEWY

Los pacientes aceptados para tratamiento incluyen individuos en riesgo de una enfermedad sinucleinopática, pero que no muestran síntomas, además de pacientes que presentemente muestran síntomas. Los

pacientes aceptados para tratamiento también incluyen individuos en riesgo de enfermedad de una ECL, pero que no muestran síntomas, además de pacientes que presentemente muestran síntomas. Tales enfermedades incluyen enfermedad de Parkinson (incluyendo enfermedad de Parkinson idiopática), DCL, EDCL, VCLEA, fallo autonómico puro, disfagia de cuerpos de Lewy, ECL casual, ECL heredada (por ejemplo, mutaciones del gen alfa-SN, PARK3 y PARK4) y atrofia multisistémica (por ejemplo, atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome de Shy-Drager). Por tanto, los presentes métodos pueden administrarse profilácticamente a individuos que tienen un riesgo genético conocido de una ECL. Tales individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han sufrido esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Marcadores genéticos de riesgo hacia EP incluyen mutaciones en la sinucleína o parkina, genes UCHLI y CYP2D6; particularmente mutaciones en la posición 53 del gen de sinucleína. Los individuos que presentemente padecen enfermedad de Parkinson pueden reconocerse a partir de sus manifestaciones clínicas que incluyen temblor en reposo, rigidez muscular, bradiquinesia e inestabilidad postural.

En algunos métodos, está libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de cualquier enfermedad amiloidogénica y padece al menos una enfermedad sinucleinopática. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de cualquier enfermedad caracterizada por depósitos de amiloide extracelulares. En algunos métodos, el paciente está libre de enfermedades caracterizadas por depósitos de amiloide de péptido Aβ. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de enfermedad de Alzheimer. En algunos métodos, el paciente está libre de síntomas clínicos, signos y/o factores de riesgo de enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo, deterioro cognitivo leve y síndrome de Down. En algunos métodos, el paciente tiene enfermedad de Alzheimer concurrente y una enfermedad caracterizada por cuerpos de Lewy. En algunos métodos, el paciente tiene enfermedad de Alzheimer concurrente y una enfermedad caracterizada por la acumulación de sinucleína. En algunos métodos, el paciente tiene enfermedad de Alzheimer y de Parkinson concurrente.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20 ó 30). Normalmente, sin embargo, no es necesario empezar el tratamiento hasta que un paciente llegue a los 40, 50, 60 ó 70. El tratamiento normalmente implica múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede monitorizarse ensayando anticuerpo, o respuestas de linfocitos T o linfocitos B activados, al agente terapéutico (por ejemplo, el péptido alfa-SN o Aβ, o ambos) con el tiempo. Si la respuesta fracasa, se indica una dosificación de refuerzo.

Opcionalmente, la presencia o ausencia de síntomas, signos o factores de riesgo de una enfermedad se determina antes de empezar el tratamiento.

VI. PACIENTES ACEPTADOS PARA PAUTAS DE TRATAMIENTO CON COMPONENTE ANTI-AMILOIDE

Los pacientes aceptados para tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad pero que no muestran síntomas, además de pacientes que presentemente muestran síntomas de amiloidosis. En el caso de enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquiera está en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si vive suficientemente. Por tanto, los presentes métodos pueden administrarse profilácticamente a la población general sin la necesidad de ninguna evaluación del riesgo del paciente sujeto. Los presentes métodos son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer o cualquiera de las otras enfermedades de amiloide hereditarias. Tales individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han sufrido esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 denominadas las mutaciones de Hardy y suecas, respectivamente (véase Hardy, TINS, arriba). Otros marcadores de riesgo son mutaciones en los genes presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, historia familiar de EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que presentemente padecen enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse de demencia característica, además de la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, están disponibles varias pruebas de diagnóstico para identificar individuos que tienen EA. Estas incluyen medición de niveles de CSF tau y Aβ42. Niveles elevados de tau y disminuidos de Aβ42 significan la presencia de EA. También pueden diagnosticarse individuos que padecen enfermedad de Alzheimer por criterios de MMSE o ADRDA como se trata en la sección de ejemplos. En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Normalmente, sin embargo, no es necesario empezar el tratamiento hasta que un paciente llegue a los 40, 50, 60 ó 70. El tratamiento normalmente implica múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede monitorizarse ensayando anticuerpo, o respuestas de linfocitos T o linfocitos B activados, al agente terapéutico (por ejemplo, NAC) con el tiempo, junto con las líneas descritas en VII Métodos de monitorización y diagnóstico, más adelante. Si la respuesta fracasa, se indica una dosificación de refuerzo.

VII. PAUTAS DE TRATAMIENTO

En general, las pautas de tratamiento implican administrar un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica a alfa-SN y/o un agente eficaz para inducir una respuesta inmunogénica a Aβ a un paciente. En

aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos se administran a un paciente susceptible a, o de otro modo en riesgo de, una ECL u otra enfermedad sinucleopática en una pauta que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición o medicamento suficiente para eliminar o reducir el riesgo, reducir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, que incluye síntomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicaciones se administran a un paciente que se sospecha que, o que ya padece, una enfermedad tal en una pauta que comprende una cantidad y frecuencia de administración de la composición suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (fisiológicos, bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), que incluyen sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, en algunos métodos, el tratamiento afecta la eliminación al menos parcial de los cuerpos de Lewy, desagregación al menos parcial de los cuerpos de Lewy y/o reduce los niveles de oligómeros de alfa-sinucleína en sinapsis. Una cantidad adecuada para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz. Una combinación de cantidad y frecuencia de dosificación adecuada para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una pauta terapéuticamente o profilácticamente eficaz. En tanto pautas profilácticas como terapéuticas, los agentes se administran normalmente en varias dosificaciones hasta que se haya alcanzado una respuesta inmunitaria suficiente. Normalmente, la respuesta inmunitaria se monitoriza y se administran dosificaciones repetidas si la respuesta inmunitaria empieza a disminuir.

En algunos métodos, la administración de un agente produce la reducción de niveles intracelulares de sinucleína agregada. En algunos métodos, la administración de un agente produce mejora en un síntoma clínico de una ECL, tal como la función motora en el caso de enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, se monitoriza la reducción en niveles intracelulares de sinucleína agregada o la mejora en un síntoma clínico de enfermedad a intervalos después de la administración de un agente.

Dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento necesitan valorarse para optimizar la seguridad y eficacia. La cantidad de inmunogén depende de si el adyuvante también se administra, requiriéndose mayores dosificaciones en ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunogén para administración varía algunas veces de 1-500 µg por paciente y más normalmente de 5-500 µg por inyección para administración humana. Ocasionalmente, se usa una dosis mayor de 1-2 mg por inyección. Normalmente se usan aproximadamente 10, 20, 50 ó 100 µg para cada inyección humana. La masa de inmunogén también depende de la relación másica de epítopo inmunogénico dentro del inmunogén con respecto a la masa de inmunogén en conjunto. Normalmente, se usan 10^{-3} a 10^{-5} micromoles de epítopo inmunogénico por microgramo de inmunogén. El momento preciso de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, a una vez al año, a una vez a la década. En cualquier día dado que se administre una dosificación de inmunogén, la dosificación es mayor de 1 µg/paciente y normalmente superior a 10 µg/paciente si también se administra adyuvante, y superior a 10 µg/paciente y normalmente superior a 100 µg/paciente en ausencia de adyuvante. Una pauta típica consiste en una inmunización, seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos de tiempo, tales como intervalos de 6 semanas. Otra pauta consiste en una inmunización, seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Otro pauta implica una inyección cada dos meses durante toda la vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser irregulares como se indica monitorizando la respuesta inmunitaria.

Para inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosificación oscila de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg o, en otras palabras, 70 mg o 700 mg o dentro del intervalo de 70-700 mg, respectivamente, para un paciente de 70 kg. Una pauta de tratamiento a modo de ejemplo implica la administración de una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado entra dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra normalmente en múltiples ocasiones. Intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles en sangre de anticuerpo para alfa-SN en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración en plasma de anticuerpo de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos 25 - 300 µg/ml. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguido de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación

relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestra mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de aquí, al paciente puede administrársele una pauta profiláctica.

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

Los agentes para inducir una respuesta inmunitaria pueden administrarse por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intrarteriales, intracraneales, intratecales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración más típica de un agente inmunogénico es subcutánea, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza lo más normalmente en los músculos del brazo o la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular en el que se han acumulado los depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. Se prefieren inyección intramuscular o infusión intravenosa para administración del anticuerpo. En algunos métodos, anticuerpos terapéuticos particulares se inyectan directamente en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos se administran como una composición de liberación sostenida o dispositivo, tal como un dispositivo Medipad™.

Como se observa anteriormente, los agentes que inducen una respuesta inmunogénica contra alfa-SN y Aβ pueden administrarse respectivamente en combinación. Los agentes pueden combinarse en una única preparación o kit para uso simultáneo, secuencial o separado. Los agentes pueden ocupar viales separados en la preparación o kit o pueden combinarse en un único vial. Estos agentes pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de ECL. En el caso de enfermedad de Parkinson y síndrome de Down, en los que los CL se producen en el cerebro, los agentes de la divulgación también pueden administrarse conjuntamente con otros agentes que aumentan el paso de los agentes a través de la barrera hematoencefálica.

Agentes inmunogénicos de la divulgación, tales como péptidos, se administran algunas veces en combinación con un adyuvante. Puede usarse una variedad de adyuvantes en combinación con un péptido, tal como alfa-SN, para provocar una respuesta inmunitaria. Adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunogén sin causar cambios conformacionales en el inmunogén que afectan la forma cualitativa de la respuesta. Adyuvantes preferidos incluyen hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (MPL™) (véase el documento GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un glucósido triterpénico o saponina aislada de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina encontrado en América del Sur (véase Kensil et al., en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente de EE.UU. nº 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con inmunoestimulantes, tales como monofosforil lípido A (véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)), polímeros de Pluronic y micobacterias muertas. Otro adyuvante es CpG (documento WO 98/40100). Alternativamente, puede acoplarse alfa-SN o Aβ a un adyuvante. Sin embargo, tal acoplamiento no debe cambiar sustancialmente la conformación de alfa-SN de manera que se afecte la naturaleza de la respuesta inmunitaria a la misma. Los adyuvantes pueden administrarse como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse por separado, antes, simultáneamente con, o después de la administración del agente terapéutico.

Una clase preferida de adyuvantes es sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de alumbre, fosfato de alumbre, sulfato de alumbre. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilisina. Otra clase de adyuvantes es formulaciones de emulsión de aceite en agua. Tales adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como muramilpéptidos (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida (DTP-DPP) theramideTM), u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837), que contiene 5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80 y 0,5 % de Span 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de Tween 80, 5 % de polímero L121 bloqueado con Pluronic y thr-MDP, tanto microfluidizado en una emulsión submicrométrica como agitado con vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y (c) sistema de adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™).

Otra clase de adyuvantes preferidos es adyuvantes de saponina, tales como Stimulon™ (QS-21, Aquila,

Framingham, MA) o partículas generadas a partir del mismo tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen RC-529, GM-CSF y adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL13 y IL-15), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF). Otra clase de adyuvantes es análogos de glicolípidos que incluyen N-glicosilamidas, N-glicosilureas y N-glicosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el residuo de azúcar con un aminoácido, como inmunomoduladores o adyuvantes (véase la patente de EE.UU. nº 4.855.283). También pueden usarse proteínas de choque térmico, por ejemplo, HSP70 y HSP90, como adyuvantes.

Un adyuvante puede administrarse con un inmunogén como una única composición, o puede administrarse antes, simultáneamente con o después de la administración del inmunogén. El inmunogén y adyuvante pueden envasarse y suministrarse en el mismo vial o pueden envasarse en viales separados y mezclarse antes de uso. El inmunogén y el adyuvante normalmente están envasados con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica prevista. Si el inmunogén y adyuvante se envasan por separado, el envase normalmente incluye instrucciones para mezclar antes de uso. La elección de un adyuvante y/o vehículo depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación, la eficacia del adyuvante para las especies que se vacunan, y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido autorizado o es autorizable para administración humana por organismos reguladores apropiados. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para administración humana. Se prefieren alumbre, MPL y QS-21. Opcionalmente, pueden usarse simultáneamente dos o más adyuvantes diferentes. Combinaciones preferidas incluyen alumbre con MPL, alumbre con QS-21, MPL con QS-21, MPL o RC-529 con GM-CSF, y alumbre, QS-21 y MPL juntos. Por tanto, el adyuvante incompleto de Freund puede usarse (Chang et al., Advanced Drug Delivery Reviews 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS-21, y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

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

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

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

Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o

micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para efecto adyuvante potenciado, como se trata anteriormente (véase Langer, Science 249, 1527 (1990) y Hanes Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997). Los agentes de la presente divulgación pueden administrarse en forma de una inyección de liberación prolongada o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsada del principio activo. Las composiciones pueden formularse en forma de dosificación unitaria (es decir, la formulación contiene suficiente del principio activo para una dosificación a un paciente).

Formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

Para supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferentemente 1 %-2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10 %-95 % de principio activo, preferentemente 25 %-70 %.

La administración tópica puede producir administración transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse por la co-administración del agente con toxina del cólera o derivados desintoxicados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn et al., Nature 391, 851 (1998)). La co-administración puede lograrse usando los componentes como una mezcla o como moléculas enlazadas obtenidas por reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

Alternativamente, la administración transdérmica puede lograrse usando una trayectoria de la piel o usando transferosomas (Paul et al., Eur. J. Immunol. 25, 3521-24 (1995); Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15 (1998)).

VIII. MÉTODOS DE MONITORIZACIÓN Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

La divulgación proporciona métodos de detección de una respuesta inmunitaria contra el péptido alfa-SN y/o el péptido Aβ en un paciente que padece o susceptible a una ECL. Los métodos son particularmente útiles para monitorizar una evolución del tratamiento que se administra a un paciente. Los métodos pueden usarse para monitorizar tanto tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. Los métodos son útiles para monitorizar tanto inmunización activa (por ejemplo, anticuerpo producido en respuesta a administración de inmunogén) como inmunización pasiva (por ejemplo, medición del nivel de anticuerpo administrado).

1. Inmunización activa

Algunos métodos conllevan determinar un valor de referencia de una respuesta inmunitaria en un paciente antes administrar una dosificación de agente, y comparar éste con un valor para la respuesta inmunitaria después del tratamiento. Un aumento significativo (es decir, superior al margen típico del error experimental en mediciones repetidas de la misma muestra, expresado como una desviación estándar de la media de tales mediciones) en el valor de la respuesta señaliza un resultado del tratamiento positivo (es decir, que la administración del agente ha logrado o aumentado una respuesta inmunitaria). Si el valor para la respuesta inmunitaria no cambia significativamente, o disminuye, se indica un resultado del tratamiento negativo. En general, se espera que los pacientes que experimentan un ciclo inicial de tratamiento con un agente inmunogénico muestren un aumento en la respuesta inmunitaria con dosificaciones sucesivas, que con el tiempo alcanza una meseta. La administración de agente continúa generalmente mientras que está aumentando la respuesta inmunitaria. El logro de la meseta es un indicador de que el tratamiento administrado puede interrumpirse o reducirse en dosificación o frecuencia.

En otros métodos, un valor de control (es decir, una media y desviación estándar) de una respuesta inmunitaria se determina para una población de control. Normalmente, los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo. Entonces, los valores medidos de la respuesta inmunitaria en un paciente después de administrar un agente terapéutico se comparan con el valor de control. Un aumento significativo con respecto al valor de control (por ejemplo, superior a una desviación estándar de la media) señaliza un resultado del tratamiento positivo. Una falta de aumento significativo o una disminución señaliza un resultado del tratamiento negativo. La administración de agente continúa generalmente mientras que la respuesta inmunitaria está aumentando con respecto al valor de control. Como antes, la obtención de una meseta con respecto a los valores de control es un indicador de que la administración de tratamiento puede interrumpirse o reducirse en dosificación o frecuencia.

En otros métodos, un valor de control de la respuesta inmunitaria (por ejemplo, una media y desviación estándar) se determina a partir de una población de control de individuos que se han sometido a tratamiento con un agente terapéutico y cuyas respuestas inmunitarias han alcanzado una meseta en respuesta al tratamiento. Los

valores medidos de la respuesta inmunitaria en un paciente se comparan con el valor de control. Si el nivel medido en un paciente no es significativamente diferente (por ejemplo, más de una desviación estándar) del valor de control, el tratamiento puede interrumpirse. Si el nivel en un paciente está significativamente por debajo del valor de control, se garantiza la administración continuada del agente. Si el nivel en el paciente continúa por debajo del valor de control, entonces puede indicarse un cambio en la pauta de tratamiento, por ejemplo, uso de un adyuvante diferente.

En otros métodos, un paciente que no está presentemente recibiendo tratamiento, pero ha experimentado un ciclo previo de tratamiento, se monitoriza para respuesta inmunitaria para determinar si se requiere una reanudación del tratamiento. El valor medido de la respuesta inmunitaria en el paciente puede compararse con un valor de respuesta inmunitaria previamente logrado en el paciente después de un ciclo previo de tratamiento. Una disminución significativa con respecto a la medición previa (es decir, superior a un margen típico de error en mediciones repetidas de la misma muestra) es una indicación de que puede reanudarse el tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de pacientes después de someterse a un ciclo de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede compararse con un valor de control en poblaciones de pacientes profilácticamente tratados que siguen libres de síntomas de enfermedad, o poblaciones de pacientes terapéuticamente tratados que muestran mejora de las características de enfermedad. En todos estos casos, una disminución significativa con respecto al nivel de control (es decir, superior a una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en un paciente.

La muestra de tejido para análisis normalmente es sangre, plasma, suero, líquido mucoso o cefalorraquídeo del paciente. La muestra se analiza para la indicación de una respuesta inmunitaria a cualquier forma de alfa-SN, normalmente NAC, o Aβ. La respuesta inmunitaria puede determinarse a partir de la presencia de, por ejemplo, anticuerpos o linfocitos T que se unen específicamente a alfa-SN o AB. Métodos de ELISA de detección de anticuerpos específicos para alfa-SN se describen en la sección de ejemplos. Métodos de detección de linfocitos T reactivos se han descrito anteriormente (véase Definiciones). En algunos métodos, la respuesta inmunitaria se determina usando un ensayo de eliminación, tal como se describe en la Sección III anterior. En tales métodos, un tejido o muestra de sangre de un paciente que se prueba se pone en contacto con CL (por ejemplo, de un ratón transgénico para sinucleína/hAPP) y células fagocíticas que llevan receptores de Fc. Entonces se monitoriza la posterior eliminación de los CL. La existencia y grado de la eliminación de la respuesta proporciona una indicación de la existencia y nivel de anticuerpos eficaces para eliminar alfa-SN en la muestra de tejido del paciente en ensayo.

2. Inmunización pasiva

En general, los procedimientos para monitorizar la inmunización pasiva son similares a aquellos para monitorizar la inmunización activa descrita anteriormente. Sin embargo, el perfil de anticuerpos tras la inmunización pasiva normalmente muestra un pico inmediato en la concentración de anticuerpo seguido de un decaimiento exponencial. Sin otra dosificación, el decaimiento se aproxima a los niveles de pretratamiento dentro de un periodo de días a meses dependiendo de la semivida del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la semivida de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

En algunos métodos, se hace una medición del nivel de referencia del anticuerpo para alfa-SN en el paciente antes de la administración, se hace una segunda medición pronto a partir de aquí para determinar el nivel pico de anticuerpo, y se hacen una o más mediciones adicionales a intervalos para monitorizar el decaimiento de los niveles de anticuerpo. Cuando el nivel de anticuerpo ha disminuido al nivel de referencia o un porcentaje predeterminado del pico menos el nivel inicial (por ejemplo, 50 %, 25 % o 10 %), se administra la administración de otra dosificación de anticuerpo. En algunos métodos, niveles pico o medidos posteriores menos el fondo se comparan con niveles de referencia previamente determinados para constituir una pauta beneficiosa de tratamiento profiláctico o terapéutico en otros pacientes. Si el nivel de anticuerpo medido es significativamente inferior a un nivel de referencia (por ejemplo, inferior a la media menos una desviación estándar del valor de referencia en la población de pacientes que se benefician del tratamiento), se indica la administración de una dosificación de anticuerpo adicional.

3. Kits de diagnóstico

La divulgación proporciona además kits de diagnóstico para realizar los métodos de diagnóstico descritos anteriormente. Normalmente, tales kits contienen un agente que se une específicamente a anticuerpos para alfa-SN. El kit también puede incluir una marca. Para la detección de anticuerpos para alfa-SN, la marca normalmente está en forma de anticuerpos antiidiotípicos marcados. Para la detección de anticuerpos, el agente puede suministrarse previamente unido a una fase sólida, tal como a los pocillos de una placa de microtítulo. Los kits también contienen normalmente etiquetado que proporciona indicaciones para el uso del kit. La etiqueta también puede incluir un diagrama u otra pauta de correspondencia que correlaciona los niveles de marca medida con niveles de anticuerpos para alfa-SN. El término etiqueta se refiere a cualquier material escrito o registrado que está unido a, o de otro modo acompaña a, un kit en cualquier momento durante su fabricación, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término etiqueta engloba prospectos y folletos de publicidad, materiales de embalaje, instrucciones, casetes de audio o

vídeo, discos de ordenador, además de texto impreso directamente sobre los kits.

La divulgación también proporciona kits de diagnóstico para realizar la obtención de imágenes *in vivo*. Tales kits normalmente contienen un anticuerpo que se une a un epítopo de alfa-SN, por ejemplo, dentro de NAC. Preferentemente, el anticuerpo se marca o se incluye un reactivo de marcado secundario en el kit. Preferentemente, el kit se marca con instrucciones para realizar un ensayo de obtención de imágenes *in vivo*.

En una realización, el anticuerpo está seleccionado de mAb 6H7, mAb 8A5, mAb 9E4, mAb 1H7 o mAb 11A5 o un fragmento de unión del mismo. Los anticuerpos anti-alfa sinucleína anteriormente mencionados también pueden usarse en ensayos como se describen en la publicación de patente de EE.UU. nº 2005196818.

IX. *OBTENCIÓN DE IMÁGENES IN VIVO*

La divulgación proporciona métodos de obtención de imágenes *in vivo* de CL en un paciente. Tales métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de EP, u otra enfermedad asociada a la presencia de CL en el cerebro, o susceptibilidad a los mismos. Por ejemplo, los métodos pueden usarse en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene CL, entonces es probable que el paciente padezca, por ejemplo, EP. Los métodos también pueden usarse en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos de amiloide anormales indica susceptibilidad a futura enfermedad sintomática. Los métodos también son útiles para monitorizar la progresión de la enfermedad y/o respuesta a tratamiento en pacientes que han sido previamente diagnosticados con enfermedad de Parkinson.

Los métodos funcionan administrando un reactivo, tal como un anticuerpo que se une a alfa-SN en el paciente y luego detectando el agente después de que se haya unido. Anticuerpos preferidos se unen a depósitos de alfa-SN en un paciente sin unirse al polipéptido NACP de longitud completa. Los anticuerpos que se unen a un epítopo de alfa-SN dentro de NAC son particularmente preferidos. Si se desea, la respuesta de eliminación puede evitarse usando fragmentos de anticuerpos que carecen de una región constante de longitud completa, tal como Fab. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir de tanto un reactivo de tratamiento como de diagnóstico. En general, los anticuerpos que se unen a epítopos del extremo N de alfa-SN no muestran señal tan fuerte como los anticuerpos que se unen a epítopos del extremo C, supuestamente debido a que los epítopos del extremo N son inaccesibles en CL (Spillantini et al PNAS, 1998). Por consiguiente, tales anticuerpos son menos preferidos.

Pueden administrarse reactivos de diagnóstico mediante inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro por inyección intracraneal o perforando un orificio a través del cráneo. La dosificación de reactivo debe estar dentro de los mismos intervalos que para los métodos de tratamiento. Normalmente, el reactivo se marca, aunque en algunos métodos, el reactivo primario con afinidad por alfa-SN está sin marcar y se usa un agente de marcado secundario para unirse al reactivo primario. La elección de marca depende de los medios de detección. Por ejemplo, una marca fluorescente es adecuada para detección óptica. El uso de marcas paramagnéticas es adecuado para detección tomográfica sin intervención quirúrgica. También pueden detectarse marcas radiactivas usando PET o SPECT.

El diagnóstico se realiza comparando el número, tamaño y/o intensidad de los loci marcados con valores del nivel inicial correspondientes. Los valores del nivel inicial pueden representar los niveles medios en una población de individuos sin enfermedad. Los valores del nivel inicial también pueden representar niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores del nivel inicial pueden determinarse en un paciente antes de empezar el tratamiento, y los valores medidos a partir de aquí se comparan con los valores del nivel inicial. Una disminución en los valores con respecto al nivel inicial señaliza una respuesta positiva al tratamiento.

EJEMPLOS

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

Se resuspendió alfa-SN humana recombinante de longitud completa a una concentración de 1 mg/ml en 1X solución salina tamponada con fosfato (PBS). Para cada inyección se usaron 50 µl de alfa-SN; dando una concentración final de 50 µg por inyección a la que se añadieron 150 µl de 1X PBS. Entonces, el adyuvante completo de Freund (CFA) se añadió 1:1 a tanto alfa-SN como PBS solo (control), se agitó con vórtex y se sonicó para resuspender completamente la emulsión. Para las inyecciones iniciales, ocho ratones de 4-7 meses de edad transgénicos individuales (tg) transgénicos para alfa-SN de la línea D (Masliah, et al. Science 287:1265-1269 (2000) recibieron inyecciones de alfa-SN humana en CFA y, como control, cuatro ratones tg para alfa-SN humana de la línea D recibieron inyecciones de PBS en CFA. Los ratones recibieron un total de 6 inyecciones. Se realizaron tres inyecciones a intervalos de dos semanas y luego 3 inyecciones a intervalos de un mes. Los animales se sacrificaron usando las pautas de los NIH para el tratamiento humano de animales 5 meses después del inicio del experimento. Después se recogieron muestras de sangre para la determinación de los títulos de anticuerpos, los cerebros se

fijaron por inmersión durante 4 días en 4 % de paraformaldehído en PBS. Los niveles de anticuerpos contra alfa-SN humana por ELISA se muestran en la Tabla 1. Los ratones tratados se dividen en dos grupos por título. El primer grupo desarrolló un título moderado de 2-8.000. El segundo grupo desarrolló un alto título de 12000-30000. No se encontró título en ratones de control. El análisis neuropatológico mostró que los ratones que produjeron altos títulos tuvieron una disminución marcada en el tamaño de inclusiones de sinucleína. Los ratones que produjeron títulos moderados mostraron un disminución más pequeña. La Fig. 2 (paneles a-d) muestra inclusiones de sinucleína en (a) un ratón no transgénico, (b) un ratón transgénico tratado con CFA solo, (c) un ratón transgénico inmunizado con alfa sinucleína y CFA que desarrolló un título moderado y (d) un ratón transgénico inmunizado con alfa sinucleína y CFA que desarrolló un mayor título. Las muestras se visualizaron por inmunotinción con un anticuerpo anti-alfa-SN humana. La Fig. 2 muestra inclusiones de sinucleína en el panel (b), pero no en el panel (a). En el panel (c), ratón tratado, títulos moderados, las inclusiones son de intensidad algo reducida. En el panel (d) las inclusiones son de intensidad sustancialmente reducida. Los paneles (e)-(h) muestran niveles de anti-IgG en los cerebros de los mismos cuatro ratones que los paneles (a) a (d), respectivamente. Puede verse que IgG está presente en los paneles (g) y a un mayor grado en el panel (h). Los datos muestran que los anticuerpos periféricamente administrados para alfa-SN cruzan la barrera hematoencefálica y llegan al cerebro. Los paneles (i) a (l) muestran tinción para GAP, un marcador de células de la astroglía, de nuevo para los mismos cuatro ratones que en las dos primeras filas de la figura. Puede observarse que los paneles (k) y (l) muestran tinción moderadamente elevada en comparación con (i) y (j). Estos datos muestran que la eliminación de depósitos de sinucleína va acompañada de una leve reacción de la astroglía y microglía.

Tabla 1

Grupo	Genotipo	n=	Edad en Sac	Tratamiento/Longitud	Títulos	Inclusiones Syn (+)/mm^2
I	Syn Tg	4	10-13 mo	a-syn+CFA 50ug/inj para 3mo sac'd 3mo más tarde	2000-8000	15-29
II	Syn Tg	4	10-13 mo	a-syn+CFA 50ug/inj para 3mo sac'd 3mo más tarde	12000-30000	10-22
III	Syn Tg	4	10-13 mo	PBS+CFA for 3mo sac'd 3mo más tarde	0	18-29

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

Se transfectaron célula neuronal GT1-7 (Hsue et al. Am. J. Pathol. 157:401-410 (2000)) con un vector de expresión pCR3.1-T (Invitrogen, Carlsbad, CA) que expresa alfa-SN murina y se comparó con células transfectadas con vector de expresión solo (Fig. 3, B y A, respectivamente). Las células transfectadas con vector solo (A) tienen un aspecto fibroblástico mientras que las células transfectadas con alfa-SN son redondeadas, con cuerpos de inclusión en la superficie celular visible mediante tanto microscopía óptica como de barrido confocal. Las células transfectadas se trataron entonces con suero preinmune de conejo (Fig. 3 C) o 67-10, un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad contra los residuos 131-140 del extremo C de alfa-SN murina (Iwai, et al., Neuron 14:467 (1995) (Fig. 3D). Puede observarse que los cuerpos de inclusión se tiñen menos fuertemente en el panel D que en el panel C, que indica que el anticuerpo contra alfa sinucleína fue eficaz en eliminar o prevenir el desarrollo de inclusiones. La Fig. 4 muestra un análisis en gel de fracciones particuladas y citosólicas de células GT1-7 transfectadas tratadas con el suero preinmune de conejo y el anticuerpo policlonal 67-10. Puede observarse que los niveles de sinucleína en la fracción citosólica permanecen ampliamente sin cambiar mediante el tratamiento con suero preinmune o anticuerpo para alfa-SN. Sin embargo, la banda de alfa-SN desaparece en la fracción de membrana de células GT1-7 tratadas con anticuerpo para alfa-SN. Estos datos indican que la actividad del anticuerpo para alfa sinucleína produce la eliminación de sinucleína asociada a la membrana celular.

Pueden usarse células GT1-7 transfectadas para cribar anticuerpos para actividad en la eliminación de inclusiones de sinucleína con detección tanto por análisis inmunohistoquímico, microscopía óptica como en la Fig. 3 como por análisis en gel como en la Fig. 4.

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

i. Inmunización de ratones tg para alfa-sinucleína humana

Para este estudio se usan ratones transgénicos (tg) para alfa-SN humana heterocigóticos (línea D) (Masliah et al., 2000, Science 286:1265-69) y controles no transgénicos (no tg). Los animales experimentales se dividen en 3 grupos. Para el grupo I, se prueban los efectos preventivos de la inmunización temprana inmunizando ratones durante 8 meses empezando a los 2 meses de edad. Para el grupo II, ratones adultos jóvenes se vacunan durante 8 meses empezando a la edad de 6 meses para determinar si la inmunización puede reducir la progresión de la enfermedad una vez se ha establecido la patología moderada. Para el grupo III, ratones mayores se inmunizan durante 4 meses empezando a la edad de 12 meses para determinar si la inmunización puede reducir la gravedad

de síntomas una vez se ha establecido la patología robusta. Para todos los grupos, los ratones se inmunizan con tanto alfa-SN humana recombinante más CFA como CFA solo y para cada experimento se usan 20 ratones tg y 10 no tg. De ellos, 10 ratones tg se inmunizan con alfa-SN humana + CFA y otros 10 tg con CFA solo. Similarmente, 5 ratones no tg se inmunizan con alfa-SN humana + CFA y los otros 5 con CFA solo. Brevemente, el protocolo de inmunización consiste en una inyección inicial con alfa-SN humana recombinante purificada (2 mg/ml) en CFA, seguido de una reinyección 1 mes después con alfa-SN humana en combinación con IFA. Entonces, los ratones se reinyectan con esta mezcla una vez al mes. En un pequeño subconjunto de ratones tg (n=3/cada uno; 6 meses de edad) y no tg (n=3/cada uno; 6 meses de edad) para alfa-SN humana se realizan experimentos adicionales que consisten en inmunización con alfa-SN murina (m), beta sinucleína humana o alfa-SN humana mutante (A53T).

Se determinan niveles de anticuerpo para alfa-SN usando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con 0,4 µg por pocillo de alfa-SN de longitud completa purificada por incubación durante la noche a 4 ºC en tampón de carbonato sódico, pH 9,6. Los pocillos se lavan 4X con 200 µl conteniendo cada PBS 0,1 % de Tween y se bloquean durante 1 hora en PBS-1 % de BSA a 37 ºC. Las muestras de suero se diluyeron sucesivamente “en el pocillo”, 1:3, empezando en la fila A, que oscila de una dilución 1:150 a 1:328.050. Para los experimentos de control, una muestra de anticuerpo monoclonal de ratón se ejecuta contra alfa-SN, sin proteína, y blancos de tampón solo. Las muestras se incuban durante la noche a 4 ºC, seguido de una incubación de 2 horas con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:7500, Promega, Madison, WI). Entonces se añade el sustrato fluorescente fosfatasa alcalina Atto-phos® durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lee a una longitud de onda de excitación de 450 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. Los resultados se representan en una gráfica semilogarítmica con unidades de fluorescencia relativas en la ordenada y dilución de suero en la abscisa. El título de anticuerpos se define como la dilución a la que hubo una reducción del 50 % de la unión al anticuerpo máxima.

Para cada grupo, al final del tratamiento, los ratones se someten a evaluación motora en la barra giratoria, como se describe (Masliah, *et al.* (2000)). Después del análisis, los ratones se sacrifican y se extraen los cerebros para análisis neuroquímicos y neuropatológicos detallados como se describe a continuación. Brevemente, el hemisferio cerebral derecho se congela y se homogeneíza para las determinaciones de inmunorreactividad de alfa-SN humana agregada y no agregada por transferencia Western (Masliah, *et al.* (2000)). El hemisferio cerebral izquierdo se fija en 4 % de paraformaldehído, se secciona sucesivamente en el vibratomo para inmunocitoquímica y análisis ultraestructural.

ii. Análisis inmunocitoquímico y neuropatológico.

Con el fin de determinar si la inmunización disminuye, secciones de agregación de alfa-SN humana se inmunotiñen con un anticuerpo policlonal de conejo contra alfa-SN humana (1:500). Después de una incubación durante la noche a 4 ºC, las secciones se incuban con anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado, seguido de complejo de avidina D-peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:200, ABC Elite, Vector). La secciones también se inmunotiñeron con anticuerpo secundario anti-conejo, ratón o humano biotinilado solo. Los experimentos con el anticuerpo secundario anti-conejo determinan si los anticuerpos contra alfa-SN humana cruzan el cerebro. La reacción se visualiza con 0,1 % de tetraclorhidrato de 3,3,-diaminobencidina (DAB) en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) con 0,001 % de H_2O_2 y entonces las secciones se montan sobre portaobjetos bajo Entellan. Los niveles de inmunorreactividad se evalúan semicuantitativamente por densitometría óptica usando Quantimet 570C. Estas secciones también se estudian por análisis de imágenes para determinar los números de inclusiones inmunorreactivas para alfa-SN y esta medida fidedigna de agregación de alfa-SN actúa de un valioso índice de los efectos anti-agregación de la vacunación (Masliah, *et al.* (2000)).

El análisis de patrones de neurodegeneración se logra analizando densidades sinápticas y dendríticas en el hipocampo, corteza frontal, corteza temporal y ganglios basales utilizando secciones de vibratomo doblemente inmunomarcadas para sinaptofisina y proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2) y se visualizaron con LSCM. Se logran análisis adicionales de neurodegeneración determinando la inmunorreactividad de tirosina hidroxilasa (TH) en el caudoputamen y la sustancia negra (SN) como se ha descrito previamente (Masliah, *et al.* (2000)). Se obtendrán imágenes de las secciones con LSCM y cada imagen individual se umbraliza interactivamente de forma que estén incluidos los extremos inmunorreactivos para TH que muestran densidad de píxeles dentro de un intervalo lineal. Se fija una escala para determinar la relación de píxeles con respecto a µm. Entonces, esta información se usa para calcular el % de área del neuropilo cubierto por terminales inmunorreactivos para terminales inmunorreactivos para TH. Estas mismas secciones también se utilizan para evaluar los números de neuronas TH en la SN.

Para evaluar los patrones de respuesta inmunitaria a inmunización, se realizan análisis inmunocitoquímicos y ultraestructurales con anticuerpos contra GFAP humana, MCH clase II, Mac 1, TNF-alfa, IL-1 beta y IL-6 en las secciones de cerebro de ratones no tg y tg para alfa-SN inmunizados con alfa-SN humana recombinante e inmunógenos de control.

iii. Análisis conductual

Para la actividad locomotora, se analizan ratones durante 2 días en la barra giratoria (San Diego Instruments, San Diego, CA), como se ha descrito previamente (Masliah, *et al.* (2000)). El primer día, los ratones se entrenaron para 5 ensayos: el primero a 10 rpm, el segundo a 20 rpm y el tercero a quinto a 40 rpm. En el segundo día, los ratones se prueban para 7 ensayos a 40 rpm cada uno. Los ratones se ponen individualmente sobre el cilindro y se aumenta la velocidad de rotación de 0 a 40 rpm durante un periodo de 240 s. La longitud de tiempo que los ratones permanecen sobre la barra (latencia de caída) se registra y se usa como medida de la función motora.

Ejemplo IV. Inmunización con fragmentos de alfa-sinucleína

Se inmunizan ratones transgénicos para alfa-SN humana de 10-13 meses de edad con 9 regiones diferentes de alfa-SN para determinar qué epítopos transportan la respuesta eficaz. Los 9 inmunógenos diferentes y un control se inyectan i.p. como se ha descrito anteriormente. Los inmunógenos incluyen cuatro conjugados de péptido alfa-SN humano, todos acoplados a IgG anti-ratón de oveja mediante un enlace de cisteína. Se usan alfa-SN y PBS como controles positivos y negativos, respectivamente. Se monitorizan los títulos como antes y los ratones se sacrifican al final de 3-12 meses de inyecciones. La histoquímica, niveles de alfa-SN y análisis de toxicología se determinan en la autopsia.

i. Preparación de Inmunógenos

Preparación de péptidos alfa-SN acoplados: Se preparan conjugados de péptido alfa-SN humana acoplando mediante una cisteína artificial añadida al péptido alfa-SN usando el reactivo de reticulación sulfo-EMCS. Se sintetizan los derivados del péptido alfa-SN con las siguientes secuencias de aminoácidos finales. En cada caso, la localización del residuo de cisteína insertado se indica por subrayado.

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

NH2-KEQVTNVCGGAVVT-COOH (SEC ID Nº: 54)

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

NH2-GVTAVAQKTVECG-COOH (SEC ID Nº: 55)

Péptido alfa-sinucleína 102-112:

NH2-C-ácido amino-heptanoico-KNEEGAPCQEG-COOH (SEC ID Nº: 56)

Péptido alfa-sinucleína 128-140:

Ac-NH-PSEEGYQDYEPECA-COOH (SEC ID Nº: 57)

Para preparar la reacción de acoplamiento, se dializan diez mg de anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante la noche contra tampón borato de sodio 10 mM, pH 8,5. Entonces, el anticuerpo dializado se concentra a un volumen de 2 ml usando un tubo de Amicon Centriprep. Se disuelven diez mg de sulfo-EMCS [N(ε-maleimidocuproiloxi)succinimida] (Molecular Sciences Co.) en un ml de agua desionizada. Se añade gota a gota un exceso molar de 40 veces de sulfo-EMCS con agitación al anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón y a continuación la disolución se agita durante diez min adicionales. El anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón activado se purifica y se intercambia el tampón por pase sobre una columna de filtración en gel de 10 ml (Pierce Presto Column, obtenido de Pierce Chemicals) equilibrada con $NaPO_4$ 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpo, identificadas por absorbancia a 280 nm, se reúnen y se diluyen a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, usando 1,4 mg por DO como coeficiente de extinción. Se disuelve un exceso molar de 40 veces del péptido alfa-SN en 20 ml de $NaPO_4$ 10 mM, pH 8,0, con la excepción del péptido alfa-SN para el que primero se disuelven 10 mg en 0,5 ml de DMSO y a continuación se diluye a 20 ml con el tampón $NaPO_4$ 10 mM. Las disoluciones de péptido se añaden cada una a 10 ml de anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón activado y se balancean a temperatura ambiente durante 4 h. Los conjugados resultantes se concentran a un volumen final de menos de 10 ml usando un tubo Centriprep de Amicon y a continuación se dializan contra PBS para intercambiar el tampón y eliminar péptido libre. Los conjugados se pasan a través de filtros de 0,22 µm de tamaño de poro para la esterilización y a continuación se toman alícuotas en fracciones de 1 mg y se guardan congeladas a -20 ºC. Las concentraciones de los conjugados se determinan usando el ensayo de proteínas BCA (Pierce Chemicals) con IgG de caballo para la curva patrón. La conjugación se documenta por el aumento de peso molecular de los péptidos conjugados con respecto al del anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón activado.

Ejemplo V. Inmunización pasiva con anticuerpos para alfa-sinucleína

Se inyectan ratones para alfa-SN humana cada uno con 0,5 mg en PBS de anticuerpos monoclonales anti-alfa-SN como se muestra a continuación. Todas las preparaciones de anticuerpo se purifican para tener bajos

niveles de endotoxina. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse contra un fragmento inyectando el fragmento o forma más larga de alfa-SN en un ratón, preparando hibridomas y cribando los hibridomas para anticuerpo que se une específicamente a un fragmento de alfa-SN deseado sin unirse a otros fragmentos que no se solapan de alfa-SN.

Los ratones se inyectan ip según se necesite durante un periodo de 4 meses para mantener una concentración circulante de anticuerpo medida por título de ELISA superior a 1:1000 definida por ELISA para alfa-SN u otro inmunogén. Los títulos se monitorizan como antes y los ratones se sacrifican al final de 6 meses de inyecciones. Se realizan histoquímica, niveles de alfa-SN y toxicología en la autopsia.

Ejemplo VI. Inmunización con Aβ de ratones transgénicos para sin/APP

Este experimento compara los efectos de la inmunización con Aβ en tres tipos de ratones transgénicos: ratones transgénicos con un transgén de alfa sinucleína (SIN), ratones APP con un transgén APP (Games *et al.*) y ratones SIN/APP transgénicos dobles producidos cruzando el transgénico individual. Los ratones transgénicos dobles se describen en Masliah et al., PNAS USA 98:12245-12250 (2001). Estos ratones representan un modelo de individuos que tienen tanto enfermedad de Alzheimer como de Parkinson. La Tabla 2 muestra los diferentes grupos, la edad de los ratones usada en el estudio, el procedimiento de tratamiento y el título de anticuerpos para Aβ. Puede observarse que se generó un título significativo en los tres tipos de ratones. La Fig. 5 muestra el % de área cubierta por placas de amiloide de Aβ en el cerebro determinadas por examen de secciones de cerebro de sujetos tratados por microscopía. Se acumulan depósitos sustanciales en los ratones APP y SIN/APP pero no en los ratones SIN o controles no transgénicos. Los depósitos son mayores en los ratones transgénicos dobles para SIN/APP. La inmunización con Aβ1-42 reduce los depósitos en tanto ratones APP como SIN/APP. La Fig. 6 muestra depósitos de sinucleína en los diversos grupos de ratones como se detecta por barrido láser confocal y microscopía óptica. Los depósitos de sinucleína se acumulan en los ratones SIN y SIN/APP tratados con CFA solo. Sin embargo, en los mismos tipos de ratones tratados con Aβ142 y CFA hay una marcada reducción en el nivel de depósito de sinucleína. Estos datos indican que el tratamiento con Aβ es eficaz no solo en eliminar depósitos de Aβ, sino también en eliminar depósitos de sinucleína. Por tanto, el tratamiento con Aβ o anticuerpos para el mismo es útil en el tratamiento de no solo enfermedad de Alzheimer, sino enfermedad de Alzheimer y de Parkinson combinadas, y enfermedad de Parkinson en pacientes libres de enfermedad de Alzheimer. El título de anticuerpos anti-Aβ en ratones SIN/APP se correlacionó con la disminuida formación de inclusiones de sinucleína ($r=-0,71$, $p < 0,01$).

Tabla 2

Grupo	n=	Edad	Tratamiento/Longitud	Títulos Ab
SYN	4	12-20 mo	Ab inj. 50ug/inj para 6mo	10000-58000
SYN	2	12-20 mo	Sal inj. para 6mo	0
APP	2	12-20 mo	Ab inj. 50ug/inj para 6mo	25000
APP	2	12-20 mo	Sal inj. para 6mo	0
SYN/APP	4	12-20 mo	Ab inj. 50ug/inj para 6mo	1000-5000
SYN/APP	2	12-20 mo	Sal inj. para 6mo	0

Para examinar el efecto de anticuerpos sobre la eliminación de placa, los presentes inventores establecieron un ensayo *ex vivo* en el que células de la microglía primarias se cultivaron con secciones de criostato sin fijar de tanto cerebros de EA de ratón PDAPP como humanos. Las células de la microglía se obtuvieron de las cortezas cerebrales de ratones DBA/2N neonatos (1-3 días). Las cortezas se disociaron mecánicamente en HBSS (solución salina equilibrada de Hank, Sigma) con 50 µg/ml de DNasa I (Sigma). Las células disociadas se filtraron con un filtro de células de 100 µm (Falcon) y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en medio de crecimiento (DMEM de alta glucosa, 10 % de FBS, 25 ng/ml de rmGM-CSF) y las células se sembraron en placa a una densidad de 2 cerebros por matraz de cultivo de plástico T-75. Después de 7-9 días, los matraces se rotaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 2 h a 37 ºC. La suspensión de células se centrifugó a 1000 rpm y se resuspendió en el medio de ensayo.

Secciones de criostato de 10 µm de cerebros con EA de ratón PDAPP o humanos (intervalo de la autopsia < 3 h) se descongelaron montadas sobre cubreobjetos de vidrio redondos recubiertos de poli-lisina y se pusieron en pocillos de placas de cultivo de tejido de 24 pocillos. Los cubreobjetos se lavaron dos veces con medio de ensayo que consistía en H-SFM (medio libre de suero de hibridoma, Gibco BRL) con 1 % de FBS, glutamina, penicilina/estreptomicina y 5 ng/ml de rmGM-CSF (R&D). Se añadieron anticuerpos de control o anti-Aβ a una

concentración 2x (5 µg/ml final) durante 1 hora. Entonces, las células de la microglía se sembraron a una densidad de 0,8 x 10^6 células/ml de medio de ensayo. Los cultivos se mantuvieron en una estufa de incubación humidificada (37 ºC, 5 % de CO_2) durante 24 h o más. Al final de la incubación, los cultivos se fijaron con 4 % de paraformaldehído y se permeabilizaron con 0,1 % de Triton-X100. Las secciones se tiñeron con 3D6 biotinilado seguido de un conjugado de estreptavidina / Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Las células de la microglía exógenas se visualizaron por una tinción nuclear (DAPI). Los cultivos se observaron con un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon, TE300) y se tomaron fotomicrografías con una cámara digital SPOT usando el software SPOT (Diagnostics instruments). Para análisis de transferencia Western, los cultivos se extrajeron en urea 8 M, se diluyeron a 1:1 en tampón de muestra de tricina reductor y se cargaron sobre un gel de tricina al 16 % (Novex). Después de transferir sobre Immobilon, las transferencias se expusieron a 5 µg/ml de pabAβ42 seguido de un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP, y se desarrolló con ECL (Amersham)

Cuando el ensayo se realizó con secciones de cerebro de PDAPP en presencia de un anticuerpo contra NAC se observó una marcada reducción en el número y tamaño de placas indicativa de actividad de eliminación del anticuerpo. Se puso en contacto un anticuerpo para NAC con una muestra de tejido cerebral que contenía placas de amiloide y células de la microglía, como se trata anteriormente. Se usó suero de conejo como control.

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

Ejemplo VIII: Inmunización activa con alfa-sinucleína

A. Materiales y métodos

Vacunación de ratones tg para α-sinucleína h. Para este estudio se usaron ratones tg heterocigóticos (línea D) que expresan hα-sinucleína bajo el control regulador del promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas β (PDGFβ) (Masliah, 2000, Science 287:1265-69). Estos animales se seleccionaron debido a que desarrollan inclusiones inmunorreactivas con hα-sinucleína en el cerebro, además de deficiencias neurodegenerativas y motoras que imitan ciertos aspectos de ECL. Los animales experimentales se dividieron en dos grupos. Para el primer grupo, se inmunizaron un total de 20 ratones tg jóvenes (3 meses de edad) durante 8 meses con hα-sinucleína recombinante (n=10) o adyuvante solo (n=10). Para el segundo grupo, un total de 20 ratones tg adultos jóvenes (6 meses de edad) se inmunizaron durante 8 meses con hα-sinucleína recombinante (n=10) o adyuvante solo (n=10). El protocolo de inmunización consistió primero en una inyección con hα-sinucleína recombinante (80 µg/ml; 100 µl) con adyuvante completo de Freund (CFA). Dos semanas después los ratones recibieron otra inyección de hα-sinucleína (80 µg/ml; 100 µl) con FA incompleto, seguido de re-inyección una vez al mes (durante los 7 meses posteriores) con hα-sinucleína (80 µg/ml; 100 µl) en solución salina tamponada con fosfato. Se preparó hα-sinucleína recombinante y se purificó como se ha descrito en Masliah et al., 2005, Neuron 46:857-68, y se probó para endotoxinas.

Determinación de títulos de anticuerpos y afinidad relativa por hα-sinucleína. Se determinaron los niveles en plasma de anticuerpos para hα-sinucleína usando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con 0,4 µg por pocillo de α-sinucleína de longitud completa purificada. Las muestras se incubaron durante la noche a 4 ºC, seguido de lavado e incubación con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:7500, Promega, Madison, WI). La placa se leyó a una longitud de onda de excitación de 450 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. Los resultados se representaron en una gráfica semilogarítmica con unidades de fluorescencia relativas en la ordenada y dilución de suero en la abscisa. El título de anticuerpos se definió como la dilución a la que hubo una reducción del 50 % de la unión máxima del anticuerpo.

Para determinar la afinidad relativa por hα-sinucleína por los anticuerpos generados en los ratones vacunados, se realizaron dos conjuntos de experimentos. En el primero, homogeneizados de cerebro de ratones tg para hα-sinucleína no inmunizados se ejecutaron en un aparato multicanal de minigel (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada canal se incubó con el suero diluido de cada uno de los ratones, se transfirió sobre nitrocelulosa y se incubó con anticuerpo de conejo anti-ratón secundario seguido de proteína A marcada con I^{125} (Alford et al., J. Histochem. Cytochem 42:283-287 (1994)). Se obtuvieron imágenes de las trasferencias y se analizaron con PhosphorImager (Molecular Dynamics, Piscataway, NJ). La banda inmunorreactiva se cuantificó usando el software ImageQuant (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Para el segundo conjunto de experimentos, secciones de vibratomo sucesivas de un ratón tg para hα-sinucleína no inmunizado se incubaron en el suero diluido de cada uno de los ratones tratados, seguido de anticuerpo de caballo anti-IgG de ratón biotinilado (1:100, Vector), avidina D-peroxidasa de rábano picante (HRP, 1:200, ABC Elite, Vector) y se hicieron reaccionar con tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) que contenía 0,001 % de H_2O_2. Después del examen microscópico, las secciones se puntuaron según el compartimento celular marcado (cuerpos de células neuronales, sinapsis e inclusiones) y el grado de

inmunorreactividad (0= ninguno; 1= muy leve, 2= leve, 3= moderado, 4= intenso).

Mapeo de epítopos de anticuerpos para α-sinucleína h. Los epítopos reconocidos por anticuerpos para hα-sinucleína se determinaron por un ELISA que mide la unión de un anticuerpo para solapar péptidos lineales que cubrieron la secuencia de ha-sinucleína entera. Se prepararon péptidos biotinilados en el extremo C con secuencias de hα-sinucleína (Mimotopes, San Diego, CA) como péptidos de 15 aminoácido (aa) de longitud con un solapamiento de 12 residuos y una etapa de 3 residuos por péptido. Se usó un total de 43 péptidos para recorrer la secuencia de 140 aa entera de hα-sinucleína teniendo el último péptido un solapamiento de 13 aa y una etapa de 2 aa. Además, se repitieron los 3 últimos péptidos, pero con la biotinilación que se produce en el extremo N del péptido. Esto se hizo para mejorar el acceso al extremo C de los péptidos por anticuerpos y para permitir la identificación de anticuerpos específicos del extremo C libre. Además, se añadieron otras características a este ensayo para permitir un examen más riguroso de interacciones entre anticuerpos y la región del componente de no amiloide β (Aβ) (NAC) (61-95) de hα-sinucleína. Como el péptido 21º en este ensayo ya contiene el extremo N libre de la región NAC, se añadió un péptido biotinilado del extremo N adicional que contenía el extremo C libre de la región NAC para completar el ensayo con un total de 47 péptidos.

Para ejecutar el ensayo, estos péptidos biotinilados se recubrieron durante la noche a 5 nM sobre placas de ELISA previamente recubiertas con estreptavidina (Pierce, Rockford, IL). Entonces, las placas se lavaron y las muestras de suero, diluidas a un título equivalente de 6, se añadieron para una incubación de 1 hora. Las muestras de suero con títulos inferiores a 5.000 se diluyeron 1:1000 para esta incubación. Después de otra etapa de lavado, los anticuerpos unidos se detectaron usando segundos anticuerpos específicos de especie conjugados con HRP en un formato de ELISA colorimétrico.

Procesamiento de tejido. Se sacrificaron ratones y los cerebros extrajeron para análisis neuroquímicos y neuropatológicos detallados como se describe más adelante. Brevemente, el hemisferio cerebral derecho se congeló y se homogeneizó para las determinaciones de inmunorreactividad de hα-sinucleína agregada y sin agregar por transferencia Western (Masliah et al., 2000, arriba). El hemisferio cerebral izquierdo se fijó en 4 % de paraformaldehído (PFA) y se seccionó sucesivamente con el vibratomo (Leica, Wetzlar, Alemania) para inmunocitoquímica (ICC) y análisis ultraestructural.

Preparaciones sinaptosómicas y análisis de inmunotransferencia. Para determinar los efectos de la vacunación sobre la acumulación de α-sinucleína en los cerebros de ratones tg, se prepararon fracciones sinaptosómicas usando gradientes de sacarosa y se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10 % de Tris-acetato (NuPAGE™, Invitrogen). Se sondaron las inmunotransferencias con anticuerpos primarios contra hα-sinucleína (LB509, 1:1000, Transduction Laboratories, San Diego, CA) y sinaptofisina (1:20, Chemicon, Temecula, CA) y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón secundario marcado con HRP (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) y se visualizaron por quimioluminiscencia potenciada y se analizaron con un aparato de obtención de imágenes Versadoc XL (BioRad, Hercules, CA).

Análisis neuropatológico e inmunocitoquímico. Brevemente, como se ha descrito previamente (Masliah et al., 2000), arriba, para investigar los efectos de la vacunación sobre la acumulación de hα-sinucleína, secciones de vibratomo codificadas de forma ciega, de libre flotación y seccionadas sucesivamente se incubaron durante la noche a 4 ºC con un anticuerpo específico anti-hα-sinucleína purificado por afinidad (72-10, policlonal de conejo, 1:500) preparado como se ha descrito previamente (Masliah et al., 2000, supra) inmunizando conejos con péptidos hα-sinucleína sintéticos que consisten en los aa 101-124. La incubación con el anticuerpo primario se siguió de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo biotinilado (1:100, Vector), avidina D-HRP (1:200, ABC Elite, Vector) y se hizo reaccionar con tetraclorhidrato de DAB que contenía 0,001 % de H_2O_2. Las secciones se analizaron con Quantimet 570C (Leica) con el fin de determinar el número de inclusiones inmunorreactivas de hα-sinucleína en la neocorteza. Para cada caso, se analizaron tres secciones y los resultados se promediaron y se expresaron como números por mm cuadrado. Se realizó análisis inmunocitoquímico adicional inmunorreaccionando secciones con anticuerpos contra marcadores de la glía que incluyen CD45 (1:1000, DakoCytomation, Carpinteria, CA) y proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP, 1:500, Chemicon).

Se realizó análisis inmunocitoquímico doble como se ha descrito previamente (Hashimoto et al., Neuron 32:213-223 (2001) para determinar los efectos de la vacunación sobre la densidad de terminaciones nerviosas y la acumulación de hα-sinucleína en sinapsis. Para este fin, secciones de vibratomo se marcaron doblemente con un anticuerpo policlonal contra hα-sinucleína (1:1000) y con el anticuerpo monoclonal contra sinaptofisina (Chemicon).

Se detectó hα-sinucleína con rojo de tiramida (1:2000, Roche) y sinaptofisina con anticuerpo de caballo anti-IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para cada caso, las secciones se inmunomarcaron por duplicado y se analizaron con el microscopio confocal de barrido láser (LSCM) y el software NIH Imagen 1.43 para calcular el área en porcentaje del neuropilo cubierto por terminales inmunorreactivos con sinaptofisina en la neocorteza (Mucke et al., J. Neurosci 20:4050-4058 (2000)) y la proporción de terminales inmunorreactivos con sinaptofisina que fueron positivos para hα-sinucleína. Con el fin de confirmar la especificidad de los anticuerpos primarios, se realizaron experimentos de control en los que las secciones se incubaron durante la

noche en ausencia de anticuerpo primario (delecionado), con el anticuerpo primario preadsorbido durante 48 h con exceso de 20 veces de péptido correspondiente o con suero preinmune.

Todas las secciones se procesaron simultáneamente bajo las mismas condiciones y se realizaron experimentos dos veces con el fin de evaluar la reproducibilidad de resultados. Se obtuvieron imágenes de las secciones con un objetivo Zeiss 63X (N.A. 1.4) en un microscopio Axiovert 35 (Zeiss, Alemania) con un sistema MRC1024 LSCM unido (BioRad, Wattford, RU) (Masliah et al., 2000, arriba).

Análisis estadístico. Se realizaron comparaciones estadísticas entre grupos utilizando la prueba de la t de Student para datos independientes bilateral. Se realizó análisis de regresión lineal para determinar la relación entre variables. La corrección de Bonferroni se aplicó para explicar comparaciones múltiples.

B. Resultados

Caracterización de títulos de anticuerpos, afinidad y mapeo de epítopos

Se analizaron títulos de anticuerpos en 3 momentos de tiempo (2 semanas, 6 meses y 9 meses después de la vacunación) en ambos grupos experimentales. Los títulos de anticuerpos variaron considerablemente entre ratones, en animales que pertenecen al grupo I, los títulos de anticuerpos entre ratones inmunizados con hα-sinucleína oscilaron de 200 a 20.000 (Tabla 3).

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

Grupo	Afinidad de anticuerpos por minitransferencia	Afinidad de anticuerpos por sinapsis	Afinidad de anticuerpos a inclusiones	Títulos de ancicuerpos (primer sangrado)	Títulos de ancicuerpos (segundo sangrado)	Títulos de ancicuerpos (tercer sangrado)
Grupo *II α-syn*	109147+-2700	1.9+-0.73	1.2+-0.4	2332+-500	2772+-1176	3644+-2365
Grupo /// CFA	113+-113	0.4+-0.1	0	19+-6.7	30+-12	7+-4
Grupo *II α-syn*	235747+-74000	4.1+-0.9	2.8+-1.0	3813+-1200	2926+-976	1468+-641
Grupo *III CFA*	400+-358	0.3+-0.2	0.1+-0.1	23+-9	21+-14	0.6+-0.6

En este grupo, los títulos promedio ascendieron ligeramente con el tiempo. Similarmente, para el grupo II, los animales inmunizados con hα-sinucleína mostraron títulos que oscilaron de 200 a 13.000 (Tabla 3). Sin embargo, los niveles de título promedio fueron mayores en la primera determinación y luego disminuyeron con el tiempo. Los análisis de inmunotransferencia también mostraron variabilidad significativa de ratón a ratón en su capacidad para reconocer hα-sinucleína. En general, los niveles de afinidad relativa por el anticuerpo fue mayor en ratones del grupo II en comparación con ratones inmunizados del grupo I (Tabla 4).

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

Marcadores neuropatológicos	Afinidad de anticuerpos por minitransferencia	Afinidad de anticuerpos por sinapsis	Afinidad de anticuerpos a inclusiones	Afinidad de anticuerpos a neuronas	Títulos de ancicuerpos (primer sangrado)
Número de inclusiones α-syn (+)	-0.11	0.04	0.12	-0.21	0.1
% de área neuropil α-syn (+) sinapsis	-0.46 (p=0.003)	-0.41 (p=0.009)	-0.43 (p=0.005)	0.06	-0.47 (p=0.007)
% de área neuropil synaptofisina (+) sinapsis	0.06	0.35 (p=0.04)	0.01	0.04	0.12
Afinidad de anticuerpos por minitransferencia	-	0.74 (p=0.0001)	0.70 (p=0.0001)	-0.16	0.85 (p=0.0001)
Títulos de ancicuerpos (primer sangrado)	0.85 (p=0.0001)	0.62 (p=0.0001)	-0.18	0.81 (p=0.0001)	-

Por ICC, sueros de ratones vacunados con hα-sinucleína mostraron marcado de neuronas, inclusiones intraneuronales y terminales presinápticas. A diferencia, los ratones tratados con adyuvante solo mostraron tinción leve difusa y no específica de cuerpos de células. Los sueros de ratones que pertenecen al grupo II mostraron mayor afinidad en el reconocimiento de hα-sinucleína en las sinapsis y neuronas en los ratones tg en comparación con ratones inmunizados del grupo I (Tabla 4).

Estudios de mapeo de epítopos mostraron que en ratones vacunados con hα-sinucleína, los anticuerpos reconocieron más frecuentemente epítopos de péptido dentro de la región del extremo C de hα-sinucleína (Figura 8). Además, también se reconocieron ocasionalmente anticuerpos para epítopos adicionales. A diferencia, no se detectaron reactividad o epítopos de anticuerpo con los sueros de ratones tratados con CFA solo.

La inmunización reduce la acumulación de hα-sinucleína y preserva la densidad sináptica en los cerebros de ratones tg

Para determinar los efectos de la inmunoterapia sobre la acumulación de hα-sinucleína, se marcaron secciones con anticuerpos contra hα-sinucleína y se analizaron por microscopía de campo brillante o por LSCM. En ratones tg, se observó abundante inmunorreactividad de hα-sinucleína en el neuropilo, además de en inclusiones intraneuronales. En comparación con ratones tg tratados con CFA solo, ratones de ambos grupos inmunizados mostraron una reducción comparable (aproximadamente del 25 %) en el número de inclusiones en la corteza temporal (Figura 9A). Además, la inmunización produjo una disminución en la inmunorreactividad de hα-sinucleína en el neuropilo. Cuando se comparó con ratones tg tratados con CFA solo, este efecto fue mayor en ratones del grupo II que en ratones del grupo I (Figura 9A). Para determinar si los efectos de la inmunización estuvieron de hecho relacionados con la capacidad de los anticuerpos para reducir la acumulación de hα-sinucleína neuronal o para enmascarar efectos, se realizaron experimentos de control comparando los niveles de inmunorreactividad de β sinucleína entre ratones tg vacunados con CFA solo y con hα-sinucleína. De acuerdo con la distribución conocida de β-sinucleína, un homólogo próximo a α-sinucleína (Iwai et al., Neuron 14:467-475 (1994)), se observó abundante inmunorreactividad de β-sinucleína en el neuropilo en asociación con los terminales presinápticos y se detectó un ligero inmunomarcado en los cuerpos de células neuronales, pero no en las inclusiones. En comparación con ratones tg tratados con CFA solo, no se encontraron diferencias en los patrones y niveles de α-sinucleína en ratones inmunizados con hα-sinucleína. Para investigar adicionalmente la especificidad de los efectos de los anticuerpos para hα-sinucleína, se compararon los niveles de inmunorreactividad de α sinucleína murina (m) entre los ratones tg vacunados con CFA solo y con hα-sinucleína. Similar a la hα-sinucleína, la inmunorreactividad de mα-sinucleína fue abundante en el neuropilo en asociación con las terminaciones nerviosas, pero estuvo ausente en los cuerpos de células neuronales y en las inclusiones. Tanto en los ratones inmunizados con CFA como con hα-sinucleína, los patrones y niveles de mα-sinucleína fueron comparables. Tomados conjuntamente, estos estudios sugieren que la vacunación afecta específicamente la hα-sinucleína, pero no otras moléculas sinápticas relacionadas.

Para determinar adicionalmente los efectos de la inmunoterapia sobre la integridad del neuropilo, se inmunotiñeron secciones con un anticuerpo contra sinaptofisina o por microscopía electrónica. En comparación con ratones no transgénicos (no tg), los ratones tg tratados con CFA solo mostraron un promedio del 20 % de disminución en el número de terminales inmunomarcadas con sinaptofisina, y los niveles de inmunorreactividad para sinaptofisina por sinapsis siguieron invariables (Figura 9B). A diferencia, los ratones inmunizados de ambos grupos mostraron niveles de inmunorreactividad para sinaptofisina comparables a controles no tg (9B). Adicionalmente, el análisis inmunocitoquímico con anticuerpos contra marcadores de la glía tales como GFAP y CD45 mostró una

tendencia hacia elevada inmunorreactividad en los cerebros de ratones tg vacunados con hα-sinucleína (Figura 9C). De acuerdo con estos hallazgos, análisis ultraestructurales mostraron que en los cerebros de ratones tg inmunizados con hα-sinucleína, el neuropilo se preservó bien, con terminales presinápticas y dendritas intactas y las terminaciones nerviosas contuvieron abundantes vesículas claras y formaron densidades postsinápticas. Solo se identificaron agregados electrodensos ocasionales en los procesos neuríticos y en general las mitocondrias y la mielina estuvieron bien preservadas.

Para caracterizar mejor los efectos de la vacunación sobre la agregación de hα-sinucleína en las sinapsis, se realizó análisis inmunocitoquímico doble y de transferencia Western con preparaciones sinaptosómicas. Bajo condiciones fisiológicas, la hα-sinucleína está localizada principalmente en los botones presinápticos (Iwai et al., 1994, arriba) y en ECL y en los ratones tg, la elevada acumulación de hα-sinucleína en las sinapsis está asociada a déficits funcionales y pérdida de sinapsis (Hashimoto et al., 2001, arriba). Para determinar los efectos de la vacunación sobre la acumulación de hα-sinucleína en las terminaciones nerviosas, se realizaron estudios de inmunomarcado doble con anticuerpos contra el marcador de las terminaciones presinápticas sinaptofisina y hα-sinucleína y el análisis de WB con preparaciones sinaptosómicas. La obtención de imágenes confocales de secciones doblemente marcadas mostró que, en comparación con los ratones tg para hα-sinucleína vacunados con CFA solo (Figura 9D), aquellos que se inyectaron con hα-sinucleína mostraron disminución de la acumulación de hα-sinucleína en terminaciones nerviosas inmunorreactivas para sinaptofisina en la neocorteza (Figura 9D).

De acuerdo con los estudios inmunocitoquímicos, los análisis de inmunotransferencia mostraron que en los ratones tg tratados con CFA solo, hubo abundantes bandas de mayor peso molecular, reflejando posiblemente la acumulación de inclusiones inmunorreactivas para hα-sinucleína en las sinapsis (Figura 10). En los ratones inmunizados hubo una disminución considerable en la acumulación de bandas de mayor peso molecular de hα-sinucleína y la banda nativa, pero no se observaron efectos sobre los niveles de mα-sinucleína. Además, en comparación con ratones tg tratados con CFA solo, los niveles de inmunorreactividad para sinaptofisina fueron mayores en las preparaciones sinaptosómicas de ratones inmunizados (Figura 10). Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que la inmunoterapia puede mejorar el daño neuronal en los cerebros de ratones tg reduciendo la acumulación de oligómeros de hα-sinucleína potencialmente tóxicos en las sinapsis.

Los efectos de la inmunización dependen de la afinidad relativa de los anticuerpos para reconocer terminaciones sinápticas

Para entender mejor qué factores predicen la eficacia de la inmunoterapia, se realizó análisis de regresión lineal entre los marcadores neuropatológicos de la acumulación de hα-sinucleína y los títulos de anticuerpos y la afinidad. Este análisis mostró una correlación significativa entre afinidad por anticuerpo relativa por inmunotransferencia y niveles de la inmunorreactividad de hα-sinucleína en las sinapsis, pero no con los números de inclusiones neuronales. Similarmente, la afinidad por anticuerpo relativa para reconocer sinapsis por ICC se correlacionó inversamente con niveles de hα-sinucleína en las sinapsis y se correlacionó directamente con el área en porcentaje ocupada por terminaciones nerviosas marcadas con sinaptofisina, pero no con los números de inclusiones neuronales. Niveles de reactividad de anticuerpo por inmunotransferencia y ICC se correlacionaron fuertemente con títulos de anticuerpos como se ha determinado por ELISA. También se correlacionaron títulos de anticuerpos con el área en porcentaje del neuropilo marcado con el anticuerpo anti-hα-sinucleína, pero no con los números de inclusiones en neuronas (Tabla 4). Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que la reactividad de inmunotransferencia relativa de los anticuerpos anti-α-sinucleína humana y de algún modo los títulos de ELISA de anticuerpos se correlacionan con la reducción de acumulación de α-sinucleína humana neuronal.

Los anticuerpos anti-α-sinucleína humana son internalizados y se unen a sinapsis y neuronas que contienen inclusiones en ratones tg

Para determinar si el tráfico de anticuerpos que reconocen los sitios neuronales característicos en los que la α-sinucleína humana se acumula en los cerebros de ratones tg, se realizó análisis inmunocitoquímico sencillo y doble con anticuerpos de caballo anti-IgG de ratón. Estos anticuerpos reconocen putativamente la anti-α-sinucleína humana generada en los animales inmunizados, pero no en los controles de CFA. Microscopía digital de campo brillante de las secciones inmunomarcadas mostraron que en ratones inmunizados con hα-sinucleína, el anti-IgG de ratón biotinilado marcó difusamente cuerpos de células neuronales y procesos neuríticos en el neuropilo. En animales tg tratados con CFA solo hubo un leve marcado de vasos sanguíneos y células ocasionales que se parecen a la microglía. Experimentos de inmunotinción doble confirmaron que en los ratones vacunados, los cuerpos de células neuronales marcados por un anti-IgG de ratón marcado con FITC mostraron la inmunorreactividad de hα-sinucleína. En comparación con ratones tg tratados con CFA solo, en ratones vacunados con hα-sinucleína, en algunas neuronas, el anti-IgG de ratón y la inmunorreactividad de hα-sinucleína se co-localizaron en la periferia de los cuerpos de células, en otras áreas las dos marcas se detectaron en los procesos neuríticos y sinapsis. Además, en varias neuronas que contienen α-sinucleína humana, los dos marcadores se detectaron en estructuras subcelulares granulares que promedian en tamaño 0,4-0,8 µm de diámetro. Experimentos de doble marcado adicionales mostraron que estas estructuras granulares mostraron inmunorreactividad para catepsina D, sugiriendo que los anticuerpos anti-α-sinucleína humana internalizados reaccionaron con sinucleína dentro de los lisosomas.

De acuerdo con este hallazgo, análisis ultraestructurales mostraron que en algunas de las neuronas de los ratones vacunados con α-sinucleína humana, se identificaron estructuras laminadas electrodensas sugerentes de lisosomas y fagolisosomas. Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que la vacunación con α-sinucleína humana puede promover la degradación de esta molécula mediante la activación de una vía lisosómica.

EJEMPLO IX. Eliminación de agregados de α-sinucleína *in vivo* por administración de anticuerpos para α-sinucleína

Este ejemplo demuestra la eliminación de agregados de α-sinucleína intraneuronales usando anticuerpos anti-α-sinucleína monoclonales que reconocen los extremos de α-sinucleína. Los anticuerpos monoclonales se inyectaron en la neocorteza de ratones transgénicos que expresan en exceso α-sinucleína humana y tienen agregados de α-sinucleína intraneuronales. Los dos anticuerpos, uno dirigido contra el extremo N y el otro dirigido contra el extremo C de α-sinucleína, redujeron el número de agregados de α-sinucleína intraneuronales hasta el 80 % en comparación con anticuerpos de control irrelevantes (Fig. 11).

Métodos. Anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítopos de la molécula de α-sinucleína y anticuerpos de control del mismo isotipo irrelevantes se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato estéril (Tabla 5) para inyección en ratones. Los animales usados fueron ratones transgénicos heterocigóticos de 4 a 8 meses de edad que expresaban en exceso α-sinucleína no mutante humana en el cerebro bajo el control transcripcional del promotor del PDGF. Se usaron de 4 a 6 ratones transgénicos diferentes para cada uno de los anticuerpos.

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

Anticuerpo monoclonal	Epitopo/Especificidad	Isotipo
11 A5	α-sinuclein fospoSER129	IgG1
8 A5	α-sinuclein termino-C	IgG1
9G5	α-sinuclein 91-96	IgG1
23E8	α-sinuclein 40-55	IgG1
6H7	α-sinuclein termino-N	IgG1
4B1	α-sinuclein termino-C	IgG2a
5C12	α-sinuclein 109-120	IgG2b
27-1	control	IgG1
TY11-15	control	IgG2a
5B7	control	IgG2b

Para cada ratón, se inyectaron estereotácticamente 2 µl de una disolución de 2 mg/ml de anticuerpo bajo anestesia en las capas profundas de la neocorteza parietal del hemisferio cerebral derecho (lado ipsolateral). Los hemisferios izquierdos (lado contralateral) sirvieron de control del nivel inicial para cada ratón. Se suturaron los sitios de inyección y los ratones se monitorizaron hasta que se recuperaron de la anestesia. El investigador que realizó las inyecciones estuvo cegado en cuanto a qué anticuerpo se inyectó cada vez. Dos semanas después de la inyección, los ratones se sacrificaron siguiendo pautas institucionales. Sus cerebros se extrajeron, se fijaron en 4 % de paraformaldehído durante 48 h y se cortaron coronalmente a 40 µm de espesor usando un vibratomo de Leica. Se tiñeron dos secciones por animal (alrededor del sitio de inyección) por tinción con inmunoperoxidasa con un anticuerpo para α-sinucleína policlonal (ELADW-47, que reconoce los aminoácidos de α-sinucleína 115-122). Para cada sección, los agregados de α-sinucleína intraneuronales se contaron en 4 campos microscópicos (objetivo 20x) alrededor del sitio de inyección en el hemisferio ipsolateral, y en 4 campos correspondientes a campos en el hemisferio de control contralateral. Se sumaron las cifras de agregados de α-sinucleína para dos secciones para cada hemisferio. Finalmente, para cada animal se calculó la diferencia entre la cifra de agregados de α-sinucleína total entre los dos hemisferios y se expresó como el % de diferencia entre el hemisferio contralateral y el ipsolateral, proporcionando así una medida del efecto de anticuerpos para α-sinucleína sobre la eliminación de agregados para cada ratón individual. Las secciones se codificaron de forma cegada y el código se rompió cuando se completó el análisis.

Los ratones pueden clasificarse en tres grupos basados en qué anticuerpos se inyectaron:

Grupo 1: Ratones inyectados con 11A5, 8A5 o un control de IgG_1 .
Grupo 2: Ratones inyectados con 9G5, 23E8, 6H7 o un control de IgG_1.
Grupo 3: Ratones inyectados con 4B1, 5Cl2, un control de IgG_{2B} o de IgG_{2b}.

Resultados. Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 11 y 12. Se eliminaron agregados de α-sinucleína intraneuronales por dos anticuerpos monoclonales: 8A5 (también llamado JH4.8A5) y 6H7 (también llamado JH17.6H7), ambos descritos en la publicación de patente PCT WO 05047860A2 (“Antibodies to Alpha-Synuclein” presentada el 26 de mayo de 2005) y en la solicitud de patente en tramitación junto con la presente

10/984192. El mAb 6H7 se produjo contra α-sinucleína humana recombinante expresada en *E. coli* y reconoce el extremo amino de α-sinucleínas humanas y de ratón. Reconoce un epítopo que incluye los tres primeros aminoácidos de α-sinucleína. El mAb 6H7 puede reconocer proteínas de fusión de sinucleína en las que la proteína de marca está fusionada con el extremo N de sinucleína, sugiriendo que no se requiere un extremo amino libre (aunque puede preferirse). El mAb 8A5 se produjo contra sinucleínas bovinas purificadas (mezcla de α y β) y reconoce un epítopo en el extremo carboxi de α-sinucleínas humanas y de ratón. El mAb 8A5 puede unirse a sinucleína truncada que termina en el aminoácido 139. Experimentos preliminares sugieren que 8A5 tiene una preferencia de 4-5 veces por la sinucleína con un extremo C libre en comparación con un extremo C conjugado con biotina. Tanto el mAb 6H7 como el mAb 8A5 también reconocen beta-sinucleína. El mAb 4B1 reconoce la región del extremo C de sinucleína y se une a sinucleína en transferencias Western, pero no reconoce sinucleína en disolución (es decir, el mAb 4B1 no inmunoprecipita sinucleína). La Figura 12 muestra secciones del lado contralateral (panel izquierdo; los puntos marrones redondos dentro de la sección son agregados de α-sinucleína) y el lado ipsolateral (panel derecho) de un ratón inyectado con 8A5. La diferencia entre los ratones inyectados con 8A5 y los controles inyectados con IgG_1 fue estadísticamente significativa ($p<0,05$ por Kruskall-Wallis no paramétrico seguido de la prueba a posteriori de Dunn). Estos resultados indican que la elección como diana del extremo C y/o el extremo N de α-sinucleína es terapéuticamente beneficiosa en sinucleopatías tales como EP y DCL. La administración de otros anticuerpos anti-α-sinucleína probados (Tabla 5, Fig. 11) no produjo eliminación de agregados.

EJEMPLO X: Eliminación de agregados de α-sinucleína *in vivo* por administración de anticuerpos para α-sinucleína

Este ejemplo demuestra la eliminación de agregados de α-sinucleína intraneuronales usando anticuerpos anti-α-sinucleína monoclonales que reconocen los extremos de α-sinucleína (6H7 y 8A5) como se describen en el Ejemplo IX. Este ejemplo también demuestra la eliminación de agregados de α-sinucleína intraneuronales usando un anticuerpo anti-α-sinucleína monoclonal que reconoce un epítopo próximo al extremo C (9E4). El mAb 9E4 reconoce un epítopo de alfa-sinucleína en la región de aminoácidos 118-126.

Los anticuerpos monoclonales se inyectaron 3x en la neocorteza del hemisferio derecho de ratones transgénicos que expresan en exceso α-sinucleína humana y forman agregados de α-sinucleína intraneuronales. Como se ha descrito anteriormente, el mAb 6H7, que reconoce el extremo N de α-sinucleína y el mAb 8A5, que reconoce el extremo C de α-sinucleína, redujeron el número de agregados de α-sinucleína intraneuronales hasta el 80 % en comparación con un anticuerpo de control irrelevante (Fig. 13). Además, el mAb 9E4, que reconoce un epítopo de α-sinucleína en los aa 1118-126, tuvo un efecto reductor de agregados de α-sinucleína similar (Fig. 13).

Métodos. Anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítopos de la molécula de α-sinucleína y un anticuerpo de control del mismo isotipo irrelevante se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato estéril para inyección en ratones (Tabla 6). Los animales usados fueron ratones transgénicos heterocigóticos de 4 a 8 meses de edad que expresan en exceso α-sinucleína no mutante humana en el cerebro bajo el control transcripcional del promotor de PDGF. Se usaron de 4 a 6 ratones transgénicos diferentes para cada uno de los anticuerpos.

Tabla 6. Anticuerpos para α-sinucleína y controles usados para 3 inyecciones intracerebrales en un modelo transgénico de sinucleopatía neuronal.

Anticuerpo monoclonal	Epitopo/Especificidad	Isotipo
8 A5	α-sinuclein termino-C	IgG1
6H7	α-sinuclein termino-N	IgG1
9E4	α-sinuclein aa118-126	IgG1
27/1	control	IgG1

Para cada ratón, se inyectaron estereotácticamente 2 µl de una disolución de 2 mg/ml de anticuerpo para cada sitio de inyección bajo anestesia en la capas profundas de la neocorteza parietal del hemisferio derecho del cerebro (lado ipsolateral). Los hemisferios izquierdos (lado contralateral) sirvieron de control del nivel inicial para cada ratón. Las tres coordenadas de la inyección estereotáctica fueron: inyección 1: 2,0 mm del bregma, 1,5 mm lateral, 2,0 mm de profundidad; inyección 2: 0,4 mm del bregma, 1,5 mm lateral, 1,4 mm de profundidad; inyección 3: -2,3 mm del bregma, 1,5 mm lateral, 1,2 mm de profundidad). Se suturaron los sitios de inyección y los ratones se monitorizaron hasta que se recuperaron de la anestesia. El investigador que realizó las inyecciones estuvo cegado en cuanto a qué anticuerpo se inyectó cada vez. Dos semanas después de la inyección, los ratones se sacrificaron siguiendo pautas institucionales. Sus cerebros se extrajeron, se fijaron en 4 % de paraformaldehído durante 48 h y se cortaron coronalmente a 40 µm de espesor usando un vibratomo de Leica. Se tiñó cara tercera sección a través del cerebro para cada animal por tinción con inmunoperoxidasa con un anticuerpo policlonal para α-sinucleína (ELADW-47, que reconoce los aminoácidos de α-sinucleína 115-122). Basándose en la localización para cada sitio de inyección, se seleccionaron dos-cuatro secciones alrededor de cada uno de los tres sitios de inyección para cada animal. Se contaron agregados de α-sinucleína intraneuronales en 4 campos microscópicos (objetivo 20x) alrededor del sitio de inyección en el hemisferio ipsolateral, y en 4 campos correspondientes a campos en el hemisferio de

control contralateral. Se sumaron las cifras de agregados de α-sinucleína para todas las secciones contadas (3-12 secciones totales/animal) para cada hemisferio. Finalmente, para cada animal se calculó la diferencia entre la cifra de agregados de α-sinucleína total entre los dos hemisferios y se expresó como el % de diferencia entre el hemisferio contralateral y el ipsolateral, proporcionando así una medida del efecto de anticuerpos para α-sinucleína sobre la eliminación de agregados para cada ratón individual. Las secciones se codificaron de forma cegada y el código se rompió cuando se completó el análisis.

EJEMPLO XI: Un anticuerpo monoclonal contra el extremo C de alfa-sinucleína entra en el cerebro y reconoce alfa-sinucleína

Ratones tg para α-sin humana se inyectaron intravenosamente con 9E4-FITC a una dosificación de 5 mg/kg; 100 µl. Los ratones se sacrificaron una semana después para determinar la presencia del anticuerpo en el cerebro y CSF. Los presentes inventores visualizaron el anticuerpo fluorescente directamente, y encontraron que el anticuerpo, en realidad, pasó al cerebro y reconoció específicamente a-sin en el cuerpo de células neuronales y sinapsis. Una IgG de control periféricamente administrada mostró solo inmunorreactividad de fondo en tanto ratones tg como no tg. Además, los presentes inventores encontraron que el CSF de ratones tratados fue inmunorreactivo contra a-sin en los cerebros de ratones tg sin tratar, y mostró un patrón de tinción similar al inmunomarcado directo con el anticuerpo 9E4-FITC (véase la Fig. 14.)

EJEMPLO XII: La inmunización pasiva con un anticuerpo contra α-sin del extremo C reduce los déficits de α-sin en ratones tg

El objetivo del presente estudio era mostrar la inmunización pasiva con un anticuerpo contra el tráfico del extremo C de a-sin en el SNC y puede reconocer y eliminar agregados de a-sin en el cerebro de ratones tg. Para este fin, se inyectaron intraperitonealmente ratones tg para α-sin humana con 9E4 a una dosificación de 1 mg/kg durante seis meses. Los animales tratados con 9E4 se sacrificaron después de 6 meses de inyecciones semanales. Se encontraron niveles reducidos de oligómeros de α-sin y formas insolubles de α-sin en los cerebros de los ratones tg inyectados (véase la Figura 15).

EJEMPLO XIII: La inmunización con un anticuerpo contra el extremo C de a-sinucleína promueve la eliminación mediante la activación de la vía de la autofagia en un transgénico de enfermedad de Parkinson

Un anticuerpo monoclonal (clon 9E4) marcado con FITC se inyectó IV en ratones no tg y tg para alfa-sin. Después de 3 días después de la inyección se detectaron bajos niveles del anticuerpo en el cerebro, mientras que se detectaron altos niveles en plasma. 14 y 30 días después de la inyección se detectaron mayores niveles en el cerebro con niveles decrecientes en el plasma como se demuestra tanto por inmunocitoquímica como ELISA. En los cerebros de ratones tg, el anticuerpo 9E4-FITC se detectó en asociación con agregados de a-sin granulares en neuronas. Estos agregados se co-marcaron con anticuerpos contra marcadores lisosómicos (catepsina D). Experimentos de control con un IgG-FITC no inmune muestran solo marcado de fondo en ratones no tg y tg para alfa-sin. Además, el inmunomarcado de secciones de ratones tg para alfa-sin con CSF de ratones tratados con 9E4-FITC inmunomarcó sinapsis y neuronas en secciones de ratones tg para alfa-sin sin tratar, a diferencia no se observó marcado con el CSF de ratones tratados con IgG-FITC no inmune.

La eliminación de alfa-sin en los ratones tg inmunizados con 9E4 se relacionó probablemente con la activación de la vía de autofagia debido a que niveles de beclina-1, escisión de LC3 y Atg5 aumentaron y se co-localizaron con los agregados de α-sin en las neuronas de ratones tg inmunizados (véase la FIG 16). Estos resultados sugieren que un anticuerpo monoclonal contra un epítopo en o cerca del extremo C de α-sin pasa al SNC, reconoce agregados en neuronas afectadas y desencadena la eliminación mediante una vía lisosómica, tal como autofagia. La Fig. 17 ilustra tales vías. A la izquierda de la figura, el anticuerpo se une a alfa sinucleína unida a la membrana desde fuera de las células, y el complejo resultante se endocita y combina con un lisosoma dentro de la célula que forma un autofagosoma y que desencadena la degradación por enzimas lisosómicas. A la derecha de la figura, alfa-sinucleína y el anticuerpo para alfa-sinucleína se endocitan por separado, aumentando el anticuerpo probablemente la entrada mediante receptores de Fc, y se combinan con un lisosoma en la célula, seguido de degradación lisosómica.

DEPÓSITO

Las siguientes líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales se han depositado bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) en las fechas indicadas:

Anticuerpo monoclonal	Línea celular	Epitopo/Especificidad	Isotipo	Fecha de depósito	Acceso No.
11 A5	JH22.11 A5.6.29.70.54.16.14	alfa-sinuclein residuos 124-134 phospoSER129	IgG1	26-Feb 2007	PTA-8222
8 A5	JH4.8A5.25.7.36	alfa-sinuclein término C	IgG1	4-Ago 2005	PTA-6909
1H7	JH17.1H7.4.24.34	alfa-sinuclein residuos 91-99	IgG1	26-Feb 2007	PTA-8220
9E4	JH17.9E4.3.37.1.14.2	alfa-sinuclein residuos 118-126	IgG1	26-Feb 2007	PTA-8221
6H7	JH17.6H7.1.54.28	alfa-sinuclein término C	IgG1	4-Ago 2005	PTA-6910

Será evidente para un experto habitual en la materia que muchos cambios y modificaciones pueden hacerse a la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas. A menos que sea de otro modo evidente del contexto, cualquier etapa, característica, realización o aspecto pueden usarse en combinación entre sí.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ELAN PHARMACEUTICALS, INC. THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD SINUCLEINOPÁTICA Y AMILOIDOGÉNICA

<130> 015270-008980EP

<140>
<141>
<150> PCT/US2008/002392
<151> 2008-02-22

<150> 60/984,721
<151> 2007-11-01

<150> 11/697,646
<151> 2007-04-06

<150> 11/710,248
<151> 2007-02-23

<160> 57

<170> PatentIn versión 3.5

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

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Gly Phe Val
        35
```

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

<400> 3

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

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

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Virus de la gripe

<400> 4

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

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

<400> 5

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

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Virus de Hepatitis

<400> 6

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

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

<400> 7

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

Asn Glu Gly

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

<400> 8

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

<210> 9
<211> 15
<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<400> 9

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

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

<400> 10

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

Ala Ser His Leu Glu
20

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Virus de Immunodeficiencia Humana

<400> 11

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

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> ciclohexilalanina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazo="Tyr" o "Phe"

<220>
<221> misc_ característica
<222> (3)..(3)
<223> /nota=" Determinado residuo en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de la anotación para dicha posición "

<220>
<221> misc_ característica
<222> (1)..(13)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de los sustitutos y realizaciones preferidas "

<400> 12

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

<210> 13
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético "
<400> 13

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

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético "
<400> 14

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

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Amino-heptanoico ácido
<400> 15

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

<210> 16
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>

<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo ="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_ característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>

<221> misc_ característica
<222> (1)..(29)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las realizaciones preferentes "

<400> 16

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


Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
            20                  25
```

<210> 17
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys=Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> / reemplazo ="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_ característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_ característica
<222> (1)..(35)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las realizaciones preferentes "

<400> 17

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

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

His Leu Glu
35

<210> 18
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> / reemplazo ="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_ característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_ característica
<222> (1)..(29)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 18

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

Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20 25

<210> 19
<211> 50
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>

<221> misc_característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(50)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 19

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

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

Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His
        35                  40                  45

Leu Glu
    50
```

<210> 20
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> salida
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Ciclohexilalanina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazo="Tyr" o "Phe"

<220>
<221> misc_característica
<222> (3)..(3)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de la anotación para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(27)
<223> /reemplazo ="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(27)
<223> /reemplazo ="Cys-Amino-heptanoic acid-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (14)..(27)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> misc_ característica
<222> (1)..(27)
<223> /nota="Ver especificación como se ha presentado para la descripción detallada de las sustituciones y las realizaciones preferidas"

<400> 20

Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Lys Glu Gln
1 5 10 15

Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr
20 25

<210> 21
<211> 55
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (15)..(28)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val--Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (15)..(28)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>

<221> misc_característica
<222> (15)..(28)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (29)..(42)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANT
<222> (29)..(42)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (29)..(42)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (45)..(45)
<223> ciclohexilalanina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (45)..(45)
<223> /reemplazo="Tyr" o "Phe"

<220>
<221> misc_característica
<222> (45)..(45)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(55)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 21

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

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

Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Ala Lys Ala Val Ala Ala
        35                  40                  45

Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
    50                  55
```

<210> 22
<211> 69
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota= Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> ciclohexilalanina

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazo="Tyr" o "Phe"

<220>
<221> misc_característica
<222> (3)..(3)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(27)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANT
<222> (14)..(27)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (14)..(27)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (28)..(41)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"
<220>

<221> VARIANTE
<222> (28)..(41)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (28)..(41)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (42)..(55)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (42)..(55)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoic acid-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"
<220>
<221> misc_característica

<222> (42)..(55)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (56)..(69)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (56)..(69)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (56)..(69)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(69)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 22

```
Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Lys Glu Gln
1               5                   10                  15

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

Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr Asn Val
        35                  40                  45

Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly
    50                  55                  60

Gly Ala Val Val Thr
65
```

<210> 23
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético”

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE

<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoic acid-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota="Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> ciclohexilalanina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (17)..(17)
<223> /reemplazo="Tyr" o "Phe"

<220>
<221> misc_característica
<222> (17)..(17)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(27)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 23

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

Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
            20                  25
```

<210> 24
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(31)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 24

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

Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20 25 30

<210> 25
<211> 55
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(27)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly".

<220>
<221> VARIANTE
<222> (14)..(27)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoic acid-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (14)..(27)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (28)..(41)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (28)..(41)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (28)..(41)
<223> /nota: “Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (42)..(55)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANT
<222> (42)..(55)

<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (42)..(55)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(55)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 25

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

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

Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr Asn Val
        35                  40                  45

Cys Gly Gly Ala Val Val Thr
    50                  55
```

<210> 26
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoic acid-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "
<220>
<221> VARIANT
<222> (28)..(41)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANT
<222> (28)..(41)

<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (28)..(41)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica

<222> (1)..(41)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas"

<400> 26

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

Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Lys Glu Gln Val Thr
            20                  25                  30

Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr
        35                  40
```

<210> 27
<211> 55
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (15)..(28)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (15)..(28)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (15)..(28)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (29)..(42)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (29)..(42)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222>.(29)..(42)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(55)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 27

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

Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val

            20                  25                  30

Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Pro Lys Tyr Val Lys Gln
        35                  40                  45

Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
    50                  55
```

<210> 28
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)

<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (15)..(28)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (15)..(28)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (15)..(28)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(41)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 28

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

Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Pro Lys Tyr Val
            20                  25                  30

Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
        35                  40
```

<210> 29
<211> 171
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica

<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (80)..(93)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (80)..(93)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (80)..(93)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (94)..(107)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (94)..(107)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (94)..(107)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANT
<222> (108)..(121)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (108)..(121)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (108)..(121)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (122)..(135)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"_

<220>
<221> VARIANT
<222> (122)..(135)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>

<221> misc_característica
<222> (122)..(135)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(171)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas"

<400> 29

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

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

Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Gln Tyr Ile Lys Ala
        35                  40                  45

Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val
    50                  55                  60

Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Lys
65                  70                  75                  80

Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln
                85                  90                  95

Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr
            100                 105                 110

Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Lys Glu Gln Val Thr Asn Val
        115                 120                 125

Cys Gly Gly Ala Val Val Thr Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
    130                 135                 140

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
145                 150                 155                 160

Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
                165                 170
```

<210> 30
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoic acid-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(14)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (52)..(65)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (52)..(65)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (52)..(65)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (103)..(116)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (103)..(116)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (103)..(116)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>

<221> misc_característica
<222> (1)..(116)
<223>./nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 30

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

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

Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser
35 40 45

His Leu Glu Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly Ala Val Val
50 55 60

Thr Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
65 70 75 80

Cys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val
85 90 95

Ser Ala Ser His Leu Glu Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Cys Gly Gly
100 105 110

Ala Val Val Thr
115

<210> 31
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln-Lys-Thr-Val-Glu-Cys-Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(14)
<223> /reemplazo="Cys-Amino-heptanoico acido-Lys-Asn-Glu-Glu-Gly-Ala-Pro-Cys-Gln-Glu-Gly"

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(14)

<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(29)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 31

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

Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
            20                  25
```

<210> 32
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<400> 32

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

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

<210> 33
<211> 43
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

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

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

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

<210> 34
<211> 22
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<400> 34

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

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 35
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<400> 35

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
1 5 10 15

Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
20 25

<210> 36
<211> 43
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético "

<400> 36

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

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

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

<210> 37
<211> 22
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<400> 37

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

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
20

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> ciclohexilalanina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazo="Tyr" o "Phe"

<220>
<221> misc_característica
<222> (3)..(3)
<223> /nota=" Los residuos que figuran en la secuencia no tienen una preferencia con respecto a los de las anotaciones para dicha posiciones "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(20)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 38

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

Phe Arg His Asp
20

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

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> ciclohexilalanina

<220>
<221> VARIANTE

<222> (24)..(24)
<223> /reemplazo="Tyr" o "Phe"

<220>
<221> misc_característica
<222> (24)..(24)
<223> /nota=" Determinado residuo en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de la anotación para dicha posición "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(34)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 39

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

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

                        Ala Ala
```

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

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético "

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> ciclohexilalanina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazo="Tyr" o "Phe"

<220>
<221> misc_característica
<222> (3)..(3)
<223> /nota=" Determinado residuo en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de la anotación para dicha posición "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(34)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 40

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

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

His Asp

<210> 41
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético " ..

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> ciclohexilalanina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazo="Tyr" o "Phe"

<220>
<221> misc_característica
<222> (10)..(10)
<223> /nota=" Determinado residuo en la secuencia no tiene preferencia con respecto a los de la anotación para dicha posición "

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(20)
<223> /nota=" Ver especificación como se declaró en la descripción detallada de las sustituciones y las formas de realización preferidas "

<400> 41

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

Lys Ala Ala Ala
20

<210> 42
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<400> 42

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 43
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<400> 43

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 44
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<400> 44

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

Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg
20

<210> 45
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético "

<400> 45

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

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

His Asp

<210> 46
<211> 27
<212> PRT.
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<400> 46

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

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

<210> 47
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético "

<400> 47

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

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

Ala Thr
```

<210> 48
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético”

<400> 48

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

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

<210> 49
<211> 79
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético "

<400> 49

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

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

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

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

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

<210> 50
<211> 56
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético "

<400> 50

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

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

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

Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
50 55

<210> 51
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético "

<400> 51

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

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

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

<210> 52
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético "

<400> 52

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

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

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

Arg His Asp
    50
```

<210> 53
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Salida
<223> /nota=" Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético "

<400> 53

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

Ile Gly Ile Thr Glu Leu
            20
```

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

<400> 54

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

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

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

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Ácido amino-heptanoico

<400> 56

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

<210> 57
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(1)
<223> /nota=" N-plazo acetilado "

<400> 57

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

Ala

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo dentro de los residuos 118-126 de la alfa-sinucleína humana, los residuos estando numerados según de acuerdo con la SEC ID Nº: 1, para su uso en profilaxis o tratamiento de una enfermedad del cuerpo de Lewy (ECL) seleccionada de la enfermedad de Parkinson, incluyendo enfermedad de Parkinson idiopática, demencia con cuerpos de Lewy (DCL), enfermedad del cuerpo de Lewy difusa (ECLD), variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA), fallo autonómico puro, disfagia del cuerpo de Lewy, ECL incidental, ECL hereditaria, atrofia sistémica múltiple, atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome de Shy-Drager, en donde el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal 9E4 por unirse a la alfa-sinucleína humana, en donde el anticuerpo 9E4 es producido por el hibridoma JH17.9E4.3.37:1.14.2 depositado como número de acceso de ATCC PTA-8221.

2. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

3. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

4. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, o un anticuerpo humanizado.

5. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG1 humano.

6. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra con un vehículo farmacéutico como una composición farmacéutica.

7. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra a una dosificación de 0,0001 a 100 mg de anticuerpo/kg de peso corporal.

8. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra en múltiples dosificaciones durante por lo menos seis meses.

9. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra por vía intraperitoneal, oral, subcutánea, intracraneal, intramuscular, tópica, intranasal o intravenosa.

10. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra por una vía periférica.

11. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra a una dosis de 1-10 mg/kg.

12. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el anticuerpo se administra por una vía periférica, y reduce los cuerpos de Lewy intracelulares o la agregación de alfa sinucleína por una vía lisosomal.

13. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo entra en una célula que contiene un cuerpo de Lewy o agregación de alfa sinucleína por endocitosis,
opcionalmente, en donde

(i) el anticuerpo se une a la sinucleína alfa unida a la membrana desde el exterior de la célula y un complejo de anticuerpo y la sinucleína alfa se endocitan en la célula y se combinan con un lisosoma dentro de la célula, o
(ii) el anticuerpo y la alfa sinucleína se endocitan por separado y se combinan con un lisosoma dentro de la célula.

14. El uso de un anticuerpo como se define en cualquier reivindicación anterior en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad del cuerpo de Lewy (ECL) seleccionada de la enfermedad de Parkinson, incluyendo la enfermedad de Parkinson idiopática, demencia con cuerpos de Lewy (DCL), enfermedad difusa del cuerpo de Lewy (EDCL), variante del cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (VCLEA), fallo autonómico puro, disfagia del cuerpo de Lewy, ECL incidental, ECL hereditaria, atrofia sistémica múltiple, atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome Shy-Drager.

Residuo # 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
(SEQ ID NO:1) MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAE
Residuo # 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110
(SEQ ID NO:1) KTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQE
(SEQ ID NO:2) EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV (residuos 61-95)
(SEQ ID NO:3) KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (residuos 60-87)
Residuo # 115 120 125 130 135 140
(SEQ ID NO:1) GILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA (residuos 1-140)

Fig. 1

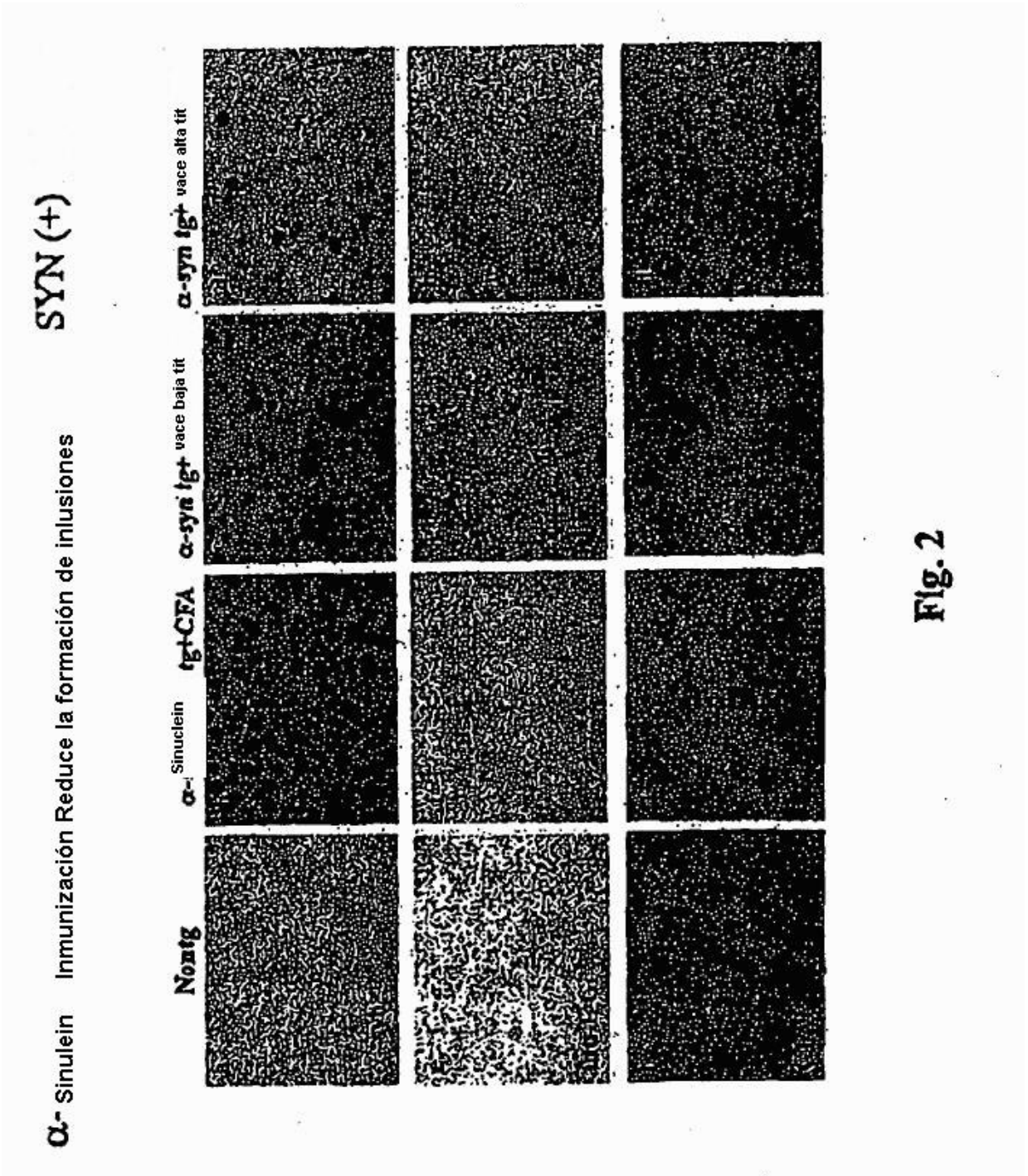

α- Sinulein Inmunización Reduce la formación de inlusiones
SYN (+)
Nontg
α-Sinuclein tg+CFA
α-syn Ig+ vace baja tit
α-syn Ig+ vace alta tit

Fig. 2

Figs. 3A-D

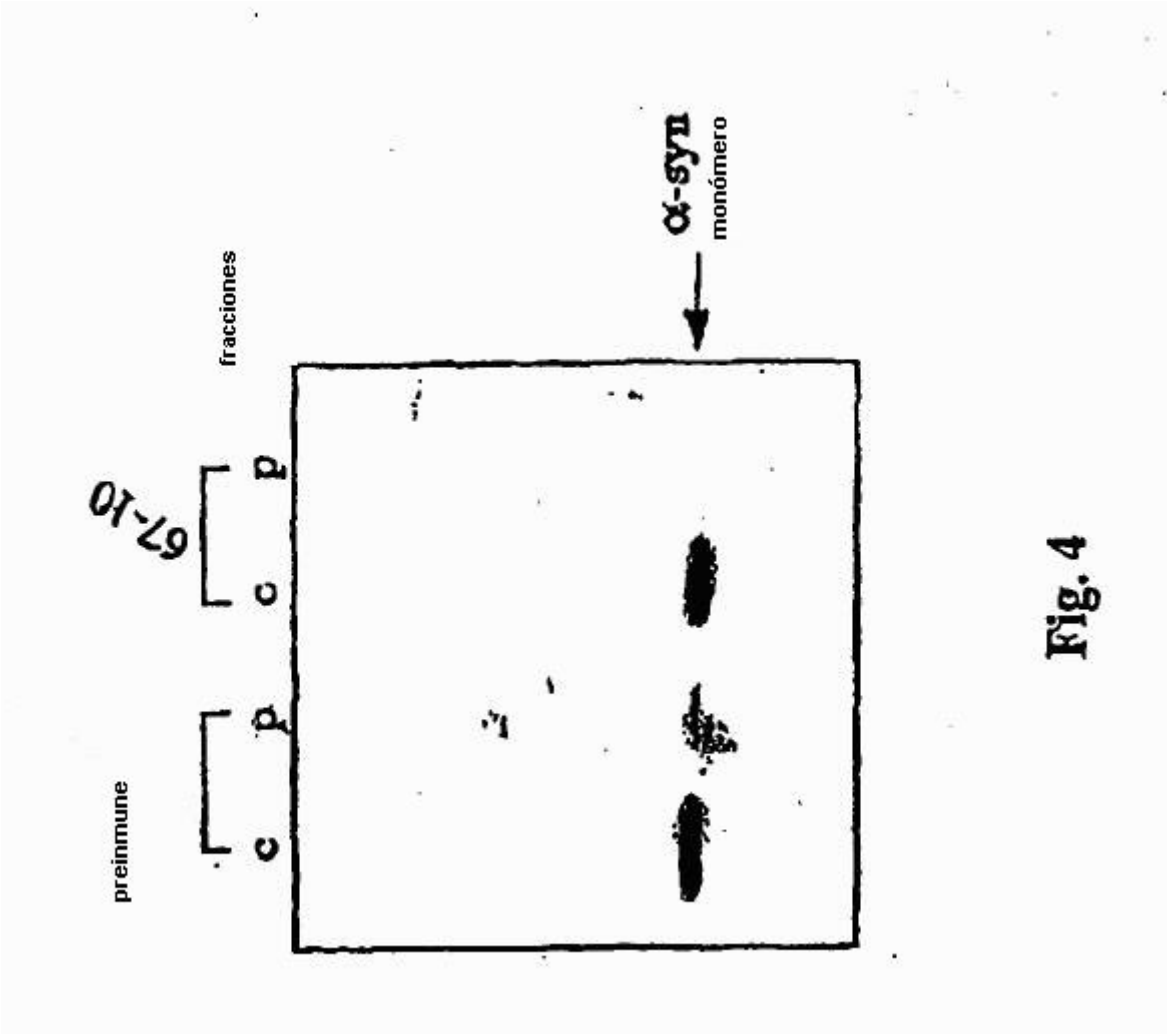


Fig. 4

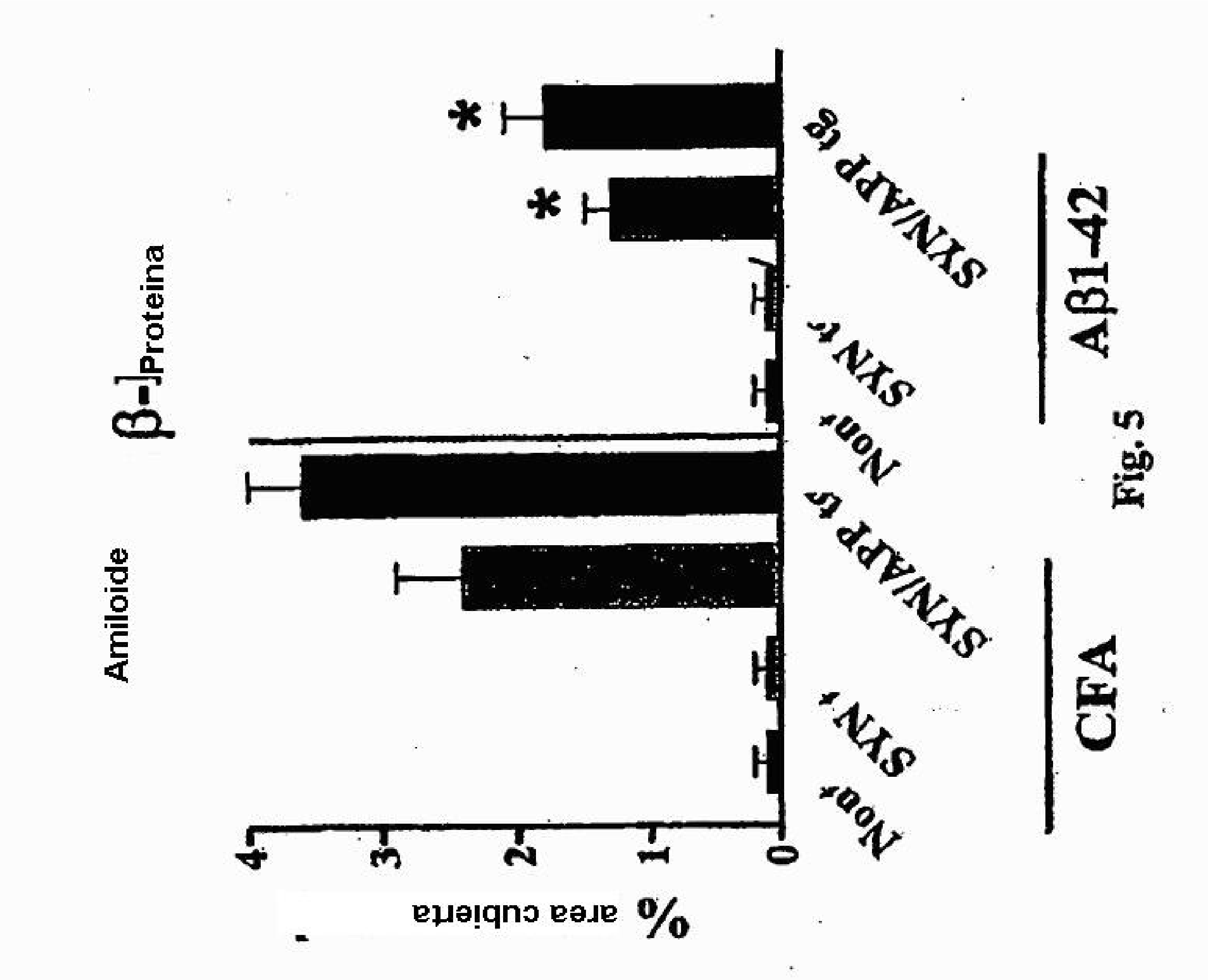

Amiloide
β-]Proteina
% area cubierta
0
1
2
3
4
Non-tg
SYN tg
SYN/APP tg
Non-tg
SYN tg
SYN/APP tg
CFA
Aβ1-42

Fig. 5

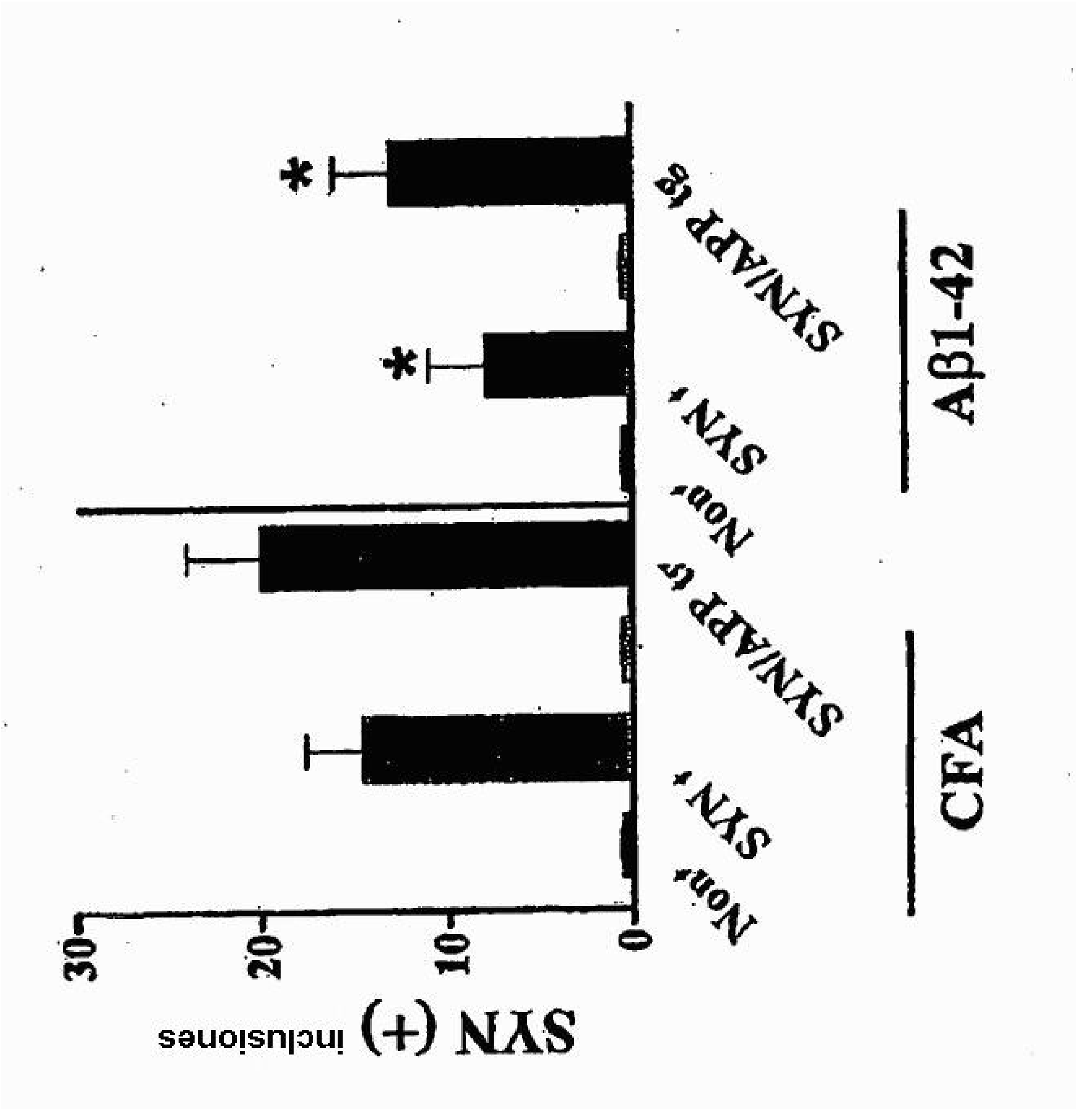

SYN (+) inclusiones
0
10
20
30
Non tg
SYN tg
SYN/APP tg
Non tg
SYN tg
SYN/APP tg
CFA
Aβ1-42
*
*

Fig. 6

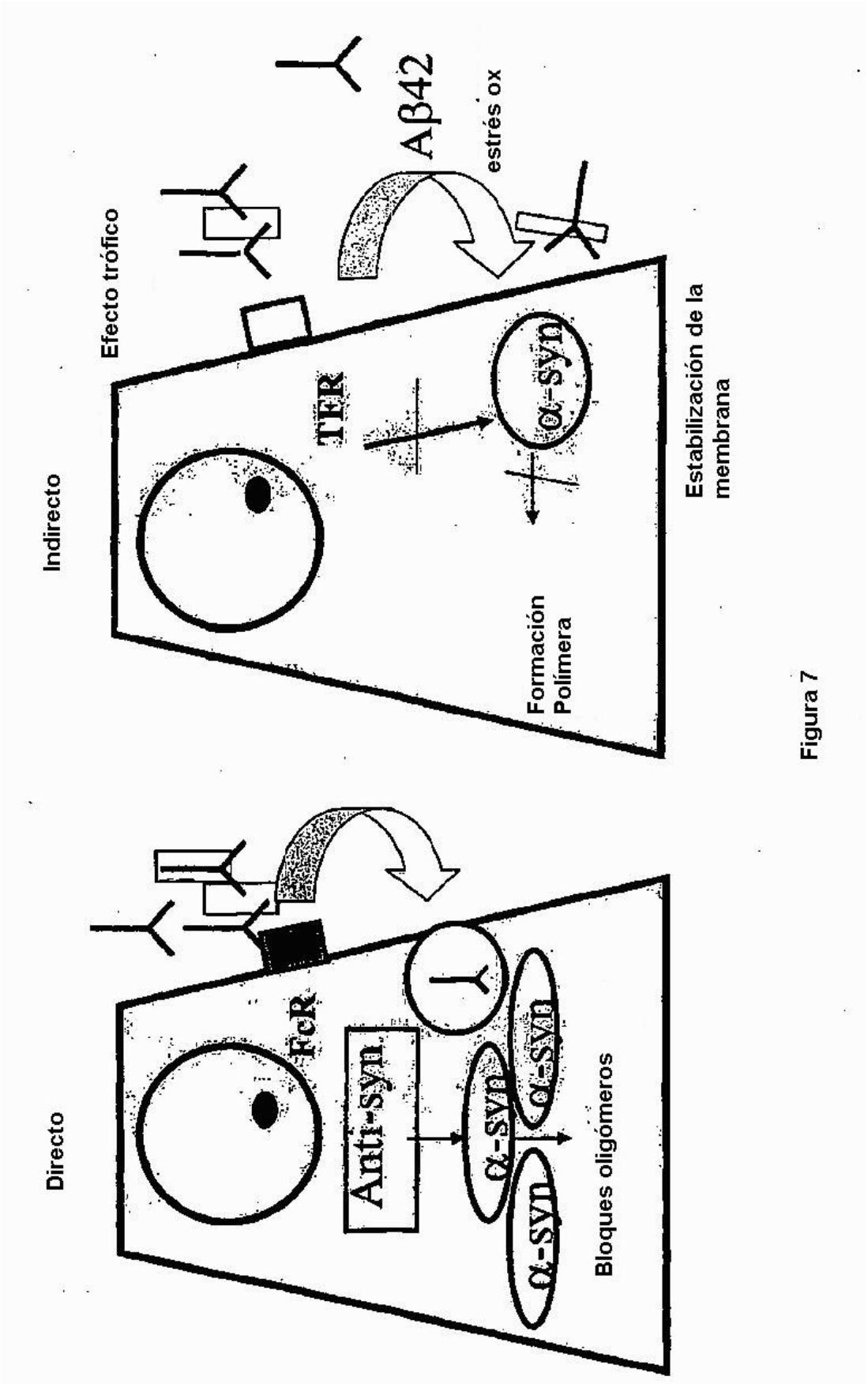

Directo
FcR
Anti-syn
α-syn
α-syn
α-syn
Bloques oligómeros
Indirecto
Efecto trófico
TER
α-syn
Aβ42
estrés ox
Formación Polímera
Estabilización de la membrana

Figura 7

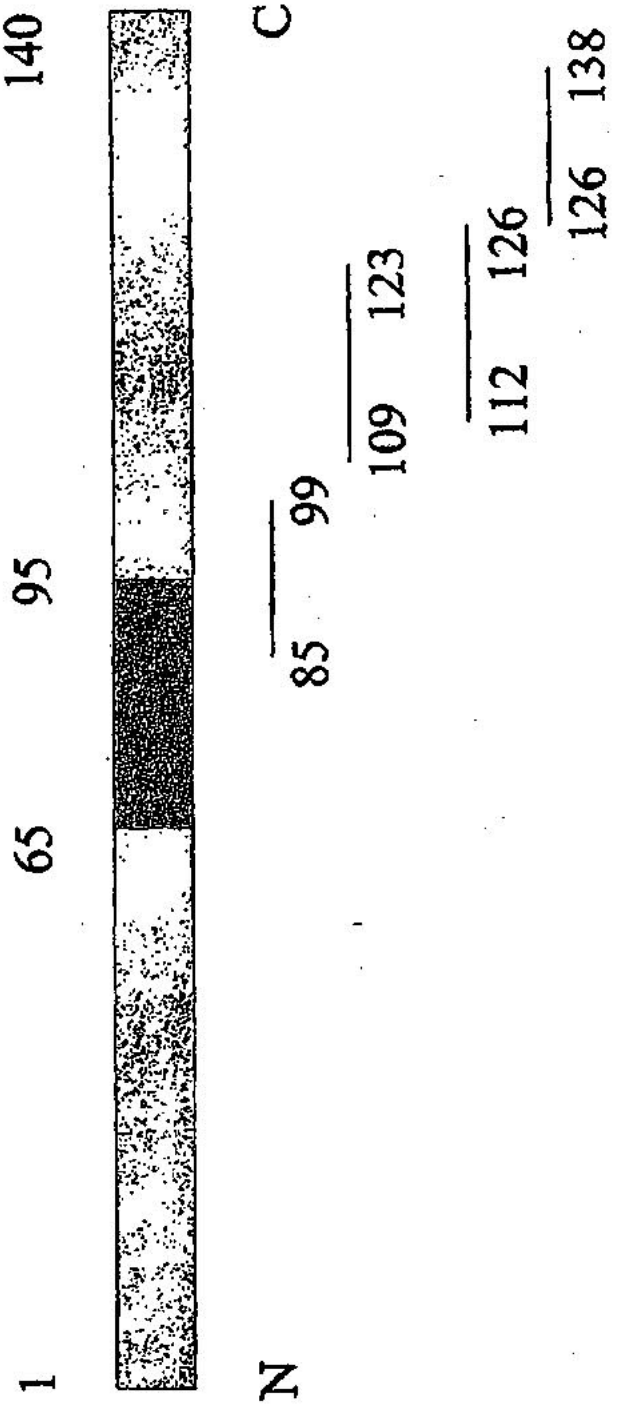


Fig. 8

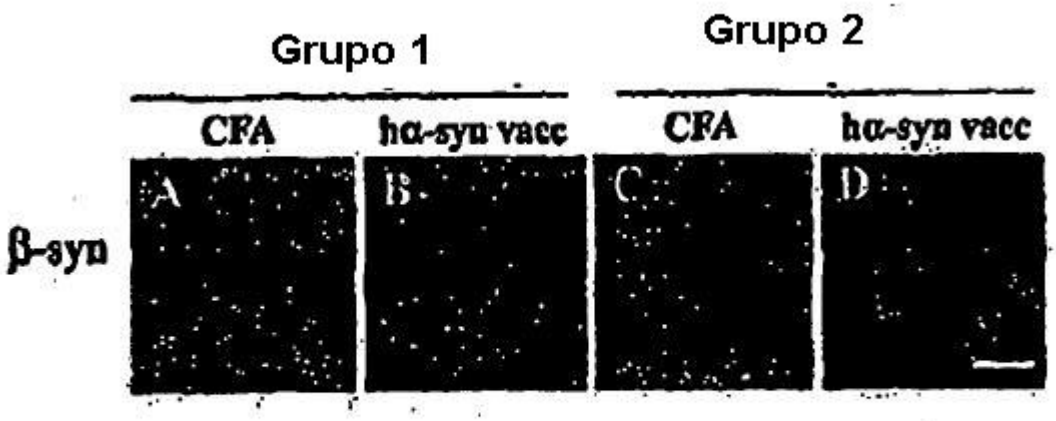


Fig. 9

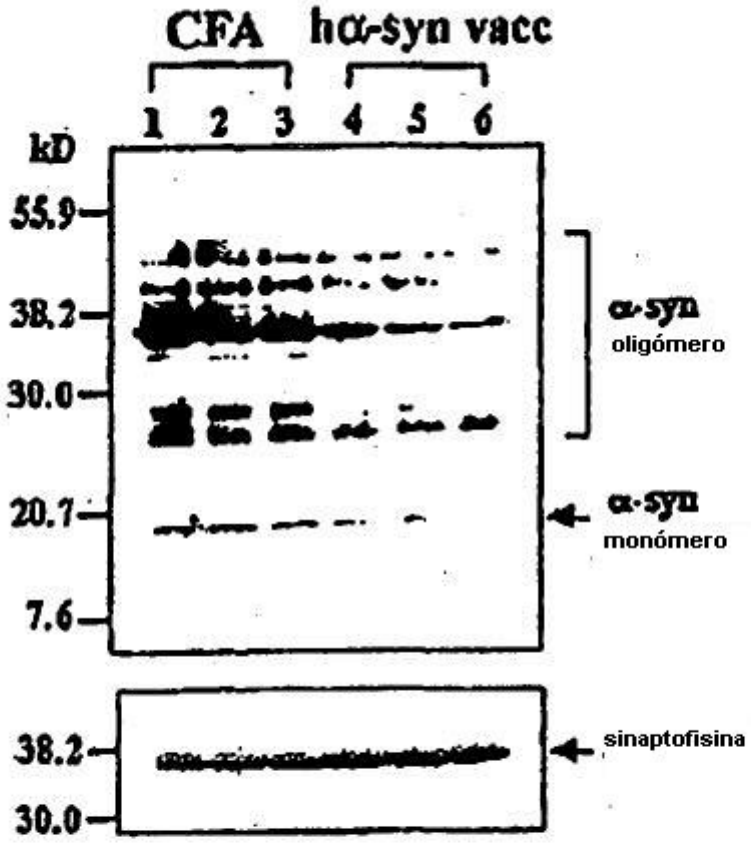

CFA
hα-syn vacc
1 2 3 4 5 6
kD
55.9
38.2
30.0
20.7
7.6
α-syn
oligómero
α-syn
monómero
38.2
30.0
sinaptofisina

Fig. 10

Porcentaje de Reducción de Agregados Alfa-Sinucleína
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
IgG1
11A5
8A5
IgG1
9G5
23E8
6H7
IgG2a
IgG2b
4B1
5C12
Grupo 1
Grupo 2
Grupo 3

Figura 11

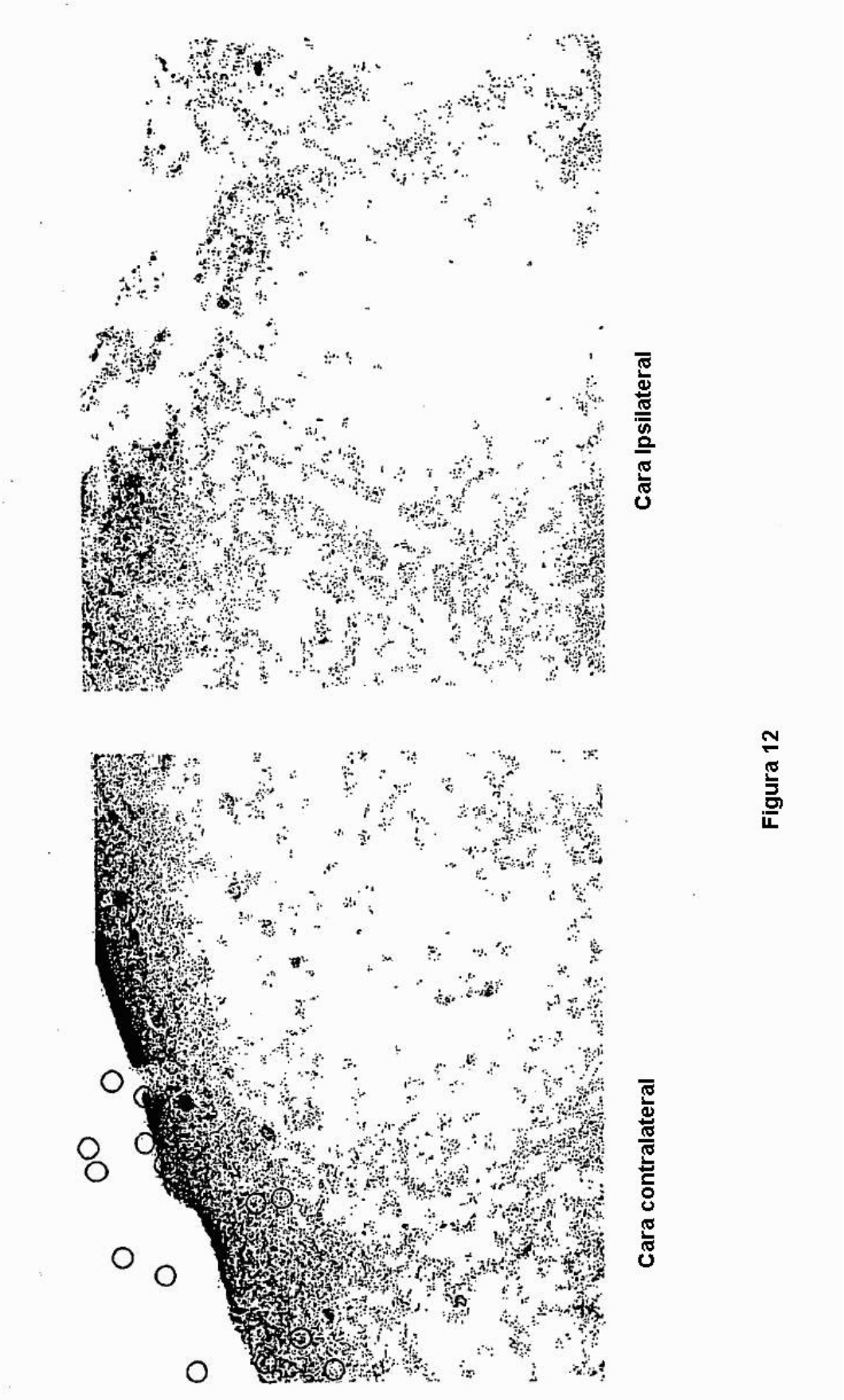


Figura 12

Figura 13

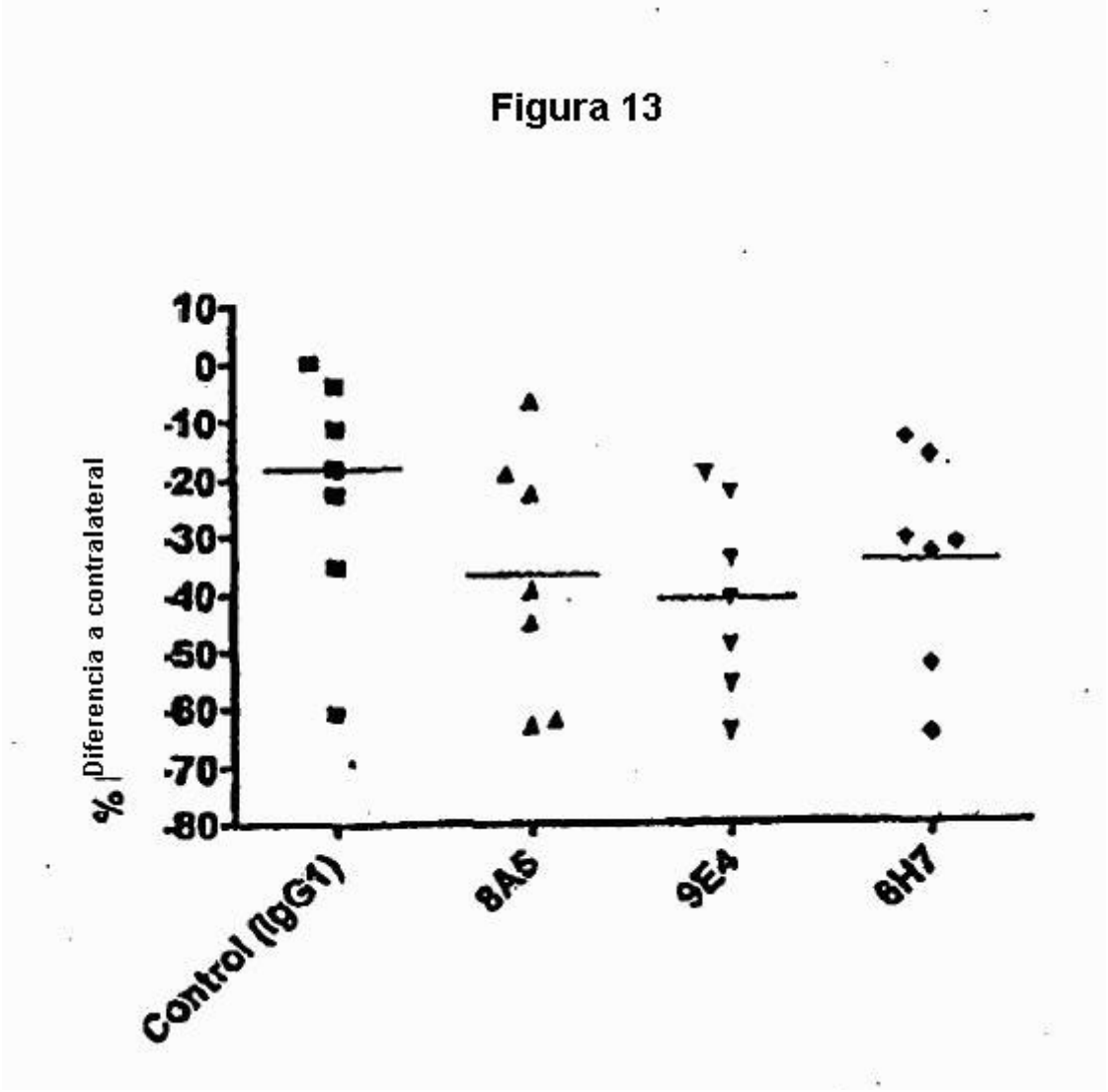

% Diferencia a contralateral
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
Control (IgG1)
8A5
9E4
6H7

FIGURA 14

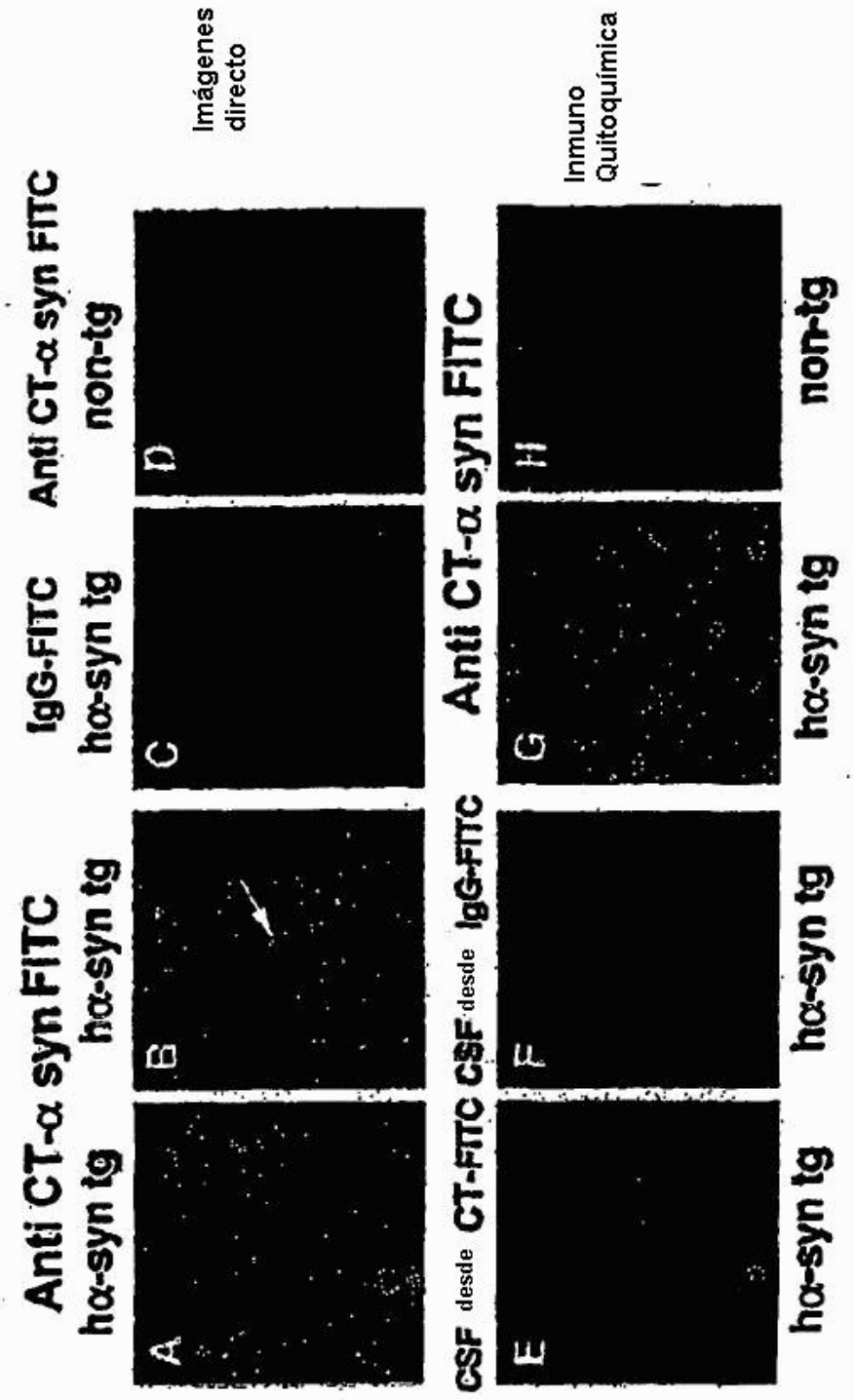

Anti CT-α syn FITC
hα-syn tg
hα-syn tg
IgG-FITC
hα-syn tg
Anti CT-α syn FITC
non-tg
Imágenes directo
A
B
C
D
CSF desde
hα-syn tg
CT-FITC
hα-syn tg
CSF desde
hα-syn tg
IgG-FITC
hα-syn tg
Anti CT-α syn FITC
hα-syn tg
non-tg
Inmuno Quitoquímica
E
F
G
H

Figura 15

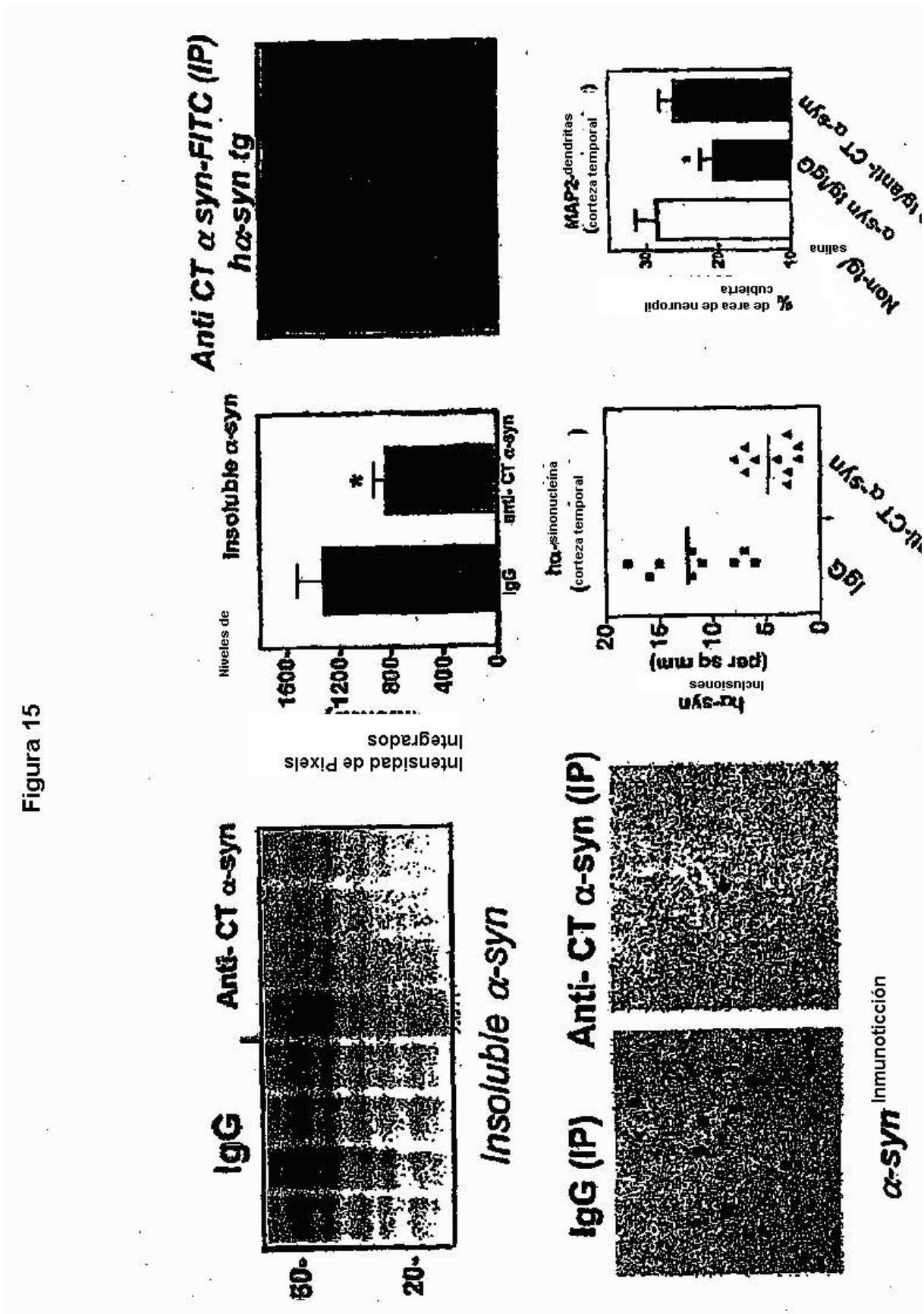

IgG
Anti- CT α-syn
Insoluble α-syn
Intensidad de Pixels Integrados
Niveles de
Insoluble α-syn
IgG
anti- CT α-syn
Anti CT α syn-FITC (IP)
hα-syn tg
IgG (IP)
Anti- CT α-syn (IP)
α-syn Inmunoticción
hα-syn Inclusiones (per sq mm)
hα-sinonucleína (corteza temporal)
IgG
Anti-CT α-syn
MAP2-dendritas (corteza temporal)
% de area de neuropil cubierta
Non-Ig/ salina
α-syn tg/IgG
tg/anti- CT α-syn

FIGURA 16

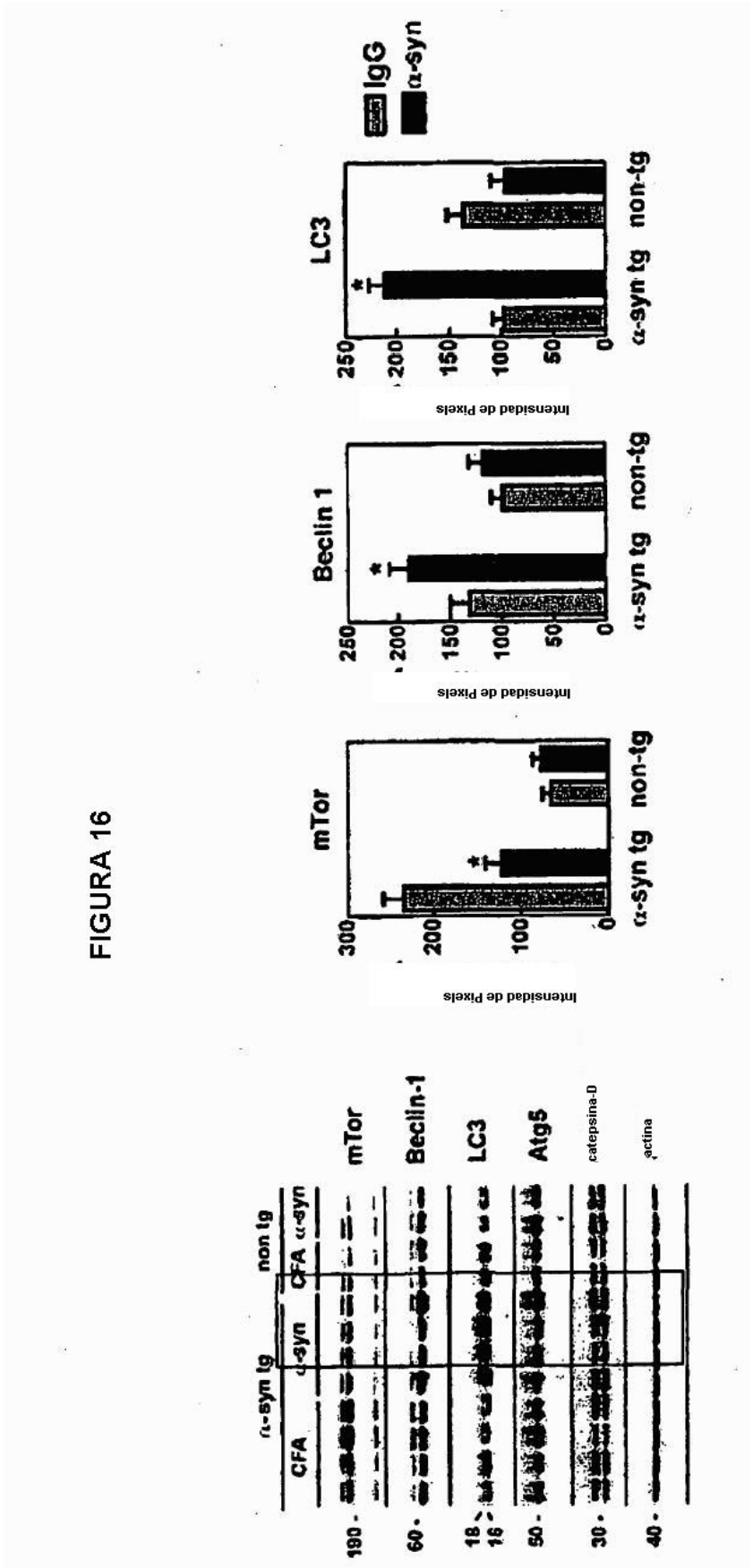
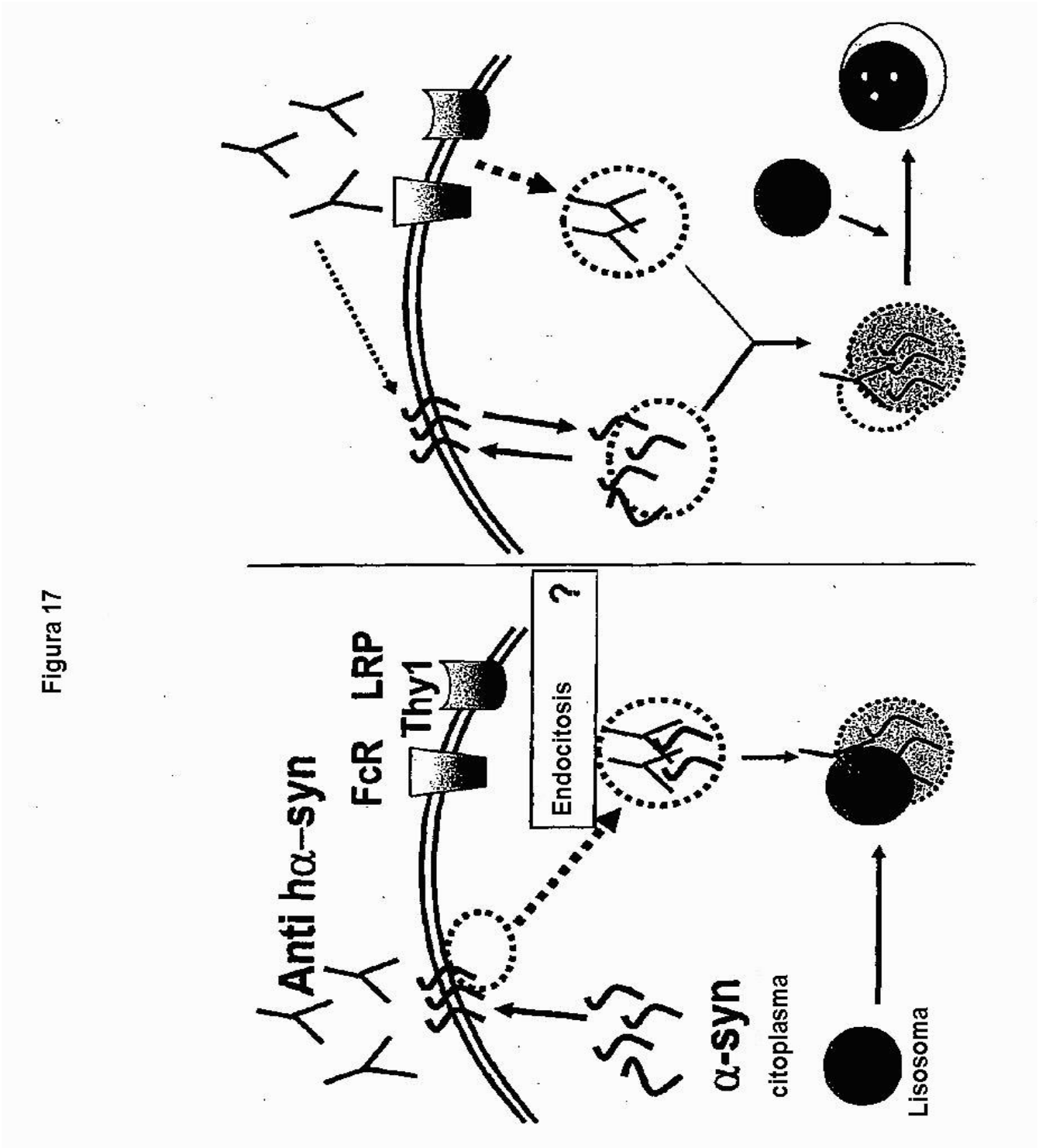

α-syn tg
non tg
CFA
α-syn
CFA α-syn
mTor
Beclin-1
LC3
Atg5
catepsina-D
actina
190
60
18
16
50
30
40
mTor
Beclin 1
LC3
IgG
α-syn
Intensidad de Pixels
α-syn tg
non-tg

Figura 17


Anti hα–syn
FcR
LRP
Thy1
Endocitosis
?
α-syn
citoplasma
Lisosoma