

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 457**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 49/16 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/US2013/023307**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13112945**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13740871 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2807188**

54 Título: **Anticuerpos humanizados que reconocen la alfa-sinucleína**

30 Prioridad:

27.01.2012 US 201261591835 P

08.10.2012 US 201261711207 P

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

20.03.2020

73 Titular/es:

**PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)
77 Sir Rogerson's Quay, Block C, Grand Canal
Docklands
Dublin 2, D02 T804, IE**

72 Inventor/es:

**SALDANHA, JOSE y
NIJJAR, TARLOCHAN S.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 749 457 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados que reconocen la alfa-sinucleína

Antecedentes

5 Las sinucleinopatías, incluidas las enfermedades de cuerpos de Lewy (LBD) se caracterizan por la degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deterioro cognitivo y formación de cuerpos de Lewy (LB) y/o neuritas de Lewy. (McKeith et al., *Neurology* (1996) 47: 1113-24). Las sinucleinopatías incluyen la enfermedad de Parkinson (incluida la enfermedad de Parkinson idiopática), la enfermedad de cuerpos de Lewy difusos (DLBD), también conocida como demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV), la enfermedad combinada de Alzheimer y Parkinson, insuficiencia autonómica pura y atrofia de múltiples sistemas (MSA; p. ej., atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome de Shy-Drager). Se cree que varios signos y síntomas no motores son señales tempranas de sinucleinopatías en la fase prodrómica de las enfermedades (es decir, el período presintomático, subclínico, preclínico o premotor). Tales signos tempranos incluyen, por ejemplo, el trastorno del comportamiento del sueño REM (RBD), pérdida del olfato y estreñimiento (Mahowald et al., *Neurology* (2010) 75: 488-489). Las enfermedades de cuerpos de Lewy siguen siendo una causa común de trastornos del movimiento y deterioro cognitivo en la población anciana (Galasko et al., *Arch. Neurol.* (1994) 51: 888-95).

La alfa-sinucleína es parte de una gran familia de proteínas que incluye beta- y gamma-sinucleína y sinoretina. La alfa-sinucleína se expresa en el estado normal asociado con las sinapsis, y se cree que juega un papel en la plasticidad neuronal, el aprendizaje y la memoria. Varios estudios han implicado a la alfa-sinucleína con un papel central en la patogénesis de la EP. La proteína puede agregarse para formar fibrillas insolubles en condiciones patológicas. Por ejemplo, la sinucleína se acumula en los LB (Spillantini et al., *Nature* (1997) 388: 839-40; Takeda et al., *J. Pathol.* (1998) 152: 367-72; Wakabayashi et al., *Neurosci. Lett.* (1997) 239: 45-8). Las mutaciones en el gen de alfa-sinucleína co-segregan con formas familiares raras de parkinsonismo (Kruger et al., *Nature Gen.* (1998) 18: 106-8; Polymeropoulos, et al., *Science* (1997) 276: 2045-7). La sobreexpresión de alfa sinucleína 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 enfermedad de cuerpos de Lewy. Además, se ha sugerido que los oligómeros solubles de sinucleína pueden ser neurotóxicos (Conway et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97: 571-576; Volles et al., *J. Biochemistry* (2003) 42: 7871-7878). La acumulación de alfa-sinucleína con alteraciones morfológicas y neurológicas similares en especies y modelos animales tan diversos como humanos, ratones y moscas sugiere que esta molécula contribuye al desarrollo de la enfermedad de cuerpos de Lewy. El documento US20090208487-A discute agentes y métodos para el tratamiento de enfermedades asociadas con enfermedades sinucleinopáticas, que incluyen los cuerpos de Lewy de alfa-sinucleína en el cerebro de un paciente. Se discuten varios anticuerpos monoclonales anti-sinucleína murinos.

Resumen de la invención reivindicada

35 La invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 23 y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 33 o 37. En algunos de tales anticuerpos, la K_D para la alfa-sinucleína del anticuerpo es de aproximadamente 0,5 a 2 de K_D para la alfa-sinucleína de un anticuerpo 1H7 murino o quimérico. En algunos de tales anticuerpos, la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 23 y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 37.

En algunos anticuerpos, la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 23 y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 33.

45 En cualquiera de los anticuerpos anteriores, la región variable de la cadena pesada madura puede fusionarse con una región constante de la cadena pesada, y la región constante de la cadena ligera madura puede fusionarse con una región constante de la cadena ligera.

En cualquiera de los anticuerpos anteriores, la región constante de la cadena pesada puede ser una forma mutante de la región constante humana natural que tiene una unión reducida a un receptor de Fc γ en relación con la región constante humana natural.

50 En cualquiera de los anticuerpos anteriores, la región constante de la cadena pesada puede ser del isotipo IgG1 humano. En algunos anticuerpos el alotipo es G1m3. En algunos anticuerpos, el alotipo es G1m1.

En algunos anticuerpos, la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 52 siempre que se pueda omitir el residuo de lisina C-terminal. En algunos anticuerpos, la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 49. En algunos anticuerpos, la región variable de la cadena pesada madura se fusiona con una región constante de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 52, siempre que el residuo de lisina C-terminal pueda omitirse y la

región constante de la cadena ligera madura se fusione con una región constante de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 49. En algunos anticuerpos, la cadena ligera madura comprende SEQ ID N°: 53 y la cadena pesada madura comprende SEQ ID N°: 56.

5 La invención proporciona además un ácido nucleico que codifica cualquiera de las regiones variables de la cadena pesada madura mencionadas anteriormente y/o cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera madura mencionadas anteriormente, por ejemplo, SEQ ID N°s: 22, 32 o 36.

La invención proporciona además una célula huésped que comprende un vector que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos descritos anteriormente.

10 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

15 La invención proporciona además el anticuerpo de la invención para el uso en un método de tratamiento de un paciente que tiene o corre el riesgo de tener una enfermedad de cuerpos de Lewy, y el método comprende administrar al paciente un régimen eficaz de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, se inhibe la disminución de la función cognitiva del paciente. En algunos métodos, se reducen los agregados de alfa sinucleína neuríticos y/o axonales. En algunos métodos, se reduce la distrofia neurítica del paciente. En algunos métodos, se conserva la densidad sináptica y/o dendrítica. En algunos métodos, el método conserva la sinaptofisina y/o MAP2 en el paciente.

20 La descripción proporciona además un método para reducir la formación de cuerpos de Lewy en un paciente que tiene o que corre riesgo de tener una enfermedad de cuerpos de Lewy, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, se inhibe la disminución de la función cognitiva del paciente. En algunos métodos, se reducen los agregados de alfa sinucleína neuríticos y/o axonales. En algunos métodos, se reduce la distrofia neurítica del paciente. En algunos métodos, se conserva la densidad sináptica y/o dendrítica. En algunos métodos, el método conserva la sinaptofisina y/o MAP2 en el paciente.

25 La descripción proporciona además un método para inhibir la agregación de sinucleína o eliminar los cuerpos de Lewy o los agregados de sinucleína en un paciente que tiene o que corre el riesgo de tener una enfermedad de cuerpos de Lewy, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, se inhibe la disminución de la función cognitiva del paciente. En algunos métodos, se reducen los agregados de alfa sinucleína neuríticos y/o axonales. En algunos métodos, se reduce la distrofia neurítica del paciente. En algunos métodos, se conserva la densidad sináptica y/o dendrítica. En algunos métodos, el método conserva la sinaptofisina y/o MAP2 en el paciente.

30 La descripción proporciona además métodos para detectar cuerpos de Lewy en un paciente que tiene o que corre el riesgo de tener una enfermedad de cuerpos de Lewy, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente, en donde el anticuerpo se une a los cuerpos de Lewy y se detecta el anticuerpo unido detectado. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, el anticuerpo está marcado.

35 La invención proporciona además un método para producir un anticuerpo, que comprende cultivar células transformadas con ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, de modo que la célula secreta el anticuerpo; y purificar el anticuerpo de los medios de cultivo celular; en donde el anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente.

40 La invención proporciona además un método que produce una línea celular que produce un anticuerpo, que comprende introducir un vector que codifica cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo y un marcador seleccionable en las células; propagar las células en condiciones para seleccionar las células que tienen un número de copias incrementado del vector; aislar células individuales de la célula seleccionada; y establecer un banco de células clonadas a partir de una única célula seleccionada en función del rendimiento de anticuerpo; en donde el anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Algunos de estos métodos comprenden además propagar las células en condiciones selectivas y cribar las líneas celulares que expresan y secretan naturalmente al menos 100 mg/L/10⁶ células/24 h.

50 **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de m1H7 con cuatro versiones de la región variable madura de la cadena pesada de 1H7 humanizada. BAC02037 (SEQ ID N°: 42) es la secuencia V_H aceptora humana. Las regiones CDR según la definición de Kabat están subrayadas y en negrita.

55 La FIG. 2 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de m1H7 con cuatro versiones de la región variable madura de la cadena ligera de 1H7 humanizado. AAY33358 (SEQ ID N°: 43) es una secuencia V_L aceptora humana. Las regiones CDR según la definición de Kabat están subrayadas y en negrita.

Las FIGS. 3 A-C muestran el análisis cinético de la unión a Biacore de 1H7 murino (A), 1H7 quimérico (B) y 1H7 humanizado Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv3, respectivamente.

5 La FIGS. 4 A-C muestran los parámetros cinéticos de unión (Forte-Bio) de 1H7 humanizado (Hu1H7VHv2-Hu1H7VLv4, Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv1, Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv2, Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv3, Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv4, Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv1) y de 1H7 quimérico.

La FIG. 5 muestra los resultados de la inmunoterapia pasiva con 1H7 sobre el rendimiento de la memoria en la prueba del laberinto acuático de Morris.

La FIG. 6 muestra los resultados de la inmunoterapia pasiva con 1H7 sobre la velocidad y los errores en la prueba de travesaño redondo.

10 Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID N°: 1 es la secuencia de aminoácidos de la alfa-sinucleína humana natural.

La SEQ ID N°: 2 es el dominio del componente no amiloide (NAC) de la alfa-sinucleína según lo informado por Jensen et al. (Biochem. J. 310 (Pt 1): 91-94, 1995; número de acceso a GenBank S56746).

15 La SEQ ID N°: 3 es el dominio del componente no amiloide (NAC) de alfa-sinucleína según lo informado por Ueda et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11282-6, 1993).

La SEQ ID N°: 4 es la secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada del anticuerpo 1H7 murino (m1H7).

La SEQ ID N°: 5 es la secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada de m1H7.

La SEQ ID N°: 6 es la secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera de m1H7.

La SEQ ID N°: 7 es la secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera de m1H7.

20 La SEQ ID N°: 8 es la secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada de m1H7 maduro.

La SEQ ID N°: 9 es la secuencia de aminoácidos variable de la cadena pesada de m1H7 maduro.

La SEQ ID N°: 10 es la secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera de m1H7 maduro.

La SEQ ID N°: 11 es la secuencia de aminoácidos variable de la cadena ligera de m1H7 maduro.

La SEQ ID N°: 12 es la CDR1 de la cadena pesada de m1H7 (definición de Kabat).

25 La SEQ ID N°: 13 es la CDR2 de la cadena pesada de m1H7 (definición de Kabat).

La SEQ ID N°: 14 es la CDR3 de la cadena pesada de m1H7 (definición de Kabat).

La SEQ ID N°: 15 es la CDR1 de la cadena ligera de m1H7 (definición de Kabat).

La SEQ ID N°: 16 es la CDR2 de la cadena ligera de m1H7 (definición de Kabat).

La SEQ ID N°: 17 es la CDR3 de la cadena ligera de m1H7 (definición de Kabat).

30 La SEQ ID N°: 18 es la secuencia de ácido nucleico de Hu1H7VHv1.

La SEQ ID N°: 19 es la secuencia de aminoácidos de Hu1H7VHv1.

La SEQ ID N°: 20 es la secuencia de ácido nucleico de Hu1H7VHv2.

La SEQ ID N°: 21 es la secuencia de aminoácidos de Hu1H7VHv2.

La SEQ ID N°: 22 es la secuencia de ácido nucleico de Hu1H7VHv3.

35 La SEQ ID N°: 23 es la secuencia de aminoácidos de Hu1H7VHv3.

La SEQ ID N°: 24 es la secuencia de ácido nucleico de Hu1H7VHv4.

La SEQ ID N°: 25 es la secuencia de aminoácidos de Hu1H7VHv4.

La SEQ ID N°: 26 es la secuencia de ácido nucleico de Hu1H7VHv5.

La SEQ ID N°: 27 es la secuencia de aminoácidos de Hu1H7VHv5.

40 La SEQ ID N°: 28 es la secuencia de ácido nucleico del péptido señal de Hu1H7VH.

- La SEQ ID N°: 29 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal de Hu1H7VH.
- La SEQ ID N°: 30 es la secuencia de ácido nucleico del péptido señal de Hu1H7VH.
- La SEQ ID N°: 31 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal de Hu1H7VH.
- La SEQ ID N°: 32 es la secuencia de ácido nucleico de Hu1H7VLv1.
- 5 La SEQ ID N°: 33 es la secuencia de aminoácidos de Hu1H7VLv1.
- La SEQ ID N°: 34 es la secuencia de ácido nucleico de Hu1H7VLv2.
- La SEQ ID N°: 35 es la secuencia de aminoácidos de Hu1H7VLv2.
- La SEQ ID N°: 36 es la secuencia de ácido nucleico de Hu1H7VLv3.
- La SEQ ID N°: 37 es la secuencia de aminoácidos de Hu1H7VLv3.
- 10 La SEQ ID N°: 39 es la secuencia de aminoácidos de Hu1H7VLv4.
- La SEQ ID N°: 40 es la secuencia de ácido nucleico del péptido señal de Hu1H7VL.
- La SEQ ID N°: 41 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal de Hu1H7VL.
- La SEQ ID N°: 42 es el aceptor humano BAC02037 (GI-21670055) utilizado para la secuencia de aminoácidos de la región estructural de la cadena pesada.
- 15 La SEQ ID N°: 43 es el aceptor humano AAY33358 (GI-63102905) utilizado para la secuencia de aminoácidos de la región estructural de la cadena ligera.
- La SEQ ID N°: 44 es la Hu1H7VH que no tiene retromutación o mutación de CDR.
- La SEQ ID N°: 45 es el Hu1H7V que no tiene retromutación o mutación de CDR.
- La SEQ ID N°: 46 es la secuencia para las alternativas de Hu1H7VH.
- 20 La SEQ ID N°: 47 es la secuencia para las alternativas de Hu1H7VL.
- La SEQ ID N°: 48 es la secuencia para las alternativas de Hu1H7VH CDR3.
- La SEQ ID N°: 49 es la región constante de la cadena ligera de Hu1H7 (con arginina) (común para v1-v4).
- La SEQ ID N°: 50 es la región constante de la cadena pesada de Hu1H7 (IgG1; común para v1-v5).
- La SEQ ID N°: 51 es la región constante de la cadena ligera Hu1H7 (sin arginina) (común para v1-v4).
- 25 La SEQ ID N°: 52 es la región constante de la cadena pesada de Hu1H7 (alotipo G1m3).
- La SEQ ID N°: 53 es la cadena ligera Hu1H7 versión 3 (región variable + región constante con arginina).
- La SEQ ID N°: 54 es la cadena ligera Hu1H7 versión 3 (región variable + región constante sin arginina).
- La SEQ ID N°: 55 es la versión 3 de la cadena pesada de Hu1H7 (región variable + región constante).
- La SEQ ID N°: 56 es la versión 3 de la cadena pesada de Hu1H7 (región variable + región constante; alotipo G1m3).
- 30 La SEQ ID N°: 57 es la región constante de la cadena pesada de Hu1H7 (IgG2).
- La SEQ ID N°: 58 es la región constante de la cadena pesada de Hu1H7 (alotipo G1m1).

Definiciones

- Los anticuerpos monoclonales se proporcionan típicamente en forma aislada. Esto significa que un anticuerpo está al menos un 50% p/p puro de proteínas y otras macromoléculas que surgen de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal se combine con un exceso de vehículo(s) farmacéutico(s) aceptable(s) u otro vehículo destinado a facilitar su uso. A veces, los anticuerpos monoclonales están al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95 o 99% p/p puros de proteínas y otras macromoléculas de la producción o purificación.
- 35

- La unión específica de un anticuerpo monoclonal a su antígeno objetivo significa una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M⁻¹. La unión específica es detectable con una mayor magnitud, y es distinguible de la unión inespecífica que se produce en al menos un objetivo no relacionado. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o una disposición espacial particular (por ejemplo, tipo de
- 40

cerradura y llave), mientras que la unión inespecífica suele ser el resultado de las fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la unión específica no implica necesariamente que un anticuerpo monoclonal se una a un solo objetivo.

La unidad estructural del anticuerpo básico es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, y cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. Esta región variable se expresa inicialmente vinculada a un péptido señal escindible. La región variable sin el péptido señal se denomina a veces región variable madura. Así, por ejemplo, una región variable madura de la cadena ligera significa una región variable de la cadena ligera sin el péptido señal de la cadena ligera. La parte carboxiterminal de cada cadena define una región constante que es la principal responsable de la función efectora.

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

Las regiones variables maduras de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones estructurales relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Las CDRs de las dos cadenas de cada par están alineadas mediante las regiones estructurales, permitiendo la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N-terminal al C-terminal, tanto la cadena ligera como la pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), o Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901 - 917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342: 878-883 (1989). Kabat también proporciona una convención de numeración ampliamente utilizada (numeración de Kabat) en la que a los residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se les asigna el mismo número (por ejemplo, H83 significa la posición 83 mediante la numeración de Kabat en la región variable madura de la cadena pesada; igualmente, la posición L36 significa la posición 36 mediante la numeración de Kabat en la región variable madura de la cadena ligera). La numeración de Kabat se utiliza en todo momento para referirse a las posiciones en la región variable de un anticuerpo, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del cual derivaron por la unión específica al objetivo, incluidas cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, diacuerpos, Dabs, nanocuerpos, y Fv. Los fragmentos pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye un anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo humanizado. 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 (véase, por ejemplo, Songvilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547 - 53 (1992)). En algunos anticuerpos biespecíficos, los dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes incluyen un par cadena pesada/cadena ligera de 1H7 humanizado y un par cadena pesada/cadena ligera específico de un epítipo diferente en alfa sinucleína que el que se une a 1H7.

En algunos anticuerpos biespecíficos, un par de cadena pesada/cadena ligera es un anticuerpo 1H7 humanizado como se describe adicionalmente más adelante, y el par de cadenas pesada/ligera es de un anticuerpo que se une a un receptor expresado en la barrera hematoencefálica, como un receptor de insulina, un receptor de factor de crecimiento similar a insulina (IGF), un receptor de leptina o un receptor de lipoproteínas, o un receptor de transferrina (Friden et al., *PNAS* 88: 4771-4775, 1991; Friden et al., *Science* 259: 373-377, 1993). Dicho anticuerpo biespecífico puede transferirse a través de la barrera hematoencefálica por medio de la transcitosis mediada por receptor. La captación cerebral del anticuerpo biespecífico puede mejorarse aún más modificando el anticuerpo biespecífico para reducir su afinidad al receptor de la barrera hematoencefálica. La afinidad reducida por el receptor dio lugar a una distribución más amplia en el cerebro (véase, por ejemplo, Atwal et al. *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu et al. *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares también pueden ser (1) un anticuerpo de dominio variable doble (DVD-Ig), donde cada cadena ligera y pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule*, en: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) un Tandab, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena simple que dan como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos objetivo; (3) un flexicuerpo, que es una combinación de scFvs con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (4) una molécula denominada molécula de "acoplamiento y cierre", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" de la proteína quinasa A, que, cuando se aplica a los Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a

un fragmento Fab diferente; (5) una denominada molécula escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados a ambos extremos de una región Fc humana. Los ejemplos de plataformas útiles para preparar anticuerpos biespecíficos incluyen, entre otros, BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab y Mab2 (F-Star), IgG1 con Fc modificado (Xencor) o DuoBody (basado en el intercambio del brazo Fab, Genmab).

- 5 El término "epítopo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Un epítopo puede formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por el plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más
10 generalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítopos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, en *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

- 15 Los anticuerpos que reconocen los mismos epítopos o epítopos solapantes pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo de competir con la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo. El epítopo de un anticuerpo también se puede definir mediante cristalografía de rayos X del anticuerpo unido a su antígeno para identificar los residuos de contacto. Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítopo si todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos solapantes si algunas mutaciones
20 de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

- La competencia entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que un anticuerpo de ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común (véase, por ejemplo, Junghans et al., *Cancer Res.* 50: 1495, 1990). Un anticuerpo de ensayo compite con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo de ensayo (por ejemplo, al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe la unión del anticuerpo de referencia en
25 al menos un 50%, por ejemplo, un 75%, 90% o 99% medido en un ensayo de unión competitiva. Los anticuerpos identificados mediante el ensayo competitivo (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia, y los anticuerpos que se unen a un epítopo adyacente suficientemente próximo al epítopo unido por el anticuerpo de referencia para que ocurra un impedimento estérico.

Un "paciente" incluye un sujeto humano u otro mamífero que recibe un tratamiento profiláctico o terapéutico.

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

- El porcentaje de identidades de secuencia se determina con secuencias de anticuerpos alineadas al máximo mediante la convención de numeración de Kabat. Después de la alineación, si una región del anticuerpo en cuestión (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) se compara con la misma región
40 de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones del anticuerpo en cuestión y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región del anticuerpo de referencia como en la del anticuerpo en cuestión dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contabilizar los huecos, multiplicado por 100 para convertirlo en un porcentaje.

- 45 Las composiciones o métodos que comprenden uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos no enumerados específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende un anticuerpo puede contener el anticuerpo solo o en combinación con otros ingredientes.

La designación de un intervalo de valores incluye todos los números enteros dentro o que definen el intervalo, y todos los subintervalos definidos por números enteros dentro del intervalo.

- 50 A menos que sea evidente de otra manera por el contexto, el término "aproximadamente" abarca valores dentro de un margen estándar de error de medición (EEM) de un valor establecido.

Un individuo tiene un mayor riesgo de enfermedad si el sujeto tiene al menos un factor de riesgo conocido (p. ej., genético, bioquímico, antecedentes familiares, exposición situacional), lo que coloca a los individuos con ese factor de riesgo en un riesgo mayor estadísticamente significativo de desarrollar la enfermedad que los individuos sin el factor de riesgo.

- 55 El término "síntoma" se refiere a una evidencia subjetiva de una enfermedad, como la marcha alterada, tal como la percibe el paciente. Un "signo" se refiere a la evidencia objetiva de una enfermedad observada por un médico.

La significación estadística significa $p \leq 0,05$.

La "función cognitiva" se refiere a procesos mentales como la atención, la memoria, la producción y comprensión del lenguaje, la resolución de problemas y el interés por el entorno y el cuidado personal.

5 La "función cognitiva incrementada" o "función cognitiva mejorada" se refiere a la mejora respecto de un valor inicial, por ejemplo, el diagnóstico o el inicio del tratamiento. La "disminución de la función cognitiva" se refiere a una disminución de la función respecto de un valor inicial.

10 En sistemas de modelos animales como ratas o ratones, la función cognitiva puede medirse con métodos que incluyen el uso de un laberinto en el que los sujetos usan información espacial (por ejemplo, el laberinto acuático de Morris, el laberinto circular de Barnes, el laberinto de brazo radial elevado, el laberinto en T y otros), el condicionamiento por miedo, la evitación activa, el campo abierto iluminado, medidor de actividad en la oscuridad, laberinto en cruz elevado, prueba exploratoria de dos compartimentos o prueba de natación forzada.

15 En humanos, la función cognitiva se puede medir mediante una o más de varias pruebas estandarizadas. Se describieron ejemplos de una prueba o ensayo para la función cognitiva (Ruoppila, 1. y Suutama, T. Scand. J. Soc. Medicina. Supl. 53,44-65, 1997) e incluyen pruebas psicométricas estandarizadas (p. ej., escala de memoria de Wechsler, escala de inteligencia para adultos de Wechsler, matrices progresivas estándar de Raven, prueba de capacidad mental para adultos de Schaie-Thurstone), pruebas neuropsicológicas (p. ej. Luria-Nebraska), evaluaciones autocognitivas (p. ej., cuestionario de metamemoria), pruebas de cribado visual-espacial (p. ej., figuras de Poppelreuter, reconocimiento del reloj, dibujo y cancelación de panales hexagonales), pruebas de cribado cognitivo (p. ej., mini prueba del estado mental de Folstein) y pruebas del tiempo de reacción. Otras pruebas estándar para el rendimiento cognitivo incluyen la subescala cognitiva de la escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer (ADAS-cog); la escala de impresión clínica global de cambio (escala CIBIC-plus); las actividades de estudio cooperativo de la enfermedad de Alzheimer de la escala de vida diaria (ADCS-ADL); el mini examen del estado mental (MMSE); el inventario neuropsiquiátrico (NPI); la escala de calificación de demencia clínica (CDR); la batería automatizada de pruebas neuropsicológicas de Cambridge (CANTAB) o la prueba de evaluación clínica-geriátrica de Sandoz (SCAG), la prueba de Stroop, la prueba de realización de recorridos, la prueba de longitud de dígitos de Wechsler y la prueba cognitiva computarizada CogState. Además, la función cognitiva se puede medir utilizando técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET), la resonancia magnética funcional (fMRI), la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o cualquier otra técnica de imagenología que permita medir la función cerebral.

30 Descripción detallada de la invención

I. GENERAL

La invención proporciona anticuerpos humanizados 1H7 (anticuerpos Hu1H7) como se reivindica. Los anticuerpos son útiles para el tratamiento y el diagnóstico de una enfermedad de cuerpos de Lewy.

II. MOLÉCULAS OBJETIVO

35 La alfa-sinucleína humana de tipo natural es un péptido de 140 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```
MDVFMKGLSK AKEGWAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV GSKTKEGWH GVTVAEKTK EQVTNVGGAV
VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE
EGYQDYPEA (SEQ ID N°:1)
```

40 (Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11282-6, 1993; número de registro de GenBank: P37840). La proteína tiene tres dominios reconocidos, un dominio de repetición KTK que cubre los aminoácidos 1-61, un dominio NAC (componente no amiloide) que se extiende desde aproximadamente los aminoácidos 60-95 y un dominio ácido C-terminal que se extiende desde aproximadamente el aminoácido 98 hasta el 140. Jensen et al. han informado que NAC tiene la secuencia de aminoácidos: EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV (SEQ ID N°: 2)

45 (Jensen et al., Biochem. J. 310 (Pt 1): 91-94, 1995; número de acceso a GenBank S56746). Ueda et al. han informado que NAC tiene la secuencia de aminoácidos: KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (SEQ ID N°: 3) (Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11282-6,1993).

50 A menos que sea evidente por el contexto, la referencia a alfa-sinucleína o sus fragmentos incluye las secuencias de aminoácidos de tipo natural humanas indicadas anteriormente, y las variantes alélicas humanas de las mismas, particularmente aquellas asociadas con la enfermedad de cuerpos de Lewy (por ejemplo, E46K, A30P y A53T, en las que la primera letra indica el aminoácido en SEQ ID N°: 1, el número es la posición del codón en SEQ ID N°: 1, y la segunda letra es el aminoácido en la variante alélica). Dichas variantes pueden estar presentes opcionalmente individualmente o en cualquier combinación. Las mutaciones inducidas E83Q, A90V, A76T, que potencian la agregación de alfa sinucleína, también pueden estar presentes individualmente o en combinación entre sí, y/o las variantes alélicas humanas E46K, A30P y A53T.

55

III. ENFERMEDADES DE CUERPOS DE LEWY

Las enfermedades de cuerpos de Lewy (LBD) se caracterizan por la degeneración del sistema dopaminérgico, alteraciones motoras, deterioro cognitivo y la formación de cuerpos de Lewy (LB). (McKeith et al., *Neurology* (1996) 47: 1113-24). Los cuerpos de Lewy son depósitos esféricos de proteínas que se encuentran en las neuronas. Su presencia en el cerebro interrumpe la función normal del cerebro interrumpiendo la acción de los mensajeros químicos, como la acetilcolina y la dopamina. Las enfermedades de cuerpos de Lewy incluyen la enfermedad de Parkinson (incluida la enfermedad de Parkinson idiopática), la enfermedad de cuerpos de Lewy difusos (DLBD) también conocida como demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV), la enfermedad combinada de Alzheimer y Parkinson, y la atrofia de múltiples sistemas (MSA; p. ej., atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome de Shy-Drager). DLBD comparte síntomas de la enfermedad de Alzheimer y Parkinson. DLBD difiere de la enfermedad de Parkinson principalmente por la ubicación de los cuerpos de Lewy. En DLBD, los cuerpos de Lewy se forman principalmente en la corteza. En la enfermedad de Parkinson, se forman principalmente en la sustancia negra. Otras enfermedades de cuerpos de Lewy incluyen insuficiencia autonómica pura, disfagia por cuerpos de Lewy, LBD incidental y LBD hereditaria (p. ej., mutaciones del gen de alfa-sinucleína, PARK3 y PARK4).

IV. ANTICUERPOS

A. Especificidad de Unión y Propiedades Funcionales

Los anticuerpos humanizados de la descripción se unen específicamente a la alfa sinucleína humana. La afinidad de algunos anticuerpos humanizados (es decir, Ka) puede estar, por ejemplo, dentro de un factor de cinco o dos de la del anticuerpo de ratón (m1H7). Algunos anticuerpos humanizados tienen una afinidad que es igual, dentro del EEM, que m1H7. Algunos anticuerpos humanizados tienen una afinidad mayor que la de 1H7 de ratón. Algunos anticuerpos humanizados descritos se unen al mismo epítipo y/o compiten con m1H7 por unirse a la alfa sinucleína humana.

B. Anticuerpos Humanizados

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo modificado genéticamente en el que las CDRs de un anticuerpo "donante" no humano se injertan en secuencias de anticuerpos "aceptores" humanos (véase, por ejemplo, Queen et al., documentos US 5.530.101 y 5.585.089; Winter et al., documento US 5.225.539; Carter, documento US 6.407.213; Adair, documentos US 5.859.205 y 6.881.557; y Foote, documento US 6.881.557). Las secuencias del anticuerpo aceptor pueden ser, por ejemplo, una secuencia de región variable madura de un anticuerpo humano, un compuesto de tales secuencias, una secuencia consenso de secuencias de regiones variables de un anticuerpo humano (por ejemplo, secuencias consenso de regiones variables de la cadena ligera y pesada de Kabat, 1991, anteriormente mencionado), o una secuencia de región variable de la línea germinal.

Un ejemplo de una secuencia aceptora para la cadena pesada es la región variable de la cadena pesada madura humana con el código de acceso del NCBI BAC02037 (GI: 21670055). Esta secuencia aceptora incluye dos CDRs que tienen la misma forma canónica que la cadena pesada de 1H7 de ratón y tiene una identidad de secuencia del 65,8% con la región estructural de la región variable de la cadena pesada. Si se usa una secuencia aceptora diferente, dicho aceptor puede ser, por ejemplo, otra región variable de la cadena pesada madura derivada de la línea germinal VH1-18 o una secuencia de la región variable de la cadena pesada madura que incorpora una de estas secuencias de la línea germinal.

Para la cadena ligera, un ejemplo de una secuencia aceptora es la región variable madura de la cadena ligera con el código de acceso del NCBI AAY33358 (GI: 63102905). Esta secuencia aceptora incluye dos CDRs que tienen la misma forma canónica que una cadena ligera de 1H7 de ratón y tiene una identidad de secuencia del 65,4% con la región estructural de la región variable de la cadena ligera. Si se usa un aceptor diferente, dicho aceptor es preferiblemente otra secuencia de la cadena ligera madura derivada de la línea germinal A30 o una secuencia de la región variable madura de la cadena ligera que incorpora una de estas secuencias de la línea germinal.

Un anticuerpo humanizado de la descripción es un anticuerpo que tiene tres CDRs de la cadena ligera y tres de la cadena pesada, como se define según Kabat, completamente o sustancialmente del anticuerpo 1H7 de ratón donante, y las secuencias estructurales de la región variable madura y las regiones constantes, si están presentes, completamente o sustancialmente de secuencias de anticuerpos humanos. Del mismo modo, una cadena pesada humanizada es una cadena pesada que tiene tres CDRs de la cadena pesada, como se define según Kabat, completamente o sustancialmente de la cadena pesada del anticuerpo 1H7, y una secuencia variable de la cadena pesada madura y una secuencia de la región constante de la cadena pesada, si están presentes, completamente o sustancialmente de una secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo humano. Del mismo modo, una cadena ligera humanizada es una cadena ligera que tiene tres CDRs de la cadena ligera, como se define según Kabat, completamente o sustancialmente de la cadena ligera del anticuerpo m1H7, y una secuencia variable madura de la cadena ligera y una secuencia de la región constante de la cadena ligera, si están presentes, completamente o sustancialmente de una secuencia de la cadena ligera de un anticuerpo humano. Una CDR es sustancialmente de m1H7 si al menos un 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los residuos son idénticos

5 a los residuos correspondientes en la CDR correspondiente de m1H7. Las secuencias estructurales de la región variable madura de una cadena de anticuerpo o la secuencia de la región constante de una cadena de anticuerpo son sustancialmente de una secuencia estructural de una región variable madura humana o una secuencia de una región constante humana, respectivamente, cuando al menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los residuos correspondientes definidos por Kabat son idénticos.

10 Ciertos aminoácidos de los residuos estructurales de la región variable madura humana pueden seleccionarse para la sustitución en función de su posible influencia en la conformación de las CDRs y/o la unión al antígeno, la mediación en la interacción entre las cadenas pesadas y ligeras, la interacción con la región constante, ser un sitio para una modificación postraduccional deseada o no deseada, ser un residuo inusual por su posición en una secuencia de una región variable humana y, por lo tanto, potencialmente inmunógeno, entre otras razones. Las siguientes 11 posiciones de la región estructural de la región variable se consideraron candidatas para las sustituciones por una o más de estas razones, como se especifica adicionalmente en los Ejemplos (L46F, Y49C, F83A, V11L, T28S, R38K, M48I, V67A, M69L, T71A, Y91F).

15 Aquí como en cualquier otro lugar, el primer residuo mencionado es el residuo de un anticuerpo humanizado formado injertando CDRs de Kabat en una región estructural aceptora humana, y el segundo residuo mencionado es un residuo que se considera que reemplaza a dicho residuo. Por lo tanto, en las regiones estructurales de las regiones variables, el primer residuo mencionado es humano y dentro de las CDRs, el primer residuo mencionado es de ratón (por ejemplo, C97S).

20 Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer en las CDRs. Una posible variación es sustituir ciertos residuos en las CDRs del anticuerpo 1H7 de ratón con residuos correspondientes de secuencias de CDRs humanas, típicamente de las CDRs de las secuenciasceptoras humanas usadas en el diseño de los anticuerpos humanizados ejemplificados. En algunos anticuerpos, solo una parte de las CDRs, es decir, el subconjunto de residuos de CDR necesarios para la unión, denominados SDRs, son necesarios para retener la unión en un anticuerpo humanizado. Los residuos de la CDR que no entran en contacto con el antígeno y que no están en las SDRs pueden identificarse basándose en estudios previos (por ejemplo, los residuos H60-H65 de la CDR H2 a menudo no son necesarios), de regiones de CDRs de Kabat que se encuentran fuera de los bucles hipervariables de Chothia (Chothia, J. Mol. Biol. 196: 901, 1987), mediante modelización molecular y/o empíricamente, o como se describe en Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004. En dichos anticuerpos humanizados en posiciones en las que uno o más residuos de CDR del donante están ausentes o en los que se omite una CDR del donante, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (por la numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor. El número de tales sustituciones de aminoácidos aceptor por donante en las CDRs a incluir refleja un equilibrio de consideraciones en competencia. Dichas sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, en consecuencia, disminuir la inmunogenicidad potencial. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios de afinidad, y preferiblemente se evitan reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones para la sustitución dentro de las CDRs y los aminoácidos a sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

40 Una razón para realizar una sustitución dentro de una CDR es que un residuo de ratón es un sitio de modificación postraduccional que puede interferir con la expresión o el ensamblaje de un anticuerpo. Aquí, la posición H97 en CDRH3, que está ocupada por una C en el 1H7 de ratón, se identificó como un sitio para la sustitución.

45 Las 11 retromutaciones de la región estructural de la región variable y la sustitución de 1 CDR indicadas anteriormente se pueden incorporar en los anticuerpos 1H7 humanizados en muchas permutaciones. La región variable de la cadena pesada de estos anticuerpos se puede representar mediante una secuencia que comprende QVQLVQSGAE-X₁-KKPGASVKVSKASGY-X₂-FTSYIHVV-X₃-QAPGQGLEW-X₄-GWI-YPGSGNTKYSEKFKGR-X₅-T-X₆-T-X₇-DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY-X₈-CARDG-X₉-YGFAYWGQGLVTVSS, en donde -X₁- es V o L; -X₂- es S o T; -X₃- es R o K; -X₄- es M o I; -X₅- es V o A; -X₆- es M o L; -X₇- es T o A; -X₈- es Y o F; -X₉- es C, M, S o T (SEQ ID N°: 46). En algunas regiones variables de la cadena pesada, -X₉- es C. Algunas regiones variables de la cadena ligera se pueden representar mediante una secuencia que comprende DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSDYDGDSDYMN-WYQQKPKGKAPK-Z₁-LI-Z₂-AASNLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPED-Z₃-ATYYCQSNEDPFTFGQGTK-LEIK, en la que -Z₁- es L o F; -Z₂- es Y o C; -Z₃- es F o A (SEQ ID N°: 47). En algunos anticuerpos descritos, la región variable de la cadena pesada comprende la SEQ ID N°: 46, y la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID N°: 47. Por ejemplo, los residuos, X₁ y X₃ de SEQ ID N°: 48 son V y R, respectivamente. Por ejemplo, los residuos, X₅ y X₇ de SEQ ID N°: 46 son A y el residuo Z₁ de SEQ ID N°: 47 es F. Por ejemplo, los residuos, -X₄, X₆ y X₈ de SEQ ID N°: 46 son M, M e Y, respectivamente, y los residuos Z₂ y Z₃ de la SEQ ID N°: 47 son C y F, respectivamente. Por ejemplo, los residuos, X₂ y X₉ de SEQ ID N°: 48 son T y C, respectivamente.

60 Algunos anticuerpos descritos contienen dos sustituciones de la cadena pesada y dos sustituciones de la cadena ligera. Por ejemplo, la posición H67 está ocupada por A, H71 está ocupada por A, la posición L46 está ocupada por F y la posición L49 está ocupada por C. En algunos anticuerpos, la región variable madura de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 23. En algunos anticuerpos, la región variable madura de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 37. Por ejemplo, en H3L3

(Hu1H7VHv3 (SEQ ID N°: 23)-Hu1H7VLv3 (SEQ ID N°: 37)), la región variable madura de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 23, y la región variable madura de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 37.

5 La descripción proporciona variantes del anticuerpo humanizado H3L3 en las que la región variable madura de la cadena pesada humanizada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID N°: 23, y la región variable madura de la cadena ligera humanizada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N°: 37. Algunos de estos anticuerpos humanizados incluyen tres CDRs de la cadena pesada y tres de la ligera, total o sustancialmente idénticas a las regiones CDR de H3L3, que son las mismas que las del anticuerpo donante de ratón. Las regiones CDR pueden definirse mediante cualquier
10 definición convencional (por ejemplo, de Chothia), pero son preferiblemente como se define mediante Kabat.

Algunas variantes del anticuerpo humanizado H3L3 conservan algunas o todas las retromutaciones en H3L3. En otras palabras, al menos 1, 2, 3 o preferiblemente los 4 siguientes están presentes: H67 está ocupado por A y H71 está ocupado por A, L46 está ocupado por F y la posición L49 está ocupada por C.

15 Además de retener al menos 1, 2, 3 o preferiblemente las 4 retromutaciones de H3L3, los anticuerpos 1H7 humanizados también pueden contener retromutaciones adicionales en las regiones estructurales de las regiones variables. Los ejemplos de tales retromutaciones incluyen H11 ocupado por L, H28 ocupado por S, H38 ocupado por K, H48 ocupado por I, H69 ocupado por L, H91 ocupado por F, y/o L83 ocupado por A. Para la selección de retromutaciones para un producto terapéutico o diagnóstico, se debería tener en cuenta el grado en que, en general, no mejoran la afinidad, y el grado en que la introducción de más residuos de ratón puede aumentar el riesgo de
20 inmunogenicidad. Por ejemplo, H3L1 comprende una región variable madura de la cadena pesada de SEQ ID N°: 23, y una cadena ligera de SEQ ID N°: 33. Por ejemplo, H4L1 comprende una región variable madura de la cadena pesada de SEQ ID N°: 25, y una cadena ligera de SEQ ID N°: 33.

Otra posibilidad de variación es usar una secuencia aceptora humana diferente como se discutió anteriormente. Las sustituciones en las regiones CDR son posibles como se describió anteriormente, por ejemplo en la posición H97,
25 pero antes de seleccionar tales sustituciones para un producto terapéutico o de diagnóstico, se debe considerar el posible efecto sobre la afinidad y la expresión de los anticuerpos.

Si la posición H97 en CDRH3 de ratón es distinta de cisteína, está ocupada preferiblemente por M, S o T. Algunos anticuerpos descritos comprenden una cadena pesada humanizada que comprende una CDR1 de Kabat de SEQ ID N°: 12: SYYIH; CDR2 de Kabat de SEQ ID N°: 13: WIYPGSGNTKYSEKFKG; CDR3 de Kabat de SEQ ID N°: 48: DG-X₉-YGFAY, en la que -X₉- es C, M, S, o T, más preferiblemente C. Algunos anticuerpos comprenden una cadena ligera humanizada que comprende una CDR1 de Kabat de SEQ ID N°: 15: KASQS-VDYDGD SYMN; CDR2 de Kabat de SEQ ID N°: 16: AASNLES; CDR3 de Kabat de SEQ ID N°: 17: QQSNEPFT. Algunos anticuerpos comprenden una cadena pesada humanizada que comprende las tres CDRs de Kabat de las SEQ ID N°s: 12, 13, y 48, y una cadena ligera humanizada que comprende las tres CDRs de Kabat de las SEQ ID N°s: 15-17. En algunos de tales anticuerpos, una cadena pesada humanizada comprende las tres CDRs de Kabat de SEQ ID N°: 12-14 y una
35 cadena ligera humanizada comprende las tres CDRs de Kabat de SEQ ID N°: 15-17.

La descripción proporciona además anticuerpos 1H7 humanizados en los que la región variable madura de la cadena pesada humanizada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad, o tiene un 100% de identidad con SEQ ID N°s 19, 21, 23, 25 y 27 y la región variable madura de la cadena ligera humanizada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia o es un 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID N°s 33, 35, 37 y 39.
40

Se pueden incorporar diversas permutaciones de las 11 retromutaciones de región estructural de la región variable y 1 mutación de CDR descritas anteriormente en los anticuerpos 1H7 humanizados. En algunos de estos anticuerpos, la posición L46 está ocupada por L o F (preferiblemente F) y/o la posición L49 está ocupada por Y o C (preferiblemente C) y/o la posición L83 está ocupada por F o A, y/o la posición H11 está ocupada por V o L, y/o la posición H28 está ocupada por T o S, y/o la posición H38 está ocupada por R o K, y/o la posición H48 está ocupada por M o I, y/o la posición H67 está ocupada por V o A (preferiblemente A), y/o la posición H69 está ocupada por M o L, y/o la posición H71 está ocupada por T o A (preferiblemente A), y/o la posición H91 está ocupada por Y o F, y/o la posición H28 está ocupada por S o T, y/o la posición H97 está ocupada por C o M o S o T (preferiblemente C).
45

50 En algunos de estos anticuerpos, se conservan algunas o todas las retromutaciones en Hu1H7VLv1-v4 y Hu1H7VHv1-v5. Preferiblemente, se conservan las retromutaciones en las posiciones L46, H67 y H71. En otras palabras, la posición L46 está ocupada por F, la posición H67 está ocupada por A y la posición H71 está ocupada por A. Más preferiblemente, se conservan las retromutaciones en las posiciones L46, L49, H67 y H71. En otras palabras, la posición L46 está ocupada por F, la posición L49 está ocupada por C, la posición H67 está ocupada por A y la posición H71 está ocupada por A. En algunos anticuerpos, algunas o todas las posiciones de la cadena pesada H11, H28, H38, H48, H67, H69, H71 y/o H91 están ocupadas por L, S, K, I, A, L, A y F, respectivamente. Del mismo modo, en algunos anticuerpos, algunas o todas las posiciones de la cadena ligera L46, L49 y/o L83 están ocupadas por F, C y A, respectivamente. En algunos anticuerpos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o las diez posiciones H11, H28, H38, H48, H67, H69, H71, H91, L46, L49 y L83 está(n) ocupada(s) por L, S, K, I, A, L, A, F, F, C y A,
55

respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 se cambian en la región estructural de la región variable madura de la cadena pesada respecto de la SEQ ID N°: 44, y las posiciones 0, 1, 2 o 3 se cambian en la región estructural de la región variable madura de la cadena ligera respecto de la SEQ ID N°: 45. En algunos de tales anticuerpos, la posición H97 está ocupada por C. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado tiene una K_D para alfa-sinucleína de aproximadamente 0,5 a 2 de la de un anticuerpo 1H7 murino o quimérico.

En algunos anticuerpos descritos, la posición L46 está ocupada por F, la posición H67 está ocupada por A, la posición H71 está ocupada por A, la posición H11 está ocupada por V y la posición H38 está ocupada por R. En algunos de estos anticuerpos, la posición L49 está ocupada por Y. Más preferiblemente, en algunos de tales anticuerpos, la posición L49 está ocupada por C. En algunos de tales anticuerpos, la posición L83 está ocupada por F. En algunos de tales anticuerpos, la posición L83 está ocupada por A. En algunos de tales anticuerpos, la posición H97 está ocupada por C. En algunos de tales anticuerpos, la posición H28 está ocupada por T o S, la posición H48 está ocupada por M, la posición H69 está ocupada por M y la posición H91 está ocupada por Y. En algunos de tales anticuerpos, la posición H28 está ocupada por T o S, la posición H48 está ocupada por M, la posición H69 está ocupada por M, la posición H91 está ocupada por F. En algunos de tales anticuerpos, la posición H28 está ocupada por T o S, la posición H48 está ocupada por M, la posición H69 está ocupada por L y la posición H91 está ocupada por Y. En algunos de tales anticuerpos, la posición H28 está ocupada por T o S, la posición H48 está ocupada por M, la posición H69 está ocupada por L y la posición H91 está ocupada por F. En algunos de tales anticuerpos, la posición H28 está ocupada por T o S, la posición H48 está ocupada por I, la posición H69 está ocupada por M y la posición H91 está ocupada por Y. En algunos de tales anticuerpos, la posición H28 está ocupada por T o S, la posición H48 está ocupada por I, la posición H69 está ocupada por M y la posición H91 está ocupada por F. En algunos de tales anticuerpos, la posición H28 está ocupada por T o S, la posición H48 está ocupada por I, la posición H69 está ocupada por L y la posición H91 está ocupada por Y. En algunos de tales anticuerpos, la posición H28 está ocupada por T o S, la posición H48 está ocupada por I, la posición H69 está ocupada por L y la posición H91 está ocupada por F. En algunos de tales anticuerpos, la posición H11 está ocupada por L, y/o la posición H38 está ocupada por K, y/o la posición H97 está ocupada por S.

En cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, se pueden hacer otras sustituciones de aminoácidos en la región estructural de la región variable madura, por ejemplo, en residuos que no están en contacto con las CDRs. A menudo, los reemplazos realizados en la variante de secuencias humanizadas son conservativos con respecto a los aminoácidos reemplazados. En algunos anticuerpos, las sustituciones respecto de Hu1H7VLv1-v4 y Hu1H7VHv1-v5 (conservativas o no) no tienen un efecto sustancial sobre la afinidad o la potencia de unión del anticuerpo resultante respecto de Hu1H7VLv1-v4 y Hu1H7VHv1-v5, es decir, su capacidad de unión a la alfa sinucleína humana.

Las variantes típicamente difieren de las secuencias de la región variable madura de la cadena pesada y ligera de Hu1H7VLv1-v4 y Hu1H7VHv1-v5 en un pequeño número (por ejemplo, típicamente no más de 1, 2, 3, 5 o 10 en la región estructural de la región variable madura de la cadena ligera o de la cadena pesada, o ambas) de sustituciones, eliminaciones o inserciones.

C. Selección de la Región Constante

Las regiones variables de la cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados pueden unirse a al menos una porción de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad dependiente del complemento. Por ejemplo, los isotipos humanos IgG1 e IgG3 tienen citotoxicidad dependiente del complemento, y los isotipos humanos IgG2 e IgG4 no la tienen. Las IgG1 e IgG3 humanas también inducen funciones efectoras mediadas por células más fuertes que las IgG2 e IgG4 humanas. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Una región constante kappa de la cadena ligera humana ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 49. La arginina N-terminal de la SEQ ID N°: 49 se puede omitir, en cuyo caso la región constante kappa de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 51. Una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 50. Una región constante de la cadena pesada de IgG2 humana ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 57. 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 de cadena simple en los que los dominios variables maduros de las cadenas pesada y ligera están unidos a través de un espaciador.

Las regiones constantes humanas muestran una variación alotípica y una variación isoalotípica entre diferentes individuos, es decir, las regiones constantes pueden diferir en diferentes individuos en una o más posiciones polimórficas. Los isoalotipos difieren de los alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se unen a una región no polimórfica de uno o más isotipos diferentes. Así, por ejemplo, las regiones constantes de la cadena pesada pueden ser de los alotipos IgG1 G1m1 o IgG1 G1m3 y tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 52 o SEQ ID N°: 55. Incluso otra región constante de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 52 o SEQ ID N°: 55 excepto porque carece de la lisina C-terminal.

Uno o varios aminoácidos del extremo aminoterminal o carboxiterminal de la cadena ligera y/o pesada, como la lisina C-terminal de la cadena pesada, pueden faltar o derivatizarse en una proporción o en todas las moléculas. Se

pueden hacer sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora, como la citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC (véase, por ejemplo, Winter et al., Patente de EE. UU. N° 5.624.821; Tso et al., Patente de EE. UU. N° 5.834.597; y Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005, 2006), o para prolongar la vida media en humanos (véase, por ejemplo, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279: 6213, 2004). Las sustituciones ejemplares incluyen una Gln en la posición 250 y/o una Leu en la posición 428 (se usa la numeración EU en este párrafo para la región constante) para incrementar la vida media de un anticuerpo. La sustitución en cualquiera o en todas las posiciones 234, 235, 236 y/o 237 reduce la afinidad por los receptores de Fcγ, particularmente el receptor FcγRI (véase, por ejemplo, el documento US 6.624.821). Algunos anticuerpos tienen una sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de la IgG1 humana para reducir las funciones efectoras. Opcionalmente, las posiciones 234, 236 y/o 237 en IgG2 humana están sustituidas con alanina, y la posición 235 con glutamina (véase, por ejemplo, el documento US 5.624.821).

En algunos anticuerpos, la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 49. En algunos anticuerpos, la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 52. Las cadenas ligeras ejemplares de Hu1H7 tienen SEQ ID N°: 53 o SEQ ID N°: 54. Las cadenas pesadas ejemplares de Hu1H7 tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 55 o SEQ ID N°: 56. En algunos anticuerpos, la cadena ligera es la SEQ ID N°: 53. En algunos anticuerpos, la cadena pesada es la SEQ ID N°: 56.

D. Expresión de Anticuerpos Recombinantes

Los anticuerpos pueden producirse mediante expresión recombinante. En los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos pueden optimizarse los codones para la expresión en el tipo de célula deseado (por ejemplo, CHO o Sp2/0). Las construcciones de ácidos nucleicos recombinantes típicamente incluyen una secuencia de control de la expresión unida de forma operable a las secuencias codificantes de las cadenas de anticuerpos, incluidas las regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Las secuencias de control de la expresión pueden ser sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión a alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada. El vector o vectores que codifican las cadenas de anticuerpos también pueden contener un gen seleccionable, tal como la dihidrofolato reductasa, para permitir la amplificación del número de copias de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas de anticuerpos.

E. coli es un huésped procarionta particularmente útil para expresar anticuerpos, particularmente fragmentos de anticuerpos. Los microbios, como la levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un ejemplo de un huésped de levadura, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen la 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los 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 se pueden usar para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, N.Y., 1987). Se han desarrollado varias líneas celulares huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas celulares CHO, varias líneas celulares COS, células HeLa, células HEK293, células L y mielomas que no producen anticuerpos, que incluyen Sp2/0 y NS0. Puede ser ventajoso utilizar células 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 los sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme del ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional. Las secuencias de control de la expresión adecuadas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino y similares. Véase Co et al., *J. Immunol.* 148: 1149 (1992).

Habiendo introducido el/los vector(es) que codifica(n) las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos en cultivos celulares, se pueden cribar agrupaciones de células para determinar la productividad del cultivo y la calidad del producto en medios sin suero. Los grupos de células más productivos pueden someterse luego a una clonación de una sola célula basada en FACS para generar líneas monoclonales. Pueden ser ventajosas productividades específicas por encima de 50 pg o 100 pg por célula por día, que corresponden a títulos de productos de más de 7,5 g/L de cultivo. Los anticuerpos producidos por clones de células individuales también se pueden ensayar para determinar la turbidez, las propiedades de filtración, PAGE, IEF, barrido UV, HP-SEC, cartografía de carbohidratos-oligosacáridos, espectrometría de masas y ensayos de unión, como ELISA o Biacore. Un clon seleccionado puede almacenarse después en múltiples viales y almacenarlo congelado para su uso posterior.

Una vez expresados, los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con los procedimientos convencionales de la técnica, que incluyen la captura con proteína A, cromatografía en columna (por ejemplo, interacción hidrófoba o intercambio iónico), bajo pH para inactivación viral y similares (véase, en general, Scopes, *Protein Purification* Springer-Verlag, N.Y., 1982)).

Metodología para la producción comercial de anticuerpos que incluye la optimización de codones, selección de promotores, elementos de transcripción y terminadores, clonación de células individuales sin suero, bancos de células, uso de marcadores de selección para la amplificación del número de copias, terminador de CHO, clonación de células individuales sin suero, mejora de los títulos de proteínas (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.786.464, US 5.888.809, US 6.063.598, US 6.114.148, US 7.569.339, WO2004/050884, WO2005/019442, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2008/107388, y WO2009/027471).

E. Ácidos nucleicos

La descripción proporciona además ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras descritas anteriormente. Típicamente, los ácidos nucleicos también codifican un péptido señal fusionado con las cadenas pesadas y ligeras maduras (por ejemplo, péptidos señal que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s: 29, 31 y 41 que pueden codificarse mediante las SEQ ID N°s: 28, 30 y 40). Las secuencias de codificación en ácidos nucleicos pueden estar en una unión operable con secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias de codificación, tales como un promotor, potenciador, sitio de unión al ribosoma, señal de terminación de la transcripción y similares. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden aparecer en forma aislada o pueden clonarse en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis en estado sólido o PCR de oligonucleótidos solapantes. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden unirse como un ácido nucleico contiguo, por ejemplo, dentro de un vector de expresión, o pueden estar separados, por ejemplo, cada uno clonado en su propio vector de expresión.

V. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

La invención proporciona un anticuerpo para el uso en varios métodos para tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad de cuerpos de Lewy en pacientes que padecen o corren el riesgo de padecer dicha enfermedad. Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos con riesgo de enfermedad de LBD pero que no muestran síntomas, así como pacientes que actualmente presentan síntomas o los primeros signos de advertencia de sinucleinopatías, por ejemplo, ralentización del EEG, manifestaciones neuropsiquiátricas (depresión, demencia, alucinaciones, ansiedad, apatía, anhedonia), cambios autonómicos (hipotensión ortostática, trastornos de la vejiga, estreñimiento, incontinencia fecal, sialorrea, disfagia, disfunción sexual, cambios en la circulación sanguínea cerebral), cambios sensoriales (olfatorio, dolor, sensaciones anormales de discriminación del color), trastornos del sueño (trastorno del comportamiento del sueño REM (RBD), síndrome de piernas inquietas/movimientos periódicos de las extremidades, hipersomnía, insomnio) y otros signos y síntomas diversos (fatiga, diplopía, visión borrosa, seborrea, pérdida/ganancia de peso). Por lo tanto, los métodos actuales se pueden administrar profilácticamente a individuos que tienen un riesgo genético conocido de LBD. Tales individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo está determinado por el análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia la EP incluyen mutaciones en los genes de alfa-sinucleína o Parkin, UCHLI y CYP2D6; particularmente las mutaciones en las posiciones 30 y 53 del gen de alfa-sinucleína. Las personas que actualmente padecen la enfermedad de Parkinson se pueden reconocer por sus manifestaciones clínicas, que incluyen temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural.

En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (p. ej., 10, 20, 30 años). Por lo general, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcance los 40, 50, 60 o 70 años. El tratamiento generalmente implica múltiples dosis durante un período de tiempo. El tratamiento puede controlarse mediante el análisis de anticuerpos o las respuestas de células T o células B activadas a un agente terapéutico (por ejemplo, una forma truncada del péptido alfa-sinucleína) a lo largo del tiempo. Si la respuesta cae, está indicada una dosis de refuerzo.

Los anticuerpos se pueden usar para tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad de cuerpos de Lewy en pacientes mediante la administración en condiciones que generan una respuesta terapéutica beneficiosa en un paciente (p. ej., reducción de agregados de sinucleína alfa neuronales y/o axonales, reducción de la distrofia neurítica, mejora de la función cognitiva, y/o reversión, tratamiento o prevención del deterioro cognitivo) en el paciente. En algunos métodos, las áreas de distrofia neurítica en el neuropilo de la neocorteza y/o los ganglios basales se pueden reducir en promedio al menos un 10%, 20%, 30% o 40% en los pacientes tratados en comparación con una población de control.

El deterioro cognitivo, la disminución progresiva de la función cognitiva, los cambios en la morfología cerebral y los cambios en la función cerebrovascular se observan comúnmente en pacientes que padecen o corren el riesgo de padecer la enfermedad de cuerpos de Lewy. La administración de los presentes anticuerpos puede inhibir o retrasar la disminución de la función cognitiva en tales pacientes.

La descripción también proporciona métodos para conservar o incrementar la densidad sináptica y/o la densidad dentrítica. Un índice de cambios en la densidad sináptica o dentrítica puede medirse mediante marcadores de formación de sinapsis (sinaptofisina) y/o dendritas (MAP2). En algunos métodos, la densidad sináptica o dentrítica se puede restaurar al nivel de la densidad sináptica o dentrítica en un sujeto sano. En algunos métodos, el nivel medio de densidad sináptica o dentrítica en los pacientes tratados puede elevarse en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o más en comparación con una población de pacientes de control no tratados.

VI. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO

En las aplicaciones profilácticas, se administra un anticuerpo o una composición farmacéutica del mismo a un paciente susceptible, o de otro modo en riesgo de una enfermedad en un régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) eficaz para reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. En algunas aplicaciones profilácticas, el régimen es efectivo para inhibir o retrasar la acumulación de alfa sinucleína y fragmentos truncados en el cerebro, y/o inhibir o retrasar sus efectos tóxicos y/o inhibir o retrasar el desarrollo de déficits conductuales. En las aplicaciones terapéuticas, se administra un anticuerpo o agente para inducir un anticuerpo a un paciente sospechoso de padecer o que ya padece una enfermedad de cuerpos de Lewy en un régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) eficaz para mejorar o al menos inhibir el deterioro adicional de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. En algunas aplicaciones terapéuticas, el régimen es efectivo para reducir o al menos inhibir el aumento adicional de los niveles de alfa sinucleína y fragmentos truncados, las toxicidades asociadas y/o déficits conductuales.

Un régimen se considera terapéuticamente o profilácticamente efectivo si un paciente tratado individualmente logra un resultado más favorable que el resultado medio en una población de control de pacientes comparables no tratados mediante los métodos de la invención, o si se demuestra un resultado más favorable en pacientes tratados frente a los pacientes de control en un ensayo clínico controlado (p. ej., un ensayo de fase II, fase II/III o fase III) al nivel $p < 0,05$ o $0,01$ o incluso $0,001$.

Las dosis efectivas varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluidos los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, incluido el tipo de enfermedad de cuerpos de Lewy, si el paciente es portador de ApoE, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

Un rango de dosificación ejemplar para los anticuerpos es de aproximadamente $0,01$ a 5 mg/kg, y más habitualmente de $0,1$ a 3 mg/kg o $0,15$ - 2 mg/kg o $0,15$ - $1,5$ mg/kg, del peso corporal del paciente. El anticuerpo puede administrarse a tales dosis diariamente, en días alternos, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, trimestralmente o de acuerdo con cualquier otro calendario determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración en dosis múltiples durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

Los anticuerpos pueden administrarse a través de una ruta periférica (es decir, una en la que un anticuerpo administrado o inducido cruza la barrera hematoencefálica para alcanzar un sitio previsto en el cerebro. Las vías de administración incluyen la tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. Algunas rutas para la administración de anticuerpos son la intravenosa y subcutánea. Este tipo de inyección generalmente se realiza en los músculos de los brazos o las piernas. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son estériles y sustancialmente isotónicas, y se fabrican en condiciones GMP. Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en forma de dosis unitaria (es decir, la dosis para una administración única). Las composiciones farmacéuticas pueden formularse utilizando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o agentes auxiliares fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la vía de administración elegida. Para la inyección, los anticuerpos pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, como la solución de Hank, la solución de Ringer o solución salina fisiológica o tampón acetato (para reducir las molestias en el lugar de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para su reconstitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril apirógena, antes del uso.

Los regímenes actuales pueden administrarse en combinación con otro agente eficaz en el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad que se está tratando. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Parkinson, la inmunoterapia contra alfa sinucleína (documento WO/2008/103472), levodopa, agonistas de dopamina, inhibidores de COMT, inhibidores de MAO-B, amantadina o agentes anticolinérgicos pueden usarse en combinación con los presentes regímenes.

VII. OTRAS APLICACIONES

Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden usar para detectar alfa-sinucleína en el contexto del diagnóstico o tratamiento clínico o en la investigación. Los anticuerpos también se pueden comercializar como reactivos de investigación para la investigación de laboratorio en la detección de células que albergan alfa-sinucleína y su respuesta a diversos estímulos. En tales usos, los anticuerpos monoclonales pueden marcarse con moléculas fluorescentes, moléculas con marcaje de spin, enzimas o radioisótopos, y pueden proporcionarse en forma de kit con todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo de alfa-sinucleína. Los anticuerpos también se pueden usar para purificar alfa-sinucleína, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos se pueden usar para detectar LBs en un paciente. Dichos métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de EP u otra enfermedad asociada con la presencia de LBs en el cerebro o la susceptibilidad a los mismos. Por ejemplo, los métodos se pueden usar en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene LBs, es probable que sufra una enfermedad de cuerpos de Lewy, como la enfermedad de Parkinson. Los métodos también pueden usarse en pacientes asintomáticos. La presencia de cuerpos de Lewy u otros depósitos anormales de alfa-sinucleína indica susceptibilidad a futuras enfermedades sintomáticas. Los métodos también son útiles para monitorear la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes a los que se les ha diagnosticado previamente una enfermedad de cuerpos de Lewy.

Los métodos se pueden realizar administrando un anticuerpo y luego detectando el anticuerpo después de que se haya unido. Si se desea, la respuesta de eliminación se puede evitar mediante el uso de un fragmento de anticuerpo que carece de una región constante de longitud completa, como un Fab. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir tanto como tratamiento como reactivo de diagnóstico.

Para el diagnóstico (p. ej., imagenología *in vivo*), los anticuerpos pueden administrarse mediante inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro mediante inyección intracraneal o perforando un agujero a través del cráneo. La dosificación del reactivo debe estar dentro de los mismos rangos que para los métodos de tratamiento. Típicamente, el anticuerpo está marcado, aunque en algunos métodos, el anticuerpo no está marcado y se usa un agente de marcaje secundario para unirse al anticuerpo. La elección de la etiqueta depende de los medios de detección. Por ejemplo, una etiqueta fluorescente es adecuada para la detección óptica. El uso de etiquetas paramagnéticas es adecuado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Las etiquetas radiactivas también se pueden detectar con PET o SPECT.

El diagnóstico se realiza comparando el número, el tamaño y/o la intensidad de los loci etiquetados con los valores de referencia correspondientes. Los valores de referencia pueden representar los niveles medios en una población de individuos no enfermos. Los valores de referencia también pueden representar los niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de referencia se pueden determinar en un paciente antes de comenzar el tratamiento, y los valores medidos a partir de entonces se comparan con los valores de referencia. Una disminución en los valores respecto de los valores de referencia indica una respuesta positiva al tratamiento.

Los anticuerpos se pueden usar para generar anticuerpos anti-idiotipo. (véase, por ejemplo, Greenspan & Bona, FASEB J. 7 (5): 437-444, 1989; y Nissinoff, J. Immunol. 147: 2429-2438, 1991). Dichos anticuerpos anti-idiotipo pueden utilizarse en farmacocinética, farmacodinámica, estudios de biodistribución, así como en estudios de respuestas clínicas de anticuerpos humanos-anti-humanos (HAHA) en individuos tratados con los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-idiotípicos se unen específicamente a la región variable de los anticuerpos 1H7 humanizados y, por lo tanto, pueden usarse para detectar anticuerpos 1H7 humanizados en estudios farmacocinéticos y ayudar a cuantificar las respuestas de anticuerpos humanos-anti-humanos (HAHA) en individuos tratados.

Si se asocian diferentes versiones de una secuencia con un número de acceso en diferentes momentos, se entiende la versión asociada con el número de acceso en la fecha de presentación efectiva de esta solicitud. La fecha de presentación efectiva se refiere a la fecha de presentación anterior de la fecha de presentación concreta o la fecha de presentación de una solicitud de prioridad que se refiere al número de acceso, si es aplicable. Del mismo modo, si se publican diferentes versiones de una publicación, sitio web o similares en diferentes momentos, se entiende la versión más recientemente publicada en la fecha de presentación efectiva de la solicitud, a menos que se indique lo contrario. Cualquier característica, etapa, elemento, realización o aspecto de la invención se puede usar en combinación con cualquier otro a menos que se indique específicamente lo contrario.

Ejemplos

Ejemplo I. Diseño de anticuerpos 1H7 humanizados

El punto de partida o el anticuerpo donante para la humanización es el anticuerpo de ratón 1H7 producido por el híbrido que tiene el número de acceso de la ATCC PTA-8220 y que se describe en la solicitud de patente de los EE.UU. n° 11/710.248, publicada como US2009/0208487. Las secuencias completas de aminoácidos y de ácido nucleico de la región variable de la cadena pesada de m1H7 se proporcionan como SEQ ID N°: 4 y 5, respectivamente. Las secuencias completas de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera de m1H7 se proporcionan como SEQ ID N°s: 6 y 7, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada de m1H7 maduro se proporcionan como SEQ ID N°: 8 y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera de m1H7 maduro se proporcionan como SEQ ID N°s: 10 y 11, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada se proporcionan como SEQ ID N°s: 12, 13, y 14, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera se proporcionan como SEQ ID N°s: 15, 16, y 17, respectivamente. En este Ejemplo se utiliza la numeración de Kabat.

La región variable kappa (V_k) de m1H7 pertenece al subgrupo 3 de Kabat de ratón, que corresponde al subgrupo 1 de Kabat humano. La región variable pesada (V_h) de 1H7 pertenece al subgrupo 5a de Kabat de ratón, que

5 corresponde al subgrupo 1 de Kabat humano (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición). Publicación del NIH N° 91-3242, 1991). La CDR-L1 de 15 residuos pertenece a la clase canónica 5 (obsérvese que la Metionina de la posición 33 normalmente es Leucina en esta clase), la CDR-L2 de 7 residuos pertenece a la clase canónica 1, la CDR-L3 de 9 residuos pertenece a la clase canónica 1 de Vk (Martin y Thornton, J Mol Biol. 263: 800-15, 1996). La CDR-H1 de 5 residuos pertenece a la clase canónica 1, la CDR-H2 de 17 residuos pertenece a la clase canónica 2 (Martin y Thornton, J Mol Biol. 263: 800-15, 1996). La CDR-H3 no tiene clases canónicas, pero el bucle de 8 residuos probablemente tiene una base retorcida de acuerdo con las reglas de Shirai et al., FEBS Lett. 455: 188-97 (1999).

10 Los residuos en la interfase entre los dominios Vk y Vh son los hallados habitualmente, excepto porque F46 en la cadena kappa normalmente es una Leucina. Esto hace que esta posición sea un candidato para la retromutación. Se realizó una búsqueda a lo largo de las secuencias de proteínas en la base de datos de PDB (Deshpande et al., Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005) para encontrar estructuras que proporcionasen un modelo estructural aproximado de 1H7. El anticuerpo anti-VIH 0.5B tiene una buena similitud de secuencia global con Vk de 1H7, conservando las mismas estructuras canónicas para los bucles. La estructura de RMN del anticuerpo anti-VIH 0.5B (código pdb 1QNZ; Tugarinov et al., Structure 8: 385-95, 2000) se utilizó para la estructura de Vk en el modelado. El anticuerpo anti-alfa-(2→8)-ácido polisialico tiene una buena similitud de secuencia global con la estructura de Vh de 1H7. También tiene una CDR-H3 de una longitud similar con una base retorcida. La estructura del anticuerpo anti-alfa-(2→8)-ácido polisialico (1PLG; Evans et al., Biochemistry 34: 6737-44, 1995) tiene una resolución razonable (2.8Å), y se utilizó para la estructura de Vh en el modelado. Además, las CDR-H1 y H2 del anticuerpo anti-alfa-(2→8)-ácido polisialico tienen las mismas estructuras canónicas que Vh de 1H7. Se utilizó DeepView/Swiss-PdbViewer 3.7 (SP5) (Guex & Peitsch, Electrophoresis 18: 2714-2723, 1997) para modelar una estructura aproximada de 1H7fv.

25 Una búsqueda en la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes del NCBI permitió la selección de estructuras humanas adecuadas en las que injertar las CDRs murinas. Para Vk, se eligió una cadena ligera kappa humana con el código de acceso del NCBI AAY33358 (GI: 63102905; SEQ ID N°: 43) (Kramer et al., Eur J Immunol. 35: 2131-45, 2005). Tiene las mismas clases canónicas para CDR-L2 y L3, y pertenece a la línea germinal A30 de kappa humana, un miembro del subgrupo 1 de kappa humana de Kabat. AAY33358 tiene una identidad de secuencia del 65,4% en la región estructural de la región variable de la cadena ligera respecto de la cadena ligera de 1H7 murino. Para Vh, se eligió la cadena pesada de Ig humana BAC02037 (GI: 21670055; SEQ ID N°: 42), perteneciente a la línea germinal pesada humana VH1-18. Es miembro del subgrupo 1 pesado humano de Kabat. Comparte la forma canónica de CDR-H1 y H2 de 1H7, y H3 tiene una longitud de 8 residuos con una base retorcida predicha. BAC02037 tiene una identidad de secuencia del 65,8% en la región estructural de la región variable respecto de la cadena pesada de 1H7 murino. Las secuencias variables de la cadena pesada y ligera de 1H7 humanizadas que no tienen retromutaciones o mutaciones de CDR se proporcionan como SEQ ID N°s: 44-45.

35 Se construyeron cuatro variantes de regiones variables de la cadena ligera humanizada y cinco variantes de la región variable de la cadena pesada humanizada que contenían diferentes permutaciones de las sustituciones anteriores (Hu1H7VLv1-v4; SEQ ID N°: 32-39 y Hu1H7VHv1-v5; SEQ ID N°: 18-27 respectivamente) (Figs. 1-2 y Tabla 1). Las SEQ ID N°s: 19, 21, 23, 25, 27, 33, 35, 37 y 39 incluyen retromutaciones como se muestra en la Tabla 1. Además, dos cadenas pesadas humanizadas (SEQ ID N°s: 25, 27) incluyen la mutación C → S en la posición H97 (numeración de Kabat) de la CDR3 de la cadena pesada (Figs. 1-2 y Tabla 1). Los aminoácidos en L46, L49, L83, H11, H28, H38, H48, H67, H69, H71, H91 y H97 en Hu1H7VLv1-v4 y Hu1H7VHv1-v5 se enumeran en la Tabla 2.

40 Se descubrió que la variante H3L3 hu1H7VHv3 (SEQ ID N°: 23) -Hu1H7VLv3 (SEQ ID N°: 37) proporciona la constante de disociación más baja (constante de asociación más alta), igual que 1H7 de ratón dentro del EEM.

Tabla 1 Retromutaciones de V_H, V_L y mutaciones de CDR

variante de V _H	secuencia aceptora de exones de V _H	residuos de la región estructural donante	mutaciones de CDR
Hu1H7VHv1 (SEQ ID N°: 19)	código de acceso del NCBI BAC02037	H11, H28, H38, H48, H67, H69, H71, H91	
Hu1H7VHv2 (SEQ ID N°: 21)	código de acceso del NCBI BAC02037 (SEQ ID N°: 42)	H28, H48, H67, H69, H71, H91	
Hu1H7VHv3 (SEQ ID N°: 23)	código de acceso del NCBI BAC02037 (SEQ ID N°: 42)	H67, H71	
Hu1H7VHv4 (SEQ ID N°: 25)	código de acceso del NCBI BAC02037 (SEQ ID N°: 42)	H28, H48, H67, H69, H71, H91	H97
Hu1H7VHv5 (SEQ ID N°: 27)	código de acceso del NCBI BAC02037 (SEQ ID N°: 42)	H67, H71	H97
variante de V _L	secuencia aceptora de exones de V _L	residuos de la región estructural donante	

Tabla 1 Retromutaciones de V_H, V_L y mutaciones de CDR

variante de V _H	secuencia aceptora de exones de V _H	residuos de la región estructural donante	mutaciones de CDR
Hu1H7VLv1 (SEQ ID N°: 33)	código de acceso del NCBI AAY33358 (SEQ ID N°: 43)	L46, L49, L83	
Hu1H7VLv2 (SEQ ID N°: 35)	código de acceso del NCBI AAY33358 (SEQ ID N°: 43)	L46, L83	
Hu1H7VLv3 (SEQ ID N°: 37)	código de acceso del NCBI AAY33358 (SEQ ID N°: 43)	L46, L49	
Hu1H7VLv4 (SEQ ID N°: 39)	código de acceso del NCBI AAY33358 (SEQ ID N°: 43)	L46	

Tabla 2. Numeración de Kabat de algunos residuos de la región estructural para la retromutación y las mutaciones de CDR en anticuerpos 1H7 humanizados

	cadena ligera de AAY3 3358	cadena pesada de BAC02 037	1H7 de ratón	Hu1H7VH1	HuH7VH2	HuH7VH3	HuH7VH4	HuH7VH5	HuH7VL1	HuH7VL2	HuH7VL3	HuH7VL4
H11	-	V	L	V	V	V	V	V	-	-	-	-
H28	-	T	S	S	S	T	S	T	-	-	-	-
H38	-	R	K	R	R	R	R	R	-	-	-	-
H48	-	M	I	I	I	M	I	M	-	-	-	-
H67	-	V	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-
H69	-	M	L	L	L	M	L	M	-	-	-	-
H71	-	T	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-
H91	-	Y	F	F	F	Y	F	Y	-	-	-	-
H97	-	G	C	C	C	C	S	S	-	-	-	-
L46	L	-	F	-	-	-	-	-	F	F	F	F
L49	Y	-	C	-	-	-	-	-	C	Y	C	Y
L83	F	-	A	-	-	-	-	-	A	A	F	F

ES 2 749 457 T3

Las razones para la selección de las posiciones anteriores como candidatos para la sustitución son las siguientes.

L46F (aquí como en cualquier otra parte de la presente memoria para las retromutaciones de la región estructural, el primer residuo mencionado es el residuo humano y el segundo el residuo de ratón): Esta posición corresponde a residuos de la interfase Vk/Vh.

5 Y49C: la cisteína en esta posición es inusual en la secuencia de ratón o humano. Al ocupar una posición en el centro del sitio de unión al antígeno, este residuo puede unirse al antígeno o mantener la conformación de los bucles.

10 F83A: en la región estructural humana, esta posición está ocupada por fenilalanina, un aminoácido más grande. Por lo tanto, A83 sería inusual en las regiones estructurales humanas. En el anticuerpo humanizado, el dominio constante será humano y no de ratón, por lo que el F83 humano sería habitual. Sin embargo, esta posición en Vk está muy cerca del dominio constante y puede interferir con el empaquetamiento contra la región constante. Por lo tanto, sería interesante retromutarlo en A para ver si hay diferencia.

V11L: esta posición contacta con el dominio constante y, por lo tanto, puede alterar la topografía del sitio de unión.

T28S: esta posición contribuye a la conformación de CDR-H1, pero también puede unirse al antígeno. La mutación T → S es una mutación conservativa.

15 R38K: esta posición se encuentra debajo de CDR-H2, interaccionando con F63 en el modelo. La mutación R → K es una mutación conservativa.

M48I: Esta posición se encuentra debajo de F63 en CDR-H2 en el modelo. La mutación M → I es una mutación conservativa.

V67A: Esta posición se encuentra debajo de CDR-H2. La mutación V → A no es una mutación conservativa.

20 M69L: Esta posición se encuentra debajo de CDR-H2. La mutación M → L es una mutación conservativa.

T71A: Esta posición es un residuo canónico para CDR-H2. La mutación T → A no es una mutación conservativa.

Y91F: Esta posición es un residuo de interfase que interactúa con P44 en la cadena ligera. La mutación Y → F es una mutación conservativa.

C97S: Esta mutación de CDR en CDRH3 evita la modificación postraduccional de la cisteína.

25 >Hu1H7Vk Versión1

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQSV****DYDGDSYMN**WYQQKPGKAPKFLIC**AASNLES**GVPSRFSGSGSG
TDFLTISLQPEDAATYYC**QQSNEDPFT**FGQGTKLEIK (SEQ ID N°: 33)

>Hu1H7Vk Versión2

30 DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQSV****DYDGDSYMN**WYQQKPGKAPKFLI**AASNLES**GVPSRFSGSGSG
TDFLTISLQPEDAATYYC**QQSNEDPFT**FGQGTKLEIK (SEQ ID N°: 35)

>Hu1H7Vk Versión3

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQSV****DYDGDSYMN**WYQQKPGKAPKFLIC**AASNLES**GVPSRFSGSGSG
TDFLTISLQPEDFATYYC**QQSNEDPFT**FGQGTKLEIK (SEQ ID N°: 37)

>Hu1H7Vk Versión4

35 DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQSV****DYDGDSYMN**WYQQKPGKAPKFLI**AASNLES**GVPSRFSGSGSG
TDFLTISLQPEDFATYYC**QQSNEDPFT**FGQGTKLEIK (SEQ ID N°: 39)

> Hu1H7vh Versión1

QVQLVQSGAELKPKGASVKVSKASGYSFT**SYIH**WVKQAPGQGLEWIG**WIYPGSGNTKYSEKFKGR**ATLT
ADTSTSTAYMELRSLRSDDAVYFCAR**DGCYGFAY**WGQGLTVTVSS (SEQ ID N°: 19)

40 > Hu1H7vh Versión2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFT**SYIH**WVRQAPGQGLEWIG**WIYPGSGNTKYSEKFKGR**ATLT
ADTSTSTAYMELRSLRSDDAVYFCAR**DGCYGFAY**WGQGLTVTVSS (SEQ ID N°: 21)

> Hu1H7vh Versión3

45 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT**SYIH**WVRQAPGQGLEWMG**WIYPGSGNTKYSEKFKGR**ATM
TADTSTSTAYMELRSLRSDDAVYYCAR**DGCYGFAY**WGQGLTVTVSS (SEQ ID N°: 23)

> Hu1H7vh Versión4

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYIHVWRQAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYSEKFKGRATLT
ADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCARDGSYGFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID N°: 25)

> Hu1H7vh Versión5

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHVWRQAPGQGLEWMGWIYPGSGNTKYSEKFKGRATM
TADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGSYGFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID N°: 27)

Ejemplo II. Análisis cinético de la unión de anticuerpos 1H7 murinos, quiméricos y humanizados

Se han caracterizado las cinéticas de unión de los anticuerpos 1H7 humanizados que comprenden una cadena pesada seleccionada de Hu1H7VHv1-5 y una cadena ligera seleccionada de Hu1H7VLv1-4.

10 El análisis cinético de la unión completa de los anticuerpos a Biacore se llevó a cabo utilizando Biacore. Se determinaron los parámetros cinéticos de unión detallados (tasa de asociación, k_a , tasa de disociación, k_d y constante de afinidad, K_D) para anticuerpos 1H7 murino (Fig. 3A), 1H7 quimérico (Fig. 3B) y 1H7 humanizado (Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv3, Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv1, Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv1) (Fig. 3C). Los parámetros cinéticos de unión del 1H7 humanizado, en particular Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv3, son comparables a los del 1H7 murino.

15 Tabla 3. Parámetros cinéticos de unión de 1H7 murino, 1H7 quimérico y 1H7 humanizado (Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv3, Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv1, Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv1)

Anticuerpo	k_a (1/ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
1H7 murino	1,0e6	9,6e-3	9,5
1H7 quimérico	1,7e6	1,3e-2	7,4
1H7 humanizado H3L3 (Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv3)	1,3e6	1,1e-2	9,0
1H7 humanizado H3L1 (Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv1)	1,1e6	1,3e-2	12
1H7 humanizado H4L1 (Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv1)	9,7e5	3,3e-2	33,9
1H7 humanizado H5L1 (Hu1H7VHv5-Hu1H7VLv1)	8,8e5	5,6e-2	64,0
1H7 humanizado H4L4 (Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv4)	N/A *	N/A *	N/A *

Los parámetros cinéticos de unión no se pudieron determinar para Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv4 a concentraciones comparables a las utilizadas en el análisis para otros anticuerpos 1H7 humanizados o 1H7 murino/quimérico.

20 La cinética de unión de los anticuerpos 1H7 humanizados también se midió mediante interferometría de biocapa (BLI) utilizando un instrumento ForteBio Octet QK (ForteBio, Menlo Park, CA). Se determinaron los parámetros cinéticos de unión detallados (velocidad de asociación, k_a aparente, velocidad de disociación, k_d aparente y constante de afinidad, K_D aparente) para los anticuerpos 1H7 quimérico y diversos 1H7 humanizados (Tablas 6-7, Figs. 4A-C). La k_a aparente, k_d aparente y K_D aparente son parámetros cinéticos de unión obtenidos utilizando los formatos de ensayo de ForteBio. Estos parámetros difieren de k_a , k_d y K_D medidos usando ensayos Biocore debido, por ejemplo, a los efectos de la avidéz asociados con los formatos de ensayo de ForteBio.

25

Tabla 4. Parámetros cinéticos de unión de 1H7 quimérico y 1H7 humanizado (Hu1H7VHv1-Hu1H7VLv1, Hu1H7VHv1-Hu1H7VLv2, Hu1H7VHu1-Hu1H7VLv3, Hu1H7VHv1-Hu1H7VLv4, Hu1H7VHv2-Hu1H7VLv1, Hu1H7VHv2-Hu1H7VLv2)

Anticuerpo	Ka aparente (1/Ms)	Kd aparente (1/s)	K _D aparente (nM)
1H7 quimérico	4,7e5	1,1e-6	2,3e-3
1H7 humanizado H1L1 (Hu1H7VHv1-Hu1H7VLv1)	2,5e5	1,2e-3	4,8
1H7 humanizado H1L2 (Hu1H7VHv1-Hu1H7VLv2)	1,6e6	9e-3	5,8
1H7 humanizado H1L3 (Hu1H7VHv1-Hu1H7VLv3)	2,2e5	6,4e-4	2,9
1H7 humanizado H1L4 (Hu1H7VHv1-Hu1H7VLv4)	1,8e6	5,8e-3	3,3
1H7 humanizado H2L1 (Hu1H7VHv2-Hu1H7VLv1)	5,8e5	4,2e-6	7,2e-3
1H7 humanizado H2L2 (Hu1H7VHv2-Hu1H7VLv2)	2,3e6	4,6e-3	2

5

Tabla 5. Parámetros cinéticos de unión de 1H7 quimérico y 1H7 humanizado (Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv2, Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv3, Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv4, Hu1H7VHv5-Hu1H7VLv2, Hu1H7VHv5-Hu1H7VLv3, Hu1H7VHv5-Hu1H7VLv4)

Anticuerpo	Ka aparente (1/Ms)	Kd aparente (1/s)	K _D aparente (nM)
1H7 quimérico	8,3e5	8,7e-4	1,0
1H7 humanizado H4L2 (Hu17VHv4-Hu1H7VLv2)	1,2e6	2,1e-3	1,7
1H7 humanizado H4L3 (Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv3)	7,4e5	2,0e-3	2,7
1H7 humanizado H4L4 (Hu1H7VHv4-Hu1H7VLv4)	5,2e5	2,3e-3	4,4
1H7 humanizado H5L2 (Hu1H7VHv5-Hu1H7VLv2)	5,2e5	2,1e-3	4,0
1H7 humanizado H5L3 (Hu1H7VHv5-Hu1H7VLv3)	7,6e5	2,0e-3	2,6
1H7 humanizado H5L4 (Hu1H7VHv5-Hu1H7VLv4)	1,6e6	1,9e-3	1,2

- 10 Los anticuerpos 1H7 humanizados, en particular Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv3 y Hu1H7VHv3-Hu1H7VLv1, exhibieron patrones de tinción de varias regiones (p. ej., cuerpo estriado, capa de células piramidales, corteza, sustancia negra) de cerebro de ratón transgénico o no transgénico similar a los de 1H7 murino.

EJEMPLO II. Inmunización pasiva con anticuerpos hacia α -sinucleína

- 15 El objetivo de este experimento es determinar la efectividad de los anticuerpos hacia α -sinucleína en estudios *in vitro* e *in vivo*, así como en ensayos conductuales. Se usaron ratones hembra transgénicos para α -sinucleína (Línea 61), con inactivación de α -sinucleína y de tipo natural, de 3-4 meses de edad al inicio y n = 14/grupo. Los anticuerpos ensayados incluyeron 9E4 (IgG1, epítipo: aminoácidos 118-126 de alfa sinucleína), 5C1 (IgG1, epítipo: aminoácidos 118-126 de alfa sinucleína, conector c), 5D12, IgG2 (SN118-126), 1H7, IgG1 (SN 91-99) y un anticuerpo de control IgG1 27-1. Los ratones recibieron una dosis de 10 mg/kg durante un período de 5 meses,
- 20 durante un total de 21 inyecciones. Además, se inyectó a los animales lentivirus (LV) que expresaba la α -sinucleína humana (t.n.) mediante la introducción unilateral de la α -sinucleína humana (t.n.) en el hipocampo.

Los anticuerpos de lectura incluyen los de Chemicon (epítipo: alfa sinucleína de longitud completa), Millipore (epítipo: alfa sinucleína de longitud completa) y Neotope, ELADW 105 (epítipo: aminoácidos 121-124 de alfa sinucleína de longitud completa).

- 25 Resultados: Los títulos de anticuerpos se midieron durante la fase de vida. Los ensayos conductuales incluyen la

- 5 prueba del laberinto acuático de Morris (MWW) y la prueba de travesaño horizontal. La prueba de travesaño redondo es una prueba de equilibrio motor, coordinación y marcha realizada con dos travesaños de diámetro variable. El travesaño A tiene el diámetro más grande (más fácil, considerado el travesaño de entrenamiento), y el travesaño D tiene el diámetro más pequeño (más difícil, considerado el travesaño de prueba). Los datos se presentan como "errores" (número de resbalones/10 cm) y "velocidad" (tiempo necesario para desplazarse 10 cm/seg). El rendimiento en el laberinto acuático se realizó a las 10 semanas y en la finalización. Se tomaron las siguientes medidas de neuropatología: agregación de alfa sinucleína, sinaptofisina y MAP2. Se tomaron las siguientes medidas de bioquímica: alfa sinucleína, PSD95, sinaptofisina. Se realizaron marcajes confocales y multimarcajes seleccionados mediante el uso de marcadores sinápticos, neuronales y gliales.
- 10 Los resultados mostraron que todos los anticuerpos, excepto 5D12, produjeron una reducción significativa de la acumulación de α -syn y la conservación de las densidades sinápticas y dendríticas, así como resultados positivos en el rendimiento de MWM. El anticuerpo 9E4 es efectivo en estudios *in vitro* e *in vivo*, así como en ensayos conductuales. Las lecturas indican que el anticuerpo puede reducir los agregados de alfa sinucleína neurítica/axonal.
- 15 Resultados conductuales: El anticuerpo 1H7 (así como los anticuerpos 9E4 y 5C1) mejoraron el rendimiento en el laberinto acuático en ratones transgénicos con α -sinucleína, mientras que 5D12 no lo hizo. Los anticuerpos 9E4 y 1H7 mejoraron el rendimiento en la prueba del travesaño, medido tanto por la velocidad como por los errores, mientras que los anticuerpos 5D12 y 5C1 no lo hicieron (Fig. 6).
- 20 Resultados de neuropatología: Los anticuerpos 9E4, 1H7 y 5C1 redujeron la distrofia neurítica positiva para ELADW-105, mientras que el anticuerpo 5D12 no lo hizo. En ratones transgénicos con alfa sinucleína, el anticuerpo 9E4 redujo el área de neuropilo en un 43% en la neocorteza y en un 40% en los ganglios basales en comparación con el control. El anticuerpo 9E4 también conservó la sinaptofisina y MAP2 en la neocorteza y los ganglios basales.

DEPÓSITO

- 25 Las siguientes líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales se han depositado en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC, PO Box 1549, Manassas, VA 20108) en las fechas indicadas:

Anticuerpo monoclonal	Línea celular	Epítipo/Especificidad	Isotipo	Fecha de depósito	Nº de acceso
1H7	JH17.1H7.4.24.34	residuos 91-99 de alfa-sinucleína	IgG1	26 de febrero de 2007	PTA-8220

A menos que sea evidente por el contexto, cualquier etapa, característica, realización o aspecto se puede usar en combinación con cualquier otro.

Listado de secuencias

- 30 **SEQ ID NO:1** Alfa-sinucleína humana natural de tipo salvaje
 MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVAT
 VAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQ
 EGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA
- SEQ ID NO:2** Dominio del componente no amiloide (NAC) de la alfa-sinucleína según lo informado por Jensen et al.
 EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV
- 35 **SEQ ID NO:3** dominio del componente no amiloide (NAC) de alfa-sinucleína según lo informado por Ueda et al.
 KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS

SEQ ID NO:4 secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada del anticuerpo m1H7 (señal peptídica subrayada; CDR mostrado en negrita y subrayado)

ATGGGATGGAGCTGGGTCTTTATCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCATTG
CCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGACTTCAGTG
 AAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTACAA**AGCTACTATATACTGG**
 GTGAAGCAGAGTCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGAT**TGGATTTATCCTGGA**
AGTGGTAATACTAAGTACAGTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG
 CAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA
 CTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGAG**GATGGTTGCTACGGGTTTGCTTACTGGGG**
 CCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCT

SEQ ID NO:5 secuencia de aa variable de la cadena pesada de anticuerpo m1H7 (señal peptídica subrayada; CDR mostrado en negrita y subrayado)

MGWSWVFIFLLSGTAGVHCQVQLQSGPELVKPGTSVKISCKASGYSFT**SYIHWVK**
QSPGQGLEWIG**WIYPSGNTKYSEKFKG**KATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
 FCAR**DGCYGFAY**WGQGLVTVS

SEQ ID NO:6 secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera de anticuerpo m1H7 (señal peptídica subrayada; CDR mostrado en negrita y subrayado)

ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCA
CTGGTGACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG
 AGGGCCACCATCTCCTGCA**AAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAG**
TTATATGAACTTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAATTCCTCATCTG
TGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTC
 TGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACC
 TATTACTGT**CAGCAAAGTAATGAGGATCCATTCAG**TTCGGCTCGGGGACAAA
 GTTGGAAATAAAA

SEQ ID NO:7 secuencia de aa variable de la cadena ligera de anticuerpo m1H7 (señal peptídica subrayada; CDR mostrado en negrita y subrayado)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCK**KASOSVDYDGDSY**
MNWYQKQKPGQPPKFLIC**AASNLES**GIPARFSGSGGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQ
QSNEDPFTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO:8 secuencia de nucleótidos variable de la cadena pesada de anticuerpo m1H7 maduro (CDR se muestra en negrita y subrayado)

GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGA
 TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTACAA**AGCTACTATATACT**GGGTGAA
 GCAGAGTCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGAT**TGGATTTATCCTGGAAGTG**
GTAATACTAAGTACAGTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGAC
 ACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTG
 CAGTCTATTTCTGTGCAAGAG**GATGGTTGCTACGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAG**
 GGACTCTGGTCACTGTCTCT

SEQ ID NO:9 secuencia de aa variable de la cadena pesada de anticuerpo m1H7 maduro (CDR se muestra en negrita y subrayado)

VQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGYSFT**SYYIH**WVKQSPGQGLEWIG**WIYPGSGNT**
KYSEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARD**DGCYGFAY**WGQGLTV
TVS

SEQ ID NO:10 secuencia de nucleótidos variable de la cadena ligera de anticuerpo m1H7 maduro (CDR se muestra en negrita y subrayado)

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGTCTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGG
CCACCATCTCCTGCA**AAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTAT**
ATGAACTTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAATTCCTCATCTGT**GCT**
GCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTGTGGCAGTGGGTCTGGG
ACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATT
ACTGT**CAGCAAAGTAATGAGGATCCATTCACG**TTCGGCTCGGGGACAAAGTTG
GAAATAAAA

SEQ ID NO:11 secuencia de aa variable de la cadena ligera de anticuerpo m1H7 maduro (CDR se muestra en negrita y subrayado)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCK**KASQSVDYDGD**SYMNWYQQKPGQPPKFLICA**AASN**
LESGIPARFSGSGSGTDFLNIHPVEEEDAATYYC**QOSNEDPFT**FGSGTKLEIK

SEQ ID NO:12 CDR1 de la cadena pesada de anticuerpo m1H7 (Definición de kabat)

SYYIH

SEQ ID NO:13 CDR2 de la cadena pesada de anticuerpo m1H7 (Definición de kabat)

WIYPGSGNTKYSEKFKG

SEQ ID NO:14 CDR3 de la cadena pesada de anticuerpo m1H7 (Definición de kabat)

DGCYGFAY

SEQ ID NO:15 CDR1 de la cadena ligera de anticuerpo m1H7 (Definición de kabat)

KASQSVDYDGDSYMN

SEQ ID NO:16 CDR2 de la cadena ligera de anticuerpo m1H7 (Definición de kabat)

AASNLES

SEQ ID NO:17 CDR3 de la cadena ligera de anticuerpo m1H7 (Definición de kabat)

OOSNEDPFT

SEQ ID NO:18 Hu1H7VHv1 (sec. nucleótidos)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTG
AAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTTACCTCCTACTACATCCACTGGGT
GAAGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTGGATCTACCCCGGCTC
CGGCAACACCAAGTACTCCGAGAAGTTCAAGGGCCCGCCACCCTGACCGCCGA
CACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGCGCTCCCTGCGCTCCGACGACACC
GCCGTGTACTTCTGCGCCCCGCGAGCTGCTACGGCTTCGCCTACTGGGGCCAGG
GCACCCTGGTGACCGTGTCTCA

SEQ ID NO:19 Hu1H7VHv1 (sec. aminoácidos) (CDR se muestra en negrita y subrayado)

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSKASGYSFTSYIHWVKQAPGQGLEWIGWIYPGSG
NTKYSEKFKGRATLTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCARDGCYGFAYWGQGT
 LTVVSS

SEQ ID NO:20 Hu1H7VHv2 (sec. nucleótidos)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTG
 AAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTCACCTCCTACTACATCCACTGGGT
 GCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTGGATCTACCCCGGCTCC
 GGCAACACCAAGTACTCCGAGAAGTTCAAGGGCCGCGCCACCCTGACCGCCGAC
 ACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGCGCTCCCTGCGCTCCGACGACACCG
 CCGTGTACTTCTGCGCCCGCGACGGCTGCTACGGCTTCGCCTACTGGGGCCAGGG
 CACCCTGGTGACCGTGTCTCA

SEQ ID NO:21 Hu1H7VHv2 (sec. aminoácidos) (CDR se muestra en negrita y subrayado)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYPGS
GNTKYSEKFKGRATLTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCARDGCYGFAYWGQ
 TLTVVSS

SEQ ID NO:22 Hu1H7VHv3 (sec. nucleótidos)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTG
 AAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTCACCTCCTACTACATCCACTGGG
 TGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCTACCCCGGCTC
 CGGCAACACCAAGTACTCCGAGAAGTTCAAGGGCCGCGCCACCATGACCGCCGA
 CACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGCGCTCCCTGCGCTCCGACGACACC
 GCCGTGTACTACTGCGCCCGCGACGGCTGCTACGGCTTCGCCTACTGGGGCCAGG
 GCACCCTGGTGACCGTGTCTCA

SEQ ID NO:23 Hu1H7VHv3 (sec. aminoácidos) (CDR se muestra en negrita y subrayado)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWMGWYIPGS
GNTKYSEKFKGRATMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGCYGFAYWGQ
 GTLTVVSS

SEQ ID NO:24 Hu1H7VHv4 (sec. nucleótidos)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTG
 AAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACTCCTCACCTCCTACTACATCCACTGGGT
 GCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTGGATCTACCCCGGCTCC
 GGCAACACCAAGTACTCCGAGAAGTTCAAGGGCCGCGCCACCCTGACCGCCGAC
 ACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGCGCTCCCTGCGCTCCGACGACACCG
 CCGTGTACTTCTGCGCCCGCGACGGCTcCTACGGCTTCGCCTACTGGGGCCAGGGC
 ACCCTGGTGACCGTGTCTCA

SEQ ID NO:25 Hu1H7VHv4 (sec. aminoácidos) (CDR se muestra en negrita y subrayado)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTSYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYPGS
GNTKYSEKFKGRATLTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYFCARDGSYGFAYWGQ
 TLTVVSS

SEQ ID NO:26 Hu1H7VHv5 (sec. nucleótidos)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTG
 AAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTCACCTCCTACTACATCCACTGGG
 TGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCTACCCCGGCTC
 CGGCAACACCAAGTACTCCGAGAAGTTCAAGGGCCGCGCCACCATGACCGCCGA
 CACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGCGCTCCCTGCGCTCCGACGACACC
 GCCGTGTACTACTGCGCCCGCGACGGCTcCTACGGCTTCGCCTACTGGGGCCAGG
 GCACCCTGGTGACCGTGTCTCA

SEQ ID NO:27 Hu1H7VHv5 (sec. aminoácidos) (CDR se muestra en negrita y subrayado)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTS**SYYIH**WVRQAPGQGLEWMG**WIYPGS**
GNTKYSEKFKGRATMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR**DGSYGFAYWGQ**
GTLVTVSS

SEQ ID NO:28 señal peptídica Hu1H7VH (sec. nucleótidos)

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGT
GC

SEQ ID NO:29 señal peptídica Hu1H7VH (sec. aminoácidos)

MEFGLSWLFLVAILKGVQC

SEQ ID NO:30 Hu1H7VH signal peptide (sec. nucleótidos)

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTCTTGGTGGCAGCAGCAACAGGTGCCCACT
CC

SEQ ID NO:31 señal peptídica Hu1H7VH (sec. aminoácidos)

MDWTWSILFLVAAATGAHS

SEQ ID NO:32 Hu1H7VLv1 (sec. nucleótidos)

GACATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCCGG
TGACCATCACCTGCAAGGCCTCCCAGTCCGTGGACTACGACGGCGACTCCTACAT
GAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGTTCCTGATCTGCGCCGCC
TCCAACCTGGAGTCCGGCGTGCCCTCCCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCG
ACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACGCCGCCACCTACTACTG
CCAGCAGTCCAACGAGGACCCCTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATC
AAG

SEQ ID NO:33 Hu1H7VLv1 (sec. aminoácidos) (CDR se muestra en negrita y subrayado)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQSVDYDGDSYMN**WYQKPGKAPKFLICA**AASN**
LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDAATYYC**QOSNEDPFT**FGQGTKLEIK

SEQ ID NO:34 Hu1H7VLv2 (sec. nucleótidos)

GACATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCCGG
TGACCATCACCTGCAAGGCCTCCCAGTCCGTGGACTACGACGGCGACTCCTACAT
GAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGTTCCTGATCTaCGCCGCC
TCCAACCTGGAGTCCGGCGTGCCCTCCCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCG
ACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACGCCGCCACCTACTACTG
CCAGCAGTCCAACGAGGACCCCTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATC
AAG

SEQ ID NO:35 Hu1H7VLv2 (sec. aminoácidos) (CDR se muestra en negrita y subrayado)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQSVDYDGDSYMN**WYQKPGKAPKFLIYA**AASN**
LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDAATYYC**QOSNEDPFT**FGQGTKLEIK

SEQ ID NO:36 Hu1H7VLv3 (sec. nucleótidos)

GACATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCCGG
TGACCATCACCTGCAAGGCCTCCCAGTCCGTGGACTACGACGGCGACTCCTACAT
GAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGTTCCTGATCTGCGCCGCC
TCCAACCTGGAGTCCGGCGTGCCCTCCCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCG
ACTTACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC
CAGCAGTCCAACGAGGACCCCTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATC
AAG

SEQ ID NO:37 Hu1H7VLv3 (sec. aminoácidos) (CDR se muestra en negrita y subrayado)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKFLICAASN
LESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:38 Hu1H7VLv4 (sec. nucleótidos)

GACATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCG
TGACCATCACCTGCAAGGCCTCCAGTCCGTGGACTACGACGGCGACTCCTACAT
GAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGTTCCTGATCTaCGCCGCC
TCCAACCTGGAGTCCGGCGTGCCCTCCCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCG
ACTTCACCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTtCGCCACCTACTACTGCC
AGCAGTCCAACGAGGACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCA
AG

SEQ ID NO:39 Hu1H7VLv4 (sec. aminoácidos) (CDR se muestra en negrita y subrayado)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKFLIYAASN
LESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:40 señal peptídica Hu1H7VL (sec. nucleótidos)

ATGGACATGCGCGTCCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCG
GCTCCTCCGGC

SEQ ID NO:41 señal peptídica Hu1H7VL (sec. aminoácidos)

MDMRVPAQLLGLLMLWVSGSSG

SEQ ID NO:42 aceptor humano BAC02037 (GI-21670055) utilizado para la secuencia de aminoácidos de la región estructural de la cadena pesada

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSFGISWVRQAPGQGLEWMGWISPYNG
DTNYAQNLRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRGSMSDYWGQGT
LTVVSS

SEQ ID NO:43 aceptor humano AAY33358 (GI-63102905) utilizado para la secuencia de aminoácidos de la región estructural de la cadena ligera

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:44 Hu1H7VH que no tiene retromutación o mutación de CDR

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYIHWVRQAPGQGLEWMGWYIPGS
GNTKYSEKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGCGYGFAYWGQ
TLVTVSS

SEQ ID NO:45 Hu1H7V que no tiene retromutación o mutación de CDR

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASN
LESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:46 alternativas de Hu1H7VH

QVQLVQSGAE-X₁-KKPGASVKVSCKASGY-X₂-FTSYIHWV-X₃-QAPGQGLEW-X₄-
GWIYPGSGNTKYSEKFKGR-X₅-T-X₆-T-X₇-DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY-X₈-
CARDG-X₉-YGFAYWGQGLTVTVSS

en donde -X₁- es V o L; -X₂- es S o T; -X₃- es R o K; -X₄- es M o I; -X₅- es V o A; -X₆- es M o L; -
X₇- es T o A; -X₈- es Y o F; -X₉- es C o S.

SEQ ID NO:47 alternativas de Hu1H7VL

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPK-Z₁-LI-Z₂-
AASNLESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPED-Z₃-ATYYCQQSNEPPTFGQGTKLEIK

wherein -Z₁- es L o F; -Z₂- es Y o C; -Z₃- es F o A.

SEQ ID NO:48 alternativas de Hu1H7VH CDR3

DG-X₉-YGFAY

en donde -X₉- es C o M o S o T, preferiblemente C

SEQ ID NO:49 región constante de la cadena ligera de 1H7 humanizada (con R) (común para v1-v4).

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:50 región constante de la cadena pesada de 1H7 humanizada (IgG1; común para v1-v5)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNVKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:51 región constante de la cadena ligera 1H7 humanizada (sin R) (común para v1-v4).

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:52 región constante de la cadena pesada de 1H7 humanizada (alotipo G1m3)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
LSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:53 cadena ligera 1H7 humanizada versión 3 (región variable + región constante con arginina)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKFLICAASN
LESGVPSRFSGSGGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPFTFGQGTKLEIKRTVAAP
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDKS
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:54 cadena ligera 1H7 humanizada versión 3 (región variable + región constante sin arginina)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKFLICAASN
LESGVPSRFSGSGGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPFTFGQGTKLEIKTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDKSDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:55 cadena pesada 1H7 humanizada versión 3 (región variable + región constante)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIIHWVRQAPGQGLEWMGWYIPGS
GNTKYSEKFKGRATMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGCYGFAYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTC
PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV

ES 2 749 457 T3

HNVKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:56 cadena pesada 1H7 humanizada versión 3 (región variable + región constante; alotipo G1m3)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWRQAPGQGLEWMGWYIPGS
GNTKYSEKFKGRATMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGCYGFAYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAV
LQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:57 región constante de la cadena pesada de 1H7 humanizada (IgG2).

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:58 región constante de la cadena pesada de 1H7 humanizada (alotipo G1m1)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 23 y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 33 o 37, en donde el anticuerpo se une específicamente a la alfa-sinucleína humana.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 37.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 33.
- 10 4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la región variable de la cadena pesada madura se fusiona a una región constante de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera madura se fusiona a una región constante de la cadena ligera.
5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 52, con tal de que se pueda omitir el residuo de lisina C-terminal.
- 15 6. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID N°: 49.
7. El anticuerpo de la reivindicación 4 o 6, en donde la región constante de la cadena pesada es del isotipo IgG1 humano.
- 20 8. Un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada madura y una región variable de la cadena ligera madura como se define según cualquier reivindicación precedente.
9. El ácido nucleico de la reivindicación 8 que tiene una secuencia que comprende una cualquiera de las SEQ ID N°s: 22, 32 o 36.
10. Una célula huésped que comprende un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8 o 9.
- 25 11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento de un paciente que tiene o corre el riesgo de tener una enfermedad de cuerpos de Lewy.
13. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.
- 30 14. Un método para producir un anticuerpo, que comprende cultivar células transformadas con ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, de modo que las células secretan el anticuerpo; y purificar el anticuerpo de los medios de cultivo celular; en donde el anticuerpo está definido por cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 35 15. Un método para producir una línea celular que produce un anticuerpo, que comprende introducir un vector que codifica las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo y un marcador seleccionable en las células; propagar las células en condiciones para seleccionar las células que tienen un número de copias incrementado del vector; aislar células individuales de la célula seleccionada; y establecer un banco de células clonadas a partir de una única célula seleccionada en función del rendimiento de anticuerpo; en donde el anticuerpo es un anticuerpo como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 16. El método de la reivindicación 15, que comprende además propagar las células en condiciones selectivas y cribar las líneas celulares que expresan y secretan naturalmente al menos 100 mg/L/10⁶ células/24 h del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

		Alineación de VH de 1H7																			
Numeración de Kabat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
m1H7VH	Q	V	Q	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	T	S	V	K	I
BAC02037	Q	V	Q	Q	L	V	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I
Hu1H7VHv1	Q	V	Q	Q	L	V	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I
Hu1H7VHv2	Q	V	Q	Q	L	V	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I
Hu1H7VHv3	Q	V	Q	Q	L	V	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I
Hu1H7VHv4	Q	V	Q	Q	L	V	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I
Hu1H7VHv5	Q	V	Q	Q	L	V	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I
Numeración de Kabat		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
m1H7VH	S	C	K	A	S	G	G	Y	S	F	T	S	Y	Y	I	H	W	V	K	Q	S
BAC02037	S	C	K	A	S	G	G	Y	T	F	T	S	F	G	I	S	W	V	R	Q	A
Hu1H7VHv1	S	C	K	A	S	G	G	Y	S	F	T	S	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A
Hu1H7VHv2	S	C	K	A	S	G	G	Y	S	F	T	S	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A
Hu1H7VHv3	S	C	K	A	S	G	G	Y	T	F	T	S	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A
Hu1H7VHv4	S	C	K	A	S	G	G	Y	S	F	T	S	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A
Hu1H7VHv5	S	C	K	A	S	G	G	Y	T	F	T	S	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A
Numeración de Kabat		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59
m1H7VH	P	G	Q	G	L	E	E	W	I	G	W	I	Y	P	G	S	G	N	T	K	Y
BAC02037	P	G	Q	G	L	E	E	W	M	G	W	I	S	P	Y	N	G	D	T	N	Y
Hu1H7VHv1	P	G	Q	G	L	E	E	W	I	G	W	I	Y	P	G	S	G	N	T	K	Y
Hu1H7VHv2	P	G	Q	G	L	E	E	W	I	G	W	I	Y	P	G	S	G	N	T	K	Y
Hu1H7VHv3	P	G	Q	G	L	E	E	W	M	G	W	I	Y	P	G	S	G	N	T	K	Y
Hu1H7VHv4	P	G	Q	G	L	E	E	W	I	G	W	I	Y	P	G	S	G	N	T	K	Y
Hu1H7VHv5	P	G	Q	G	L	E	E	W	M	G	W	I	Y	P	G	S	G	N	T	K	Y

FIG. 1A

		Alineación de VH de 1H7																			
Numeración		60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
de Kabat		S	E	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	T	S	S	S	T	A	Y
m1H7VH		<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>M</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>
BAC02037		<u>S</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>
Hu1H7VHv1		<u>S</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>
Hu1H7VHv2		<u>S</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>
Hu1H7VHv3		<u>S</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>
Hu1H7VHv4		<u>S</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>
Hu1H7VHv5		<u>S</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>M</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>
Numeración		80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
de Kabat		M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	S	A	V	F	C	A	R	D	G
m1H7VH		<u>M</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>G</u>
BAC02037		<u>M</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>G</u>
Hu1H7VHv1		<u>M</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>G</u>
Hu1H7VHv2		<u>M</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>G</u>
Hu1H7VHv3		<u>M</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>G</u>
Hu1H7VHv4		<u>M</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>G</u>
Hu1H7VHv5		<u>M</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	<u>G</u>
Numeración		97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113			
de Kabat		C	Y	G	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	-			
m1H7VH		<u>C</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>-</u>			
BAC02037		<u>C</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>S</u>			
Hu1H7VHv1		<u>C</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>S</u>			
Hu1H7VHv2		<u>C</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>S</u>			
Hu1H7VHv3		<u>C</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>S</u>			
Hu1H7VHv4		<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>S</u>			
Hu1H7VHv5		<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>S</u>			

FIG. 1B

		Alineación de VH de 1H7																			
Numeración de Kabat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
m1H7VL	D	I	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T
AAy33358	D	I	Q	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
Hu1H7VLv1	D	I	Q	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
Hu1H7VLv2	D	I	Q	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
Hu1H7VLv3	D	I	Q	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
Hu1H7VLv4	D	I	Q	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
Numeración de Kabat		21	22	23	24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	28	29	30	31	32	33	34	35	36
m1H7VL	I	S	C	K	A	A	S	Q	S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y
AAy33358	I	T	C	R	A	A	S	Q	-	-	-	-	G	I	R	N	D	L	G	W	Y
Hu1H7VLv1	I	T	C	K	A	A	S	Q	S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y
Hu1H7VLv2	I	T	C	K	A	A	S	Q	S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y
Hu1H7VLv3	I	T	C	K	A	A	S	Q	S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y
Hu1H7VLv4	I	T	C	K	A	A	S	Q	S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y
Numeración de Kabat		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
m1H7VL	Q	Q	K	P	G	G	Q	K	P	K	F	L	I	C	A	A	S	N	L	E	S
AAy33358	Q	Q	K	P	G	G	K	K	P	K	L	L	I	C	A	A	S	S	L	O	S
Hu1H7VLv1	Q	Q	K	P	G	G	K	K	P	K	F	L	I	C	A	A	S	N	L	E	S
Hu1H7VLv2	Q	Q	K	P	G	G	K	K	P	K	F	L	I	C	A	A	S	N	L	E	S
Hu1H7VLv3	Q	Q	K	P	G	G	K	K	P	K	F	L	I	C	A	A	S	N	L	E	S
Hu1H7VLv4	Q	Q	K	P	G	G	K	K	P	K	F	L	I	C	A	A	S	N	L	E	S

FIG. 2A

Alineación de VH de 1H7

Numeración
de Kabat

m1H7VL	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
AAAY33358	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H
Hu1H7VLv1	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
Hu1H7VLv2	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
Hu1H7VLv3	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
Hu1H7VLv4	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S

Numeración
de Kabat

m1H7VL	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
AAAY33358	P	L	Q	P	E	D	A	A	T	Y	Y	C	L	Q	S	N	E	D	P	F
Hu1H7VLv1	S	L	Q	P	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	F
Hu1H7VLv2	S	L	Q	P	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	F
Hu1H7VLv3	S	L	Q	P	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	F
Hu1H7VLv4	S	L	Q	P	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	F

Numeración
de Kabat

m1H7VL	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
AAAY33358	I	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K
Hu1H7VLv1	I	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
Hu1H7VLv2	I	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
Hu1H7VLv3	I	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
Hu1H7VLv4	I	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K

FIG. 2B

Anticuerpo 1H7 murino
Curva: Fc=4-3 Ligando: 1H7 de ratón Muestra: Sinucleína Temp.: 25 °C

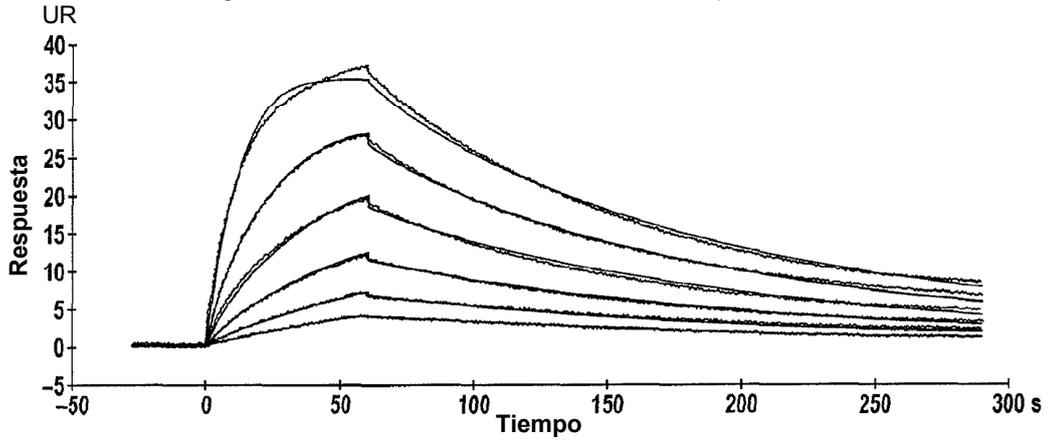


FIG. 3A

Anticuerpo 1H7 quimérico
Curva: Fc=2-1 Ligando: 1H7 quim. Muestra: Sinucleína Temp.: 25 °C

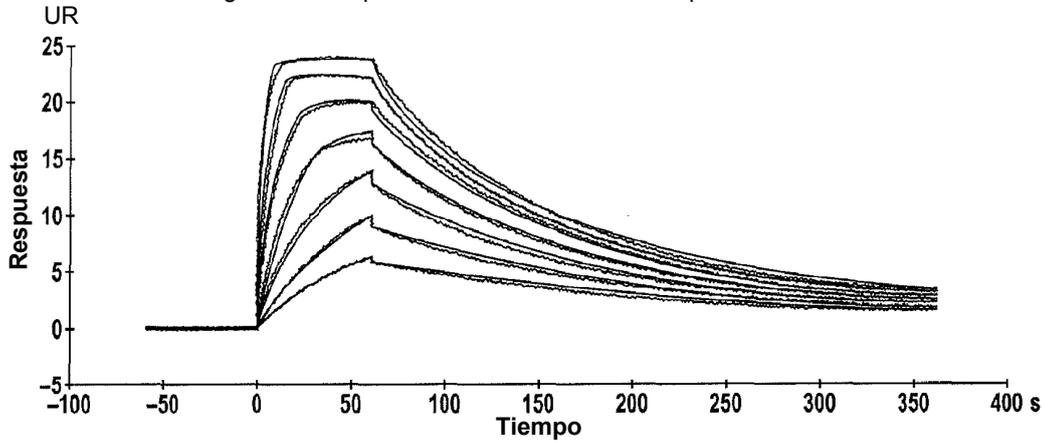


FIG. 3B

Anticuerpo 1H7 humanizado
Curva: Fc=2-1 Ligando: 1H7 h313. Muestra: Sinucleína Temp.: 25 °C

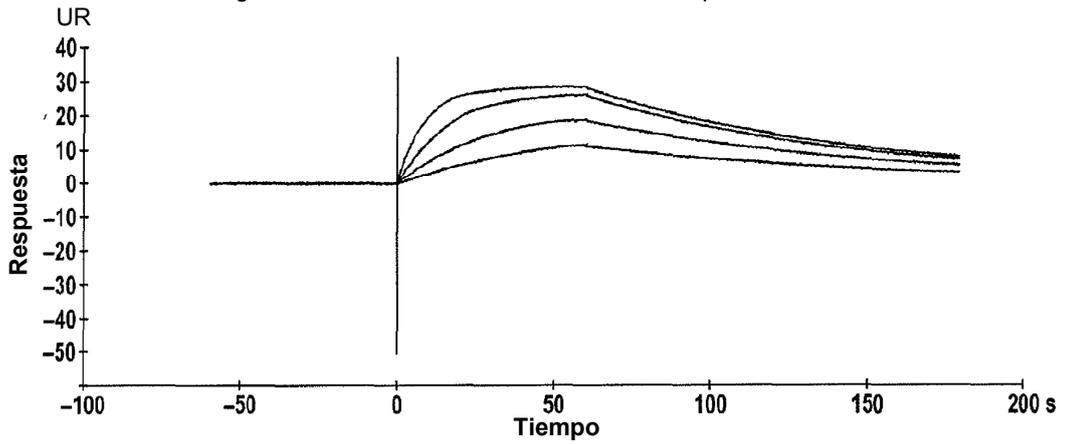


FIG. 3B

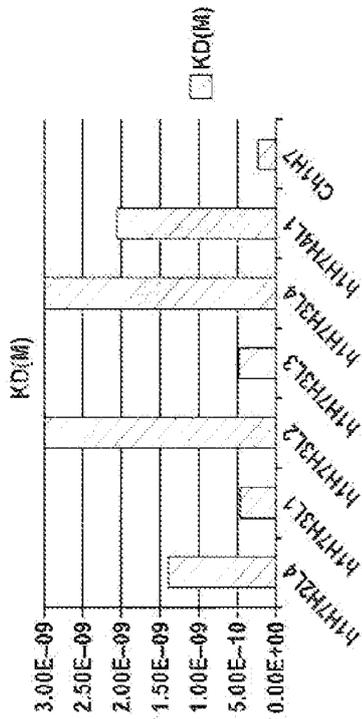


FIG. 4A

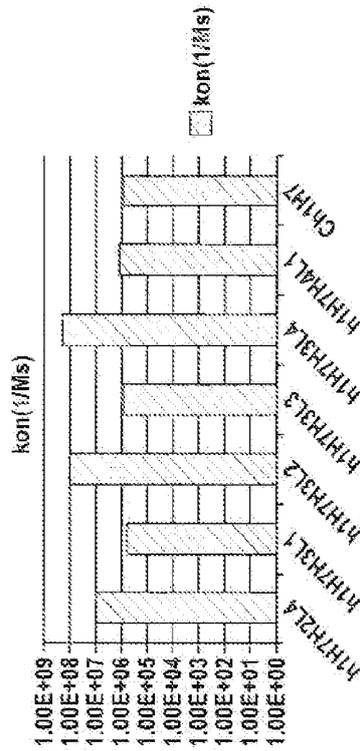


FIG. 4B

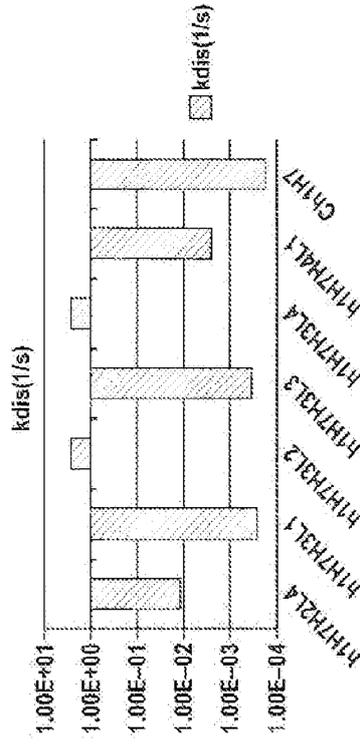


FIG. 4C

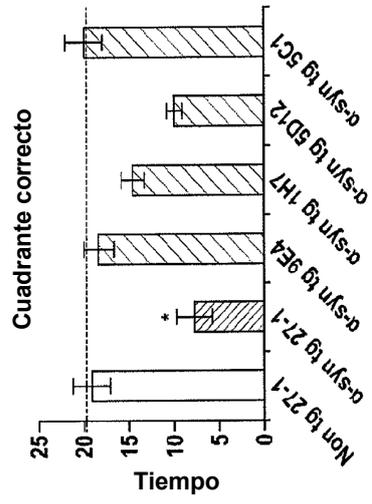
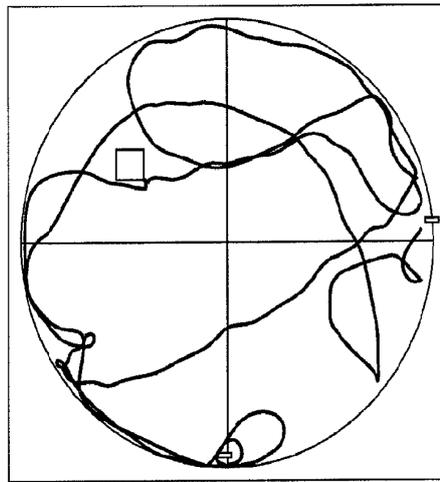


FIG. 5

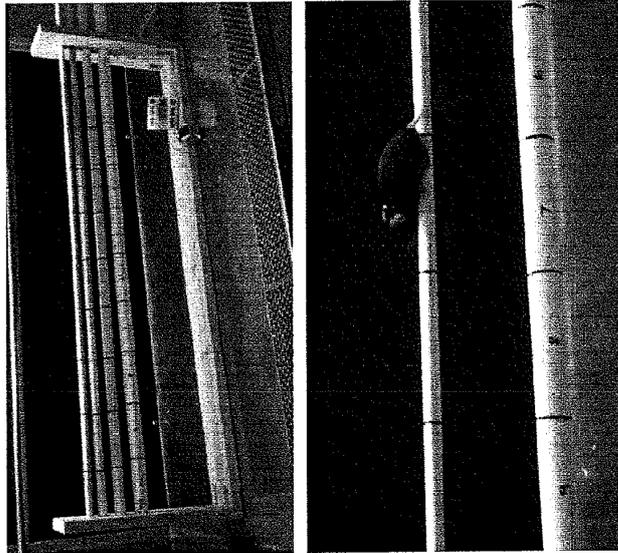
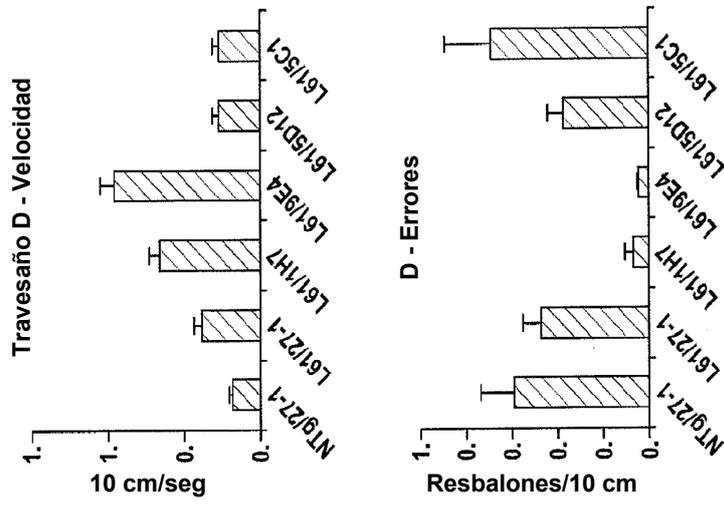


FIG. 6