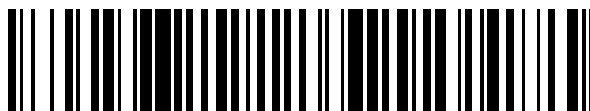


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 406**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2013 PCT/US2013/063945**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14058924**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2013 E 13845625 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2903648**

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

30 Prioridad:

08.10.2012 US 201261711204 P

26.10.2012 US 201261719281 P

27.06.2013 US 201361840432 P

30.08.2013 US 201361872366 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2019

73 Titular/es:

PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)
Adelphi Plaza, Upper George's Street, Dún
Laoghaire
Co. Dublin, A96 T927, IE

72 Inventor/es:

BARBOUR, ROBIN;
GAMES THIEL, KATE DORA y
NIJJAR, TARLOCHAN, S.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 701 406 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 que reconocen alfa-sinucleína

Antecedentes

Las sinucleinopatías, también conocidas como enfermedades del cuerpo de Lewy (LBDs), se caracterizan por la degeneración del sistema dopaminérgico, las alteraciones motoras, el deterioro cognitivo y la formación de cuerpos de Lewy (LBs) y/o neuritas de Lewy. (McKeith et al. *Neurology* (1996) 47:1113-24). Las sinucleinopatías incluyen la enfermedad de Parkinson (incluyendo la enfermedad de Parkinson idiopática), la enfermedad difusa del cuerpo de Lewy (DLBD) también conocida como demencia de los cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV), la enfermedad de Alzheimer y Parkinson combinadas, la insuficiencia autonómica pura y múltiples atrofas del sistema (MSA; por ejemplo, atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome de Shy-Drager). Se piensa que varios signos y síntomas no motores son precursores de las sinucleinopatías en la fase prodrómica de las enfermedades (es decir, el período presintomático, subclínico, preclínico o premotor). Dichos signos tempranos incluyen, por ejemplo, el trastorno del comportamiento del sueño REM (RBD), la pérdida de olfato y el estreñimiento (Mahowald et al., *Neurology* (2010) 75: 488-489). Las enfermedades del cuerpo de Lewy continúan siendo una causa común de trastornos del movimiento y deterioro cognitivo en el envejecimiento de la población (Galasko et al., *Arch. Neurol.* (1994) 51: 888-95).

La α -sinucleína es parte de una gran familia de proteínas que incluye la β -sinucleína y la γ -sinucleína y la sinoretina. La α -sinucleína se expresa en el estado normal asociado con la sinapsis y se cree que desempeña un papel en la plasticidad neural, el aprendizaje y la memoria. Varios estudios han implicado a la α -sinucleína con un papel central en la patogénesis de la PD. La proteína puede agregarse para formar fibrillas insolubles en afecciones patológicas. Por ejemplo, la sinucleína se acumula en los LBs (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 la α -sinucleína se 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 la α -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 los cuerpos de Lewy. Además, se ha sugerido que los oligómeros de sinucleína solubles pueden ser neurotóxicos (Conway et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97: 571-576; Volles et al., *J. Biochem.* (2003) 42: 7871-7878). La acumulación de α -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 los cuerpos de Lewy.

El documento de Patente US 2009/0208487 se refiere a anticuerpos terapéuticos, designados como 9E4 y 1H7. El anticuerpo 9E4 se une predominantemente a los residuos 122 y 125 de la α -sinucleína. El anticuerpo 1H7 se une predominantemente a los residuos 91-97 de la α -sinucleína. Ambos anticuerpos 9E4 y 1H7 se produjeron por inmunización con α -sinucleína de longitud completa.

El documento de Patente WO 2008/103472 se refiere también a un anticuerpo terapéutico, designado como 9E4.

Choi et al (2006) *Neuroscience Letters* 397: 53-58 se refieren a un anticuerpo, designado como Syn-1, que se produjo por inmunización con α -sinucleína de longitud completa, utilizado en el mapeo de epítomos. Se puede entender que Syn-1 se une a un epítomo que incluye los residuos 121 y 122 de la α -sinucleína debido a su especificidad por la forma humana de la α -sinucleína y estos residuos difieren entre la α -sinucleína humana y la de los roedores. Sin embargo, no se sabe de qué otros residuos contribuyen al epítomo de Syn-1.

Compendio de la invención reivindicada

La invención proporciona un anticuerpo que comprende tres CDRs de cadena ligera según lo definido por Kabat que tiene secuencias de SEQ ID NOs: 25-27 y tres CDRs de cadena pesada según lo definido por Kabat que tiene secuencias SEQ ID NOs: 10-12. Opcionalmente, el anticuerpo es una forma humanizada, quimérica o chapada de un anticuerpo monoclonal 5C1. Opcionalmente, el anticuerpo es un fragmento Fab, o un Fv monocatenario. Opcionalmente, el anticuerpo tiene un isotipo de IgG1 humana. Opcionalmente, el anticuerpo tiene un isotipo del isotipo IgG2 o IgG4 humano.

La invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a H4 (SEQ ID NO: 17) y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90% idéntica a L3 (SEQ ID NO: 31), en donde el anticuerpo se une específicamente a una alfa-sinucleína humana. En algunos anticuerpos al menos una de las posiciones H11, H27, H30, H48, y H73 está ocupada por L, Y, T, I, y K, respectivamente, y al menos una de las posiciones L12 y L14 está ocupada por S. En algunos anticuerpos las posiciones H11, H27, H30, H48, y H73 están ocupadas por L, Y, T, I, y K, respectivamente y las posiciones L12 y L14 están ocupadas por S. En algunos anticuerpos, al menos una de las posiciones H67, H69, H91, y H94 están ocupadas por A, L, F, y S, respectivamente. En algunos anticuerpos las posiciones H67, H69, y H94 están ocupadas por A, L, y S, respectivamente. En algunos anticuerpos, la posición H94 está ocupada por S. En algunos anticuerpos, al menos una de las posiciones L2, L45, L49, y L87 está ocupada por V, K, N, y F, respectivamente. En algunos anticuerpos,

las posiciones L2, L49, y L87 están ocupadas por V, N, y F, respectivamente. Algunos anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 95% idéntica a H4 (SEQ ID NO: 17) y una región variable de cadena ligera madura al menos un 95% idéntica a L3 (SEQ ID NO: 31).

- 5 Algunos anticuerpos comprenden la región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos designada como H4 (SEQ ID NO: 17) y la región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos designada como L3 (SEQ ID NO: 31). Algunos anticuerpos comprenden la región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos designada como H5 (SEQ ID NO: 18) y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos designada como L3 (SEQ ID NO: 31).
- 10 En cualquiera de los anticuerpos anteriores, el anticuerpo puede tener al menos una mutación en la región constante. Opcionalmente, la mutación reduce la fijación o activación del complemento por la región constante. Opcionalmente, el anticuerpo tiene una mutación en una o más de las posiciones 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 y 331 según la numeración de la EU. Opcionalmente, el anticuerpo tiene alanina en las posiciones 318, 320 y 3
- 15 En cualquiera de los anticuerpos anteriores, la región variable de cadena pesada madura se puede unir a una región constante de cadena pesada y la región constante de cadena ligera madura se puede unir a una región constante de cadena ligera.
- En cualquiera de los anticuerpos anteriores, la región constante de cadena pesada puede ser una forma mutante de la región constante humana natural que tiene una unión reducida a un receptor Fcγ con respecto a la región constante humana natural.
- 20 En cualquiera de los anticuerpos anteriores, la región constante de cadena pesada puede ser del isotipo IgG1 humano. En algunos anticuerpos el alotipo es G1m3. En algunos anticuerpos, el alotipo es G1m1.
- 25 La descripción proporciona también un método para humanizar un anticuerpo, que comprende determinar las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo 5C1 de ratón, sintetizando un ácido nucleico que codifica una cadena pesada humanizada que comprende las CDRs de la cadena pesada del anticuerpo de ratón y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera humanizada que comprende las CDRs de la cadena ligera del anticuerpo de ratón, expresando los ácidos nucleicos en una célula huésped para producir un anticuerpo humanizado.
- 30 La descripción proporciona también un método para producir una forma humanizada, quimérica o chapada del anticuerpo 5C1, que comprende cultivar las células transformadas con ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, de modo que la célula secrete el anticuerpo; y purificar el anticuerpo a partir del medio de cultivo celular.
- 35 La descripción proporciona también un método para producir una línea celular que produce una forma humanizada, quimérica o chapada del anticuerpo 5C1, que comprende introducir un vector que codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo y un marcador seleccionable en las células; propagar las células en condiciones para seleccionar las células que tengan un mayor número de copias del vector; aislar las células individuales a partir de las células seleccionadas; y bancar las células clonadas a partir de una célula individual seleccionada en función del rendimiento del anticuerpo. Alguno de dichos métodos comprende además propagar las células bajo condiciones selectivas y detectar las líneas celulares que se expresan de forma natural y secretan al menos 100 mg/L/106 células/24 horas.
- 40 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se definió anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- La invención proporciona además un anticuerpo como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento o la realización de la profilaxis de una enfermedad del cuerpo de Lewy.
- 45 La descripción proporciona además un método para reducir la formación de cuerpos de Lewy en un paciente que tiene o está en riesgo de contraer una enfermedad de cuerpos de Lewy, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.
- 50 La descripción proporciona además un método para tratar un paciente que tiene o está en riesgo de contraer una enfermedad de cuerpos de Lewy, que comprende administrar al paciente un régimen efectivo de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. En algunos métodos, la enfermedad es la enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la enfermedad es un trastorno del comportamiento del sueño REM (RBD). En algunos métodos, la enfermedad es la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) o atrofia de sistemas múltiples (MSA). En algunos métodos, se inhibe la disminución de la función cognitiva en el paciente. En algunos métodos, se reducen los agregados de alfa-sinucleína neuríticos y/o axonales. En algunos métodos, se reduce la distrofia neurítica en el paciente. En algunos métodos, se conserva la densidad sináptica y/o dendrítica. En algunos métodos, el método conserva la
- 55 sinaptofisina y/o MAP2 en el paciente.

La descripción proporciona además un método para inhibir la agregación de sinucleína o reducir los cuerpos de Lewy o agregados de sinucleína en un paciente que tiene o está en riesgo de contraer una enfermedad de cuerpos de Lewy, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo como se definió mediante uno cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. En alguno de dichos 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 en el 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.

La descripción proporciona además un método para detectar los cuerpos de Lewy en un paciente que tiene o está en riesgo de contraer una enfermedad de cuerpos de Lewy, que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente, en donde el anticuerpo se une a los cuerpos de Lewy; y detectar los cuerpos unidos en el paciente. Opcionalmente, el anticuerpo está marcado.

La invención proporciona además un ácido nucleico aislado, que codifica las cadenas pesadas y/o ligeras de un anticuerpo como se describió anteriormente. La descripción proporciona además un vector o vectores, y células huésped adecuadas para codificar uno cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de la región variable madura de cadena pesada 5C1 de ratón. Las regiones CDR según la definición de Kabat están subrayadas y en negrita.

La Figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos de la región variable madura de cadena ligera 5C1 de ratón. Las regiones CDR según la definición de Kabat están subrayadas y en negrita.

La Figura 3 muestra los resultados de la inmunoterapia pasiva con 5C1 en el rendimiento de la memoria en la parte de la sonda del ensayo de laberinto de agua de Morris.

La Figura 4 muestra los resultados de la inmunoterapia pasiva con 5C1 en la velocidad y los errores en el ensayo de haz redondo.

La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo ELISA que prueba la afinidad de diferentes anticuerpos 5C1 humanizados.

La Figura 6 muestra los resultados de un experimento de mutagénesis de barrido de alanina utilizado para determinar el epítipo de la α -sinucleína unida por el anticuerpo 9E4. La parte superior de la figura muestra las transferencias de Western de la α -sinucleína de longitud completa (tipo nativo o mutaciones puntuales individuales de los residuos 118-126, como se indica) teñidas con el anticuerpo 9E4 (panel izquierdo) o el anticuerpo de control 1H7 (panel derecho). La parte inferior de la figura muestra el epítipo de la α -sinucleína unida por el anticuerpo 9E4.

La Figura 7 muestra los resultados de un experimento de mutagénesis de barrido de alanina utilizado para determinar el epítipo de la α -sinucleína unida por el anticuerpo 5C1. La parte superior de la figura muestra las transferencias de Western de la α -sinucleína de longitud completa (tipo nativo o mutaciones puntuales individuales de los residuos 118-126, como se indica) teñidas con el anticuerpo 5C1 (panel izquierdo) o el anticuerpo de control 1H7 (panel derecho). La parte inferior de la figura muestra el epítipo de la α -sinucleína unida por el anticuerpo 5C1.

La Figura 8 muestra los resultados de un experimento de mutagénesis de barrido de alanina utilizado para determinar el epítipo de la α -sinucleína unida por el anticuerpo 5D12. La parte superior de la figura muestra las transferencias de Western de la α -sinucleína de longitud completa (tipo nativo o mutaciones puntuales individuales de los residuos 118-126, como se indica) teñidas con el anticuerpo 5D12 (panel izquierdo) o el anticuerpo de control 1H7 (panel derecho). La parte inferior de la figura muestra el epítipo de la α -sinucleína unida por el anticuerpo 5D12.

La Figura 9 representa un modelo de bola y palos de los aminoácidos de la α -sinucleína próximos a los sitios de unión de los anticuerpos 9E4, 5C1 y 5D12.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es una α -sinucleína humana de tipo nativo.

SEQ ID NO: 2 es el dominio del componente no-amiloide (NAC) de la α -sinucleína, como describen Jensen et al. (1995).

SEQ ID NO: 3 es el dominio del componente no-amiloide (NAC) de la α -sinucleína, como describen Ueda et al. (1993).

SEQ ID NO: 4 son los residuos 118-129 del aminoácido del inmunógeno peptídico 5C1 de la α -sinucleína humana. VDPDNEAYEGGC

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de 5C1 murino con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGGAAGGCACTGGATCTTTCTCTTCTGTTATCAGTAACTGGAGGTGTCCACTCCCAGGTCC
AGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAAACCTGGGACCTCAGTGCAGATGTCTCTGCAAGGC
TTCTGGCTACACCTTTACTAATTACTGGATGAACTGGATAAAAGCGAGGCCTGGACAGGGTCTG
GAATGGATTGGGGCTACTAATCCTAACAATGGTTATACTGACTACAATCAGAGGTTCAAGGACA
AGGCCATATTAAGTGCAGACAAATCCTCCAATACAGCCTACATGCACCTGAGCAGCCTGACATC
TGAAGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGTGGGGGGCACTTGGCTTACTGGGGCCAGGGGACT
GTGGTCACTGTCTCTGCA

SEQ ID NO: 6 es la región variable de cadena pesada de 5C1 murino con el péptido señal (subrayado).

MERHWIFLFLLSVTGGVHSQVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFTNYWMNWIKARPGQGL
EWIGATNPNNGYTDYNQRFKDKAILTADKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCASGGHLAYWGQGT
VTVSA

5

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de cadena ligera de 5C1 murino con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGATGTTG
TGATGACCCAAATTCCACTCTACCTGTCTGTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAG
ATCTAGTCAGAGCCTTTTCCATAGTAAAGGAAACACCTATTTACATTGGTATCTGCAGAAGCCA
GGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCAACAGGGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGT
TCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCGGAGTGGAGGCTGAAGATCT
GGGAGTTTATTTCTGTTCTCAAAGTGCACATGTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTG
GAAATCAGA

10 SEQ ID NO: 8 es la secuencia de la región variable de cadena ligera de 5C1 murino con el péptido señal (subrayado).

MKLPRLLVLMFWIPASSSDVMTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKP
GQSPKLLINRVSNRFSGVPRDFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGVPFCSQSAHVPWTFGGGTLK
EIR

SEQ ID NO: 9 es la región variable de cadena pesada madura de 5C1 murino con las CDRs subrayadas. Las CDRs subrayadas son las definidas por Kabat, excepto la CDRH1 subrayada que es una composición de las definiciones de Kabat y Chothia.

QVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFTNYWMNWIKARPGQGLEWIGATNPNNGYTDYNQRF
KDKAILTADKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCASGGHLAYWGQGTVTVSA

15

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de cadena pesada de 5C1 CDR1. NYWMN

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de cadena pesada de 5C1 CDR2. ATNPNNGYTDYNQRFKD

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de cadena pesada de 5C1 CDR3. GGHLAY

SEQ ID NO: 13 es el FR aceptor de VH humano (Acc#AAY42876.1).

ES 2 701 406 T3

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNYYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTTTYAQKF
QGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGNLNWLDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 14 es la secuencia del 5C1H1 humanizado.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWIGATNPNNGYTDYNQRF
KDRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGHLAYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 15 es la secuencia del 5C1H2 humanizado.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWIGATNPNNGYTDYNQRF
KDRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGHLAYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 16 es la secuencia del 5C1H3 humanizado.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWIGATNPNNGYTDYNQRF
KDRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDVAVYFCASGGHLAYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 17 es la secuencia del 5C1H4 humanizado.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWIGATNPNNGYTDYNQRF
KDRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCASGGHLAYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 18 es la secuencia del 5C1H5 humanizado.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWIGATNPNNGYTDYNQRF
KDRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCASGGHLAYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifican el 5C1H1 humanizado con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCTGCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCCAGGTGC
AGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGC
CTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTG
GAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGACTACAACCAGCGCTTCAAGGACC
GCGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGCTC
CGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGCCAGGGCACC
CTGGTGACCGTGTCTCTCC

SEQ ID NO: 20 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el 5C1H2 humanizado con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCCCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCCAGGTGC
 AGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGC
 CTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTG
 GAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGACTACAACCAGCGCTTCAAGGACC
 GCGTGACCATCACCGCCGACAAGTCCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGCTC
 CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGCCAGGGCACC
 CTGGTGACCGTGTCTCTCC

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el 5C1H3 humanizado con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCCCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCCAGGTGC
 AGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGC
 CTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTG
 GAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGACTACAACCAGCGCTTCAAGGACC
 GCGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGCTC
 CGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGCCTCCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGCCAGGGCACC
 CTGGTGACCGTGTCTCTCC

- 5 SEQ ID NO: 22 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el 5C1H4 humanizado con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCCCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCCAGGTGC
 AGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGC
 CTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTG
 GAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGACTACAACCAGCGCTTCAAGGACC
 GCGCCACCCTGACCGCCGACAAGTCCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGCTC
 CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCTCCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGCCAGGGCACC
 CTGGTGACCGTGTCTCTCC

SEQ ID NO: 23 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el 5C1H5 humanizado con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCCCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCCAGGTGC
 AGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGC
 CTCCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTG
 GAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGACTACAACCAGCGCTTCAAGGACC
 GCGTGACCATCACCGCCGACAAGTCCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGCTC
 CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGCCAGGGCACC
 CTGGTGACCGTGTCTCTCC

SEQ ID NO: 24 es la secuencia de la región variable de cadena ligera madura de 5C1 murino con las CDRs subrayadas. Las CDRs subrayadas son como las definidas por Kabat.

DVVMQTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPKLLINRVSNRFSGV
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKLEIR

SEQ ID NO: 25 es la secuencia de cadena ligera de 5C1 CDR1. RSSQSLFHSKGNTYLH

5 SEQ ID NO: 26 es la secuencia de cadena ligera de 5C1 CDR2. RVSNRFS

SEQ ID NO: 27 es la secuencia de cadena ligera de 5C1 CDR3. SQSAHVPWT

SEQ ID NO: 28 es el FH Aceptor de VL humano (Acc#CAB51293.1).

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGV
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 29 es la secuencia del 5C1L1 humanizado.

10 DVVMQTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPKLLINRVSNRFSGV
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 30 es la secuencia del 5C1L2 humanizado.

DIVMTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFSGV
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 31 es la secuencia del 5C1L3 humanizado.

DVVMQTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGV
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

15 SEQ ID NO: 32 es la secuencia del 5C1L4 humanizado.

DIVMTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGV
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 33 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifican el 5C1L1 humanizado con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCTCCTCCG
GCGACGTGGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGAGCCCGCCTCCAT
CTCCTGCCGCTCCTCCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTACCTG
CAGAAGCCCGGCCAGTCCCCAAGCTGCTGATCAACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGGCGTGC
CCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGC
CGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGCTCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGGCGGGCGGC
ACCAAGGTGGAGATCAAG

20 SEQ ID NO: 34 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el 5C1L2 humanizado con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCTCCTCCG
GCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGTCCGTGTCCCCGGCGAGCCCGCCTCCAT
 CTCCTGCCGCTCCTCCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTACCTG
 CAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGCTGCTGATCTACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGGCGTGC
 CCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCAGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGC
 CGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCTCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGGCGGCGGC
 ACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 35 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el 5C1L3 humanizado con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCTCCTCCG
GCGACGTGGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGTCCGTGTCCCCGGCGAGCCCGCCTCCAT
 CTCCTGCCGCTCCTCCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTACCTG
 CAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAGCTGCTGATCAACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGGCGTGC
 CCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCAGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGC
 CGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGCTCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGGCGGCGGC
 ACCAAGGTGGAGATCAAG

- 5 SEQ ID NO: 36 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el 5C1L4 con la secuencia que codifica el péptido señal (subrayado).

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCTCCTCCG
GCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGTCCGTGTCCCCGGCGAGCCCGCCTCCAT
 CTCCTGCCGCTCCTCCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTACCTG
 CAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAGCTGCTGATCTACCGCGTGTCCAACCGCTTCTCCGGCGTGC
 CCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCAGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGC
 CGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCTCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGGCGGCGGC
 ACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 37 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región constante de IgG1 humano ejemplar.

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA
 CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTC
 AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC

CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCACATCTGCAACGTGAA
 TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC
 ACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA
 AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
 CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGTCAAG
 ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCCTCCTGC
 ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
 CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACGCTGCCC
 CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC
 CCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGT
 GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 38 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 humano ejemplar.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNVKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

5 SEQ ID NO: 39 es la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región constante de cadena ligera kappa humana ejemplar.

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT
 CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA
 TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
 TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT
 GCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTA
 G

SEQ ID NO: 40 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa humana ejemplar.

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Definiciones

- 10 La unidad estructural del anticuerpo básico es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada pareja una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. Cuando se expresa inicialmente, esta región variable se une típicamente a un péptido señal escindible.
- 15 La región variable sin el péptido señal se denomina a veces como región variable madura. Así, por ejemplo, una región variable madura de cadena ligera significa una región variable de cadena ligera sin el péptido señal de cadena ligera. La parte carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de

la función efectora. Una región constante puede incluir una cualquiera o la totalidad de una región CH1, región bisagra, región CH2 y región CH3.

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 y IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada incluyendo también una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos (véase en general, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7) (incorporado por referencia en su totalidad para todos los fines).

Las regiones variables maduras de cada par de cadenas ligeras/pesadas forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. A excepción de los anticuerpos bifuncionales o bisespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Todas las cadenas muestran la misma estructura general de las regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas mediante tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDRs de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, permitiendo la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada región está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), o Chothia & 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 por numeración de Kabat en la región variable de cadena pesada madura; asimismo, la posición L36 significa la posición 36 por la numeración de Kabat en la región variable de cadena ligera madura). La numeración de Kabat se utiliza en todo momento para referirse a 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. Normalmente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que se derivaron para la unión específica a la diana. Los fragmentos incluyen cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras separadas, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab')₂c, Fv, anticuerpos monocatenarios, y anticuerpos de dominio único. Los anticuerpos de dominio (variable) único incluyen regiones VH separadas de sus parejas VL (o viceversa) en anticuerpos convencionales (Ward et al., 1989, *Nature* 341: 544-546), así como regiones VH (algunas veces conocidas como VHH) de especies como *Camelidae* o cartilaginoso fish (por ejemplo, un tiburón nodriza) en el que las regiones VH no están asociadas con las regiones VL (véase, por ejemplo el documento de Patente WO 9404678). Los anticuerpos de dominio único en los que una cadena está separada de su pareja natural se conocen a veces como Dabs y los anticuerpos de dominio único de *Caemelidae* o cartilaginoso fish se conocen a veces como nanocuerpos. Las regiones constantes o partes de las regiones constantes pueden o no estar presentes en anticuerpos de dominio único. Por ejemplo, la región variable única natural de *Camelidae* incluye una región variable VHH, y las regiones constantes CH2 y CH3. Los anticuerpos de dominio único, tales como nanocuerpos, se pueden someter a humanización mediante enfoques análogos a los anticuerpos convencionales. Los anticuerpos Dabs se obtienen normalmente de anticuerpos de origen humano. Los fragmentos se pueden producir mediante técnicas de DNA recombinante, o mediante separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

El término "anticuerpo" incluye también un anticuerpo bisespecífico y/o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo bisespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos diferentes pares de cadenas pesadas/ligeras y dos diferentes sitios de unión (véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-53 (1992)). En algunos anticuerpos bisespecíficos, los dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes incluyen un par de cadena pesada/cadena ligera de 5C1 humanizado y un par de cadena pesada/cadena ligera específico para un epítipo diferente en una alfa-sinucleína que el unido por 5C1.

En algunos anticuerpos bisespecíficos, una pareja de cadena pesada/cadena ligera es un anticuerpo 5C1 humanizado como se describe más adelante y el par de cadenas ligeras pesadas proviene de un anticuerpo que se une a un receptor expresado en la barrera hematoencefálica, tal como un receptor de insulina, un receptor del 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 bisespecífico se puede transferir a través de la barrera hematoencefálica por medio de la transcitosis mediada por receptores. La captación cerebral del anticuerpo bisespecífico puede mejorarse aún más mediante la transformación genética del anticuerpo bisespecífico para reducir su afinidad al receptor de la barrera hematoencefálica. La afinidad reducida por el receptor dio como resultado 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).

Ejemplos de anticuerpos bisespecíficos pueden ser también (1) un anticuerpo de dominio variable dual (DVD-Ig), donde cada cadena ligera y cadena 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*, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) un Tandab, que es una unión de dos

diacuerpos monocatenarios que dan como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (3) un flexocuerpo, que es una combinación de scFvs con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (4) la llamada molécula de “acoplamiento y bloqueo”, basada en el “dominio de dimerización y acoplamiento” en la proteína quinasa A, que, cuando se aplica a los Fabs, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (5) la llamada molécula Escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFvs unidos a ambos extremos de una región Fc humana. Los ejemplos de plataformas útiles para preparar anticuerpos biespecíficos incluyen BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab y Mab2 (F-star), IgG1 diseñado por Fc (Xencor) o DuoBody (basado en el intercambio del brazo de Fab, Genmab).

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

El término “epítipo” se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Para los antígenos proteicos, se puede formar un epítipo a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por el plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 2, 3, y más generalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos 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). Un epítipo puede incluir un residuo C-terminal o un residuo N-terminal. Un epítipo puede incluir también, pero no necesariamente, el grupo amino libre de un polipéptido o el grupo carboxilo libre de un polipéptido. Por lo tanto, un epítipo puede incluir un residuo C-terminal o un residuo N-terminal, pero no incluir necesariamente el grupo carboxilo libre o el grupo amino libre, respectivamente. La especificidad de unión a anticuerpos se define a veces por un rango de aminoácidos. Si se dice que un anticuerpo se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 118-126 de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, lo que se quiere decir es que el epítipo está dentro del rango de aminoácidos enumerados incluyendo aquellos que definen los límites externos del rango. No significa necesariamente que cada aminoácido dentro del rango constituya parte del epítipo. Así, por ejemplo, un epítipo dentro de los aminoácidos 118-126, de la SEQ ID NO: 1 puede consistir en los aminoácidos 118-124, 119-125, 120-126, 120-124 o 120-122, entre otros segmentos de SEQ ID NO: 1.

Los anticuerpos que reconocen los mismos epítipos o epítipos superpuestos se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para competir con la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. El epítipo de un anticuerpo puede también definirse por cristalografía de rayos X del anticuerpo unido a su antígeno para identificar los residuos de contacto (el epítipo se define por los residuos que producen el contacto). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión al otro. Dos anticuerpos tienen epítipos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

La competencia entre los anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que un anticuerpo sometido al ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Véase, por ejemplo, Junghans et al., (1990), Cancer Res. 50: 1495. Un anticuerpo de prueba compite con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo de prueba (por ejemplo, al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe la unión del anticuerpo de referencia en al menos 50%, 75%, 90%, 95%, 98%, o 99% según lo medido en un ensayo de unión competitiva. Los anticuerpos identificados por ensayos de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que ocurra un impedimento estérico.

Los anticuerpos de la invención se unen típicamente a sus dianas designadas con una constante de afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M⁻¹. Dicha unión es una unión específica en el sentido de que es detectablemente mayor en magnitud y es distinguible de la unión no específica que se produce al menos a una diana no relacionada. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o un ajuste espacial particular (por ejemplo, tipo de cerradura y llave), mientras que la unión no específica suele ser normalmente el resultado de las fuerzas de Van der Waals. Sin embargo, la unión específica no implica necesariamente que un anticuerpo monoclonal se una a una y solo una diana.

Cuando se comparan secuencias de anticuerpos, 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 de anticuerpo sujeto (por ejemplo, la región variable madura entera de una cadena pesada o ligera) se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones del anticuerpo sujeto y las regiones del anticuerpo de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región de anticuerpo sujeto como en la región de anticuerpo de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contar las brechas, multiplicado por 100 para convertirlo a porcentaje.

Para los fines de clasificación de las sustituciones de aminoácidos como conservativas y no conservativas, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas 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 cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

Los anticuerpos monoclonales se proporcionan típicamente en forma aislada. Esto significa que el anticuerpo es típicamente al menos el 50% peso/peso puro de proteínas interferentes y otros contaminantes que surgen a partir de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el agente se combine con un exceso de un vehículo(s) farmacéuticamente aceptable u otro vehículo destinado a facilitar su uso. Algunas veces, los anticuerpos monoclonales son al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% peso/peso puro de agregados o fragmentos de dichos anticuerpos monoclonales o de otras proteínas y contaminantes. Alguno de dichos anticuerpos monoclonales puede incluir agregados o fragmentos pero son al menos 99% peso/peso puros de otras proteínas y contaminantes.

Las composiciones o métodos “que comprenden” uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos no enumerados específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende el 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.

A menos que se indique lo contrario en el contexto, el término “aproximadamente” abarca los valores dentro del margen de error de la medición (SEM) de un valor establecido.

Significación estadística significa $P \leq 0,05$.

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

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

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

“Función cognitiva” se refiere a procesos mentales tales como uno cualquiera o todos de atención, memoria, producción y comprensión del lenguaje, resolución de problemas y el interés por el entorno y el cuidado de sí mismo.

“Función cognitiva mejorada” o “función cognitiva mejorada” se refiere a la mejora en relación con la línea base, por ejemplo, el diagnóstico o iniciación del tratamiento. “Disminución de la función cognitiva” se refiere a una disminución de la función en relación con dicha línea base.

En sistemas de modelos animales tales como rata o ratón, la función cognitiva puede ser medida por métodos que incluyen utilizar un laberinto en el que los sujetos utilizan la información espacial (por ejemplo, el laberinto de agua de Morris, el laberinto circular de Barnes, el laberinto de brazos radiales elevados, el laberinto en T y otros), el acondicionamiento del miedo, evitación activa, campo abierto iluminado, medidor de actividad oscura, laberinto en cruz elevado, ensayo exploratorio de dos compartimentos o ensayo de natación forzado.

En humanos, la función cognitiva se puede medir por uno o más de varios ensayos estandarizados. Se describieron ejemplos de una prueba o ensayo para la función cognitiva (Ruoppila y Suutama, Scand. J. Soc. Med. Suppl. 53, 44-65, 1997) e incluye ensayos psicométricos estandarizados (por ejemplo, escala de memoria de Wechsler, escala de inteligencia para adultos de Wechsler, Matrices progresivas estándar de Raven, ensayo de capacidades mentales para adultos de Schaie-Thurstone), ensayos neuropsicológicos (por ejemplo, Luria-Nebraska), autoevaluaciones metacognitivas (por ejemplo, cuestionario de metamemoria), ensayos de detección visual-espacial (por ejemplo, Figuras de Poppelreuter, reconocimiento del reloj, dibujo y cancelación del nido de abeja), ensayos de detección cognitiva (por ejemplo, ensayo del estado mini mental de Folstein) y ensayos del tiempo de reacción. Otros ensayos estándar para el rendimiento cognitivo incluyen la subescala cognitiva de la escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer (ADAS-cog); la impresión clínica global de la escala de cambio (CIBIC-escala plus); las actividades de estudio cooperativo de la enfermedad de Alzheimer de la escala de la vida diaria (ADCS-ADL); el examen del mini estado mental (MMSE); el inventario Neuropsiquiátrico (NPI); la escala de la Evaluación de la Demencia clínica (CDR); la batería automatizada de ensayos Neuropsicológicos de Cambridge (CANTAB) o la evaluación clínica de Sandoz-Geriatric (SCAG), ensayo de Stroop, fabricación de senderos, Wechsler Digit Span, y el ensayo cognitivo computarizado CogState. Además, la función cognitiva se puede medir utilizando técnicas de imagen tales como la Tomografía de Emisión de Positrón (PET), imagen de resonancia magnética funcional (fMRI), Tomografía

computarizada de emisión de fotón único (SPECT), o cualquier otra técnica de imagen que permita una medida de la función cerebral.

Descripción detallada de la invención

I. General

5 La invención proporciona el anticuerpo monoclonal 5C1 y anticuerpos relacionados, como los anticuerpos que se une al mismo epítipo en la α -sinucleína (es decir, un epítipo 118-126 de la α -sinucleína). Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para tratar trastornos asociados con la acumulación de α -sinucleína, particularmente la acumulación en cuerpos de Lewy. Tales trastornos incluyen enfermedades del cuerpo de Lewy, tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad del cuerpo de Lewy difuso (DLBD), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV), la enfermedad de Parkinson y Alzheimer combinadas, la insuficiencia autonómica pura y la atrofia de sistemas múltiples (MSA). Los anticuerpos también son útiles para el diagnóstico de enfermedades de cuerpos de Lewy.

II. Moléculas objetivo

15 La α -sinucleína de tipo nativo natural es un péptido de 140 aminoácidos que tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVT
NVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMP
SEEGYQDYEP EA (SEQ ID NO:1)

(Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11282-6, 1993; número de acceso al banco de genes: P37840). La proteína tiene tres dominios reconocidos, un dominio de repetición KTKE que cubre los aminoácidos 1-61, un dominio NAC (componente no amiloide) que se extiende desde aproximadamente los aminoácidos 60-95, y un dominio C-terminal ácido que se extiende desde aproximadamente el aminoácido 98 hasta el 140. Jensen et al., (1995) reportaron que el NAC tiene la secuencia de aminoácidos:

EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV (SEQ ID NO: 2)

(Jensen et al., Biochem. J. 310.1: 91-94; número de acceso al banco de genes S56746). Sin embargo, Ueda et al., (1993) reportaron que el NAC tiene la secuencia de aminoácidos:

25 KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS (SEQ ID NO: 3)

(Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11282-6)

A menos que se vea lo contrario en el contexto, la referencia a α -sinucleína o sus fragmentos incluye las secuencias de aminoácidos de tipo nativo humanas indicadas anteriormente, y las variantes alélicas humanas de las mismas, particularmente aquellas asociadas con la enfermedad del cuerpo de Lewy (por ejemplo, E46K, A30P y A53T, con la primera letra se indica el aminoácido en SEQ ID NO: 1, el número es la posición de codón en SEQ ID NO: 1, y la segunda letra es el aminoácido en la variante alélica). Dichas variantes pueden opcionalmente presentarse individualmente o en cualquier combinación. Las mutaciones inducidas E83Q, A90V, A76T, que mejoran la agregación de alfa sinucleína, pueden también estar presentes individualmente o en combinación unas con otras y/o con las variantes alélicas humanas E46K, A30P y A53T.

35 III. Enfermedad de los cuerpos de Lewy

Las enfermedades del cuerpo de Lewy (LBD) se caracterizan por la degeneración del sistema dopaminérgico, las alteraciones motoras, el deterioro cognitivo y la formación de cuerpos de Lewy (LBs) (McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24). Los cuerpos de Lewy son depósitos de proteínas esféricas que se encuentran en las células nerviosas. Su presencia en el cerebro altera la función normal del cerebro interrumpiendo la acción de los mensajeros químicos, incluyendo acetilcolina y dopamina. Las enfermedades del cuerpo de Lewy incluyen la enfermedad de Parkinson (incluida la enfermedad de Parkinson idiopática), la enfermedad difusa del cuerpo de Lewy (DLBD), también conocida como la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante del cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV), la enfermedad de Alzheimer y Parkinson combinada y como atrofia del sistema múltiple (MSA; por ejemplo, atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y el síndrome de Shy-Drager). La DLBD comparte los síntomas tanto de la enfermedad de Alzheimer como de Parkinson. La DLBD se diferencia de la enfermedad de Parkinson principalmente en la ubicación de los cuerpos de Lewy. En la 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 del cuerpo de Lewy incluyen la insuficiencia autonómica pura, disfalgia del

cuerpo de Lewy, LBD incidental, y LBD hereditaria (por ejemplo, mutaciones del gen de la α -sinucleína, PARK3 y PARK4).

IV. Anticuerpos

A. Especificidad de unión y propiedades funcionales

- 5 5C1 es un ejemplo de anticuerpo de la invención, cuyas regiones variables maduras de cadena pesada y ligera se designan SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 24, respectivamente. La invención también proporciona anticuerpos que compiten con 5C1 para unirse a α -sinucleína, o que se unen al mismo o se superponen al epítipo como 5C1, y tienen propiedades funcionales similares, tales como la reducción de agregados neuronales de α -sinucleína, mejorando la función cognitiva, y/o preservando la densidad sináptica y/o densidad dentrítica.
- 10 Otros anticuerpos que tienen dicha especificidad de unión pueden producirse inmunizando ratones con α -sinucleína o un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento que incluye los residuos de aminoácidos 118-126, o una parte de la misma), y detectando los anticuerpos resultantes para unirse a la α -sinucleína, opcionalmente en competición con 5C1. Se prefiere el uso de un fragmento para generar un anticuerpo que tenga el mismo epítipo que 5C1. Los anticuerpos también pueden detectarse por su efecto en: (1) modelos de roedores transgénicos de α -sinucleína sometidos a ensayos de comportamiento, como el ensayo del laberinto de agua de Morris (MWM) o el ensayo de haz horizontal, y/o ensayos inmunológicos para la detección de α -sinucleína, agregación de α -sinucleína, sinaptofisina, MAP2 y/o PSD95 en el tejido cerebral; (2) roedores u otros modelos de animales no humanos para una enfermedad caracterizada por la acumulación de α -sinucleína, utilizando ensayos de comportamiento como el ensayo del laberinto de agua de Morris (MWM) o el ensayo de haz horizontal y/o ensayos inmunológicos para la detección de α -sinucleína, agregación de α -sinucleína, sinaptofisina, MAP2, y/o PSD95 en el tejido cerebral; y/o (3) humanos con una afección asociada con la acumulación de α -sinucleína, utilizando los ensayos de comportamiento apropiados. Alternativamente, o además de cualquiera de los enfoques anteriores, los anticuerpos pueden detectarse frente a formas mutagenizadas de α -sinucleína para identificar un anticuerpo que muestre el mismo o similar perfil de unión que 5C1 para una colección de cambios mutacionales. Las mutaciones pueden ser una sustitución sistemática con alanina (o serina si una alanina ya está presente) un residuo a la vez, o intervalos más ampliamente espaciados, a lo largo de la α -sinucleína o a través de una sección de la misma en la que se sabe que reside el epítipo (por ejemplo, residuos 118-126).

Las Figuras 6-8 y el Ejemplo 6 caracterizan el epítipo de 5C1 en comparación con otros dos anticuerpos que se unen dentro de los residuos 118-126, a saber, 9E4 y 5D12. La mutagénesis de alanina prueba el efecto de la mutación de aminoácidos individuales, uno a la vez, en el 118-126 de la alfa-sinucleína. El perfil de los cambios relativos de la afinidad de unión (en otras palabras, contribución a la unión) causados por la mutación de diferentes aminoácidos dentro de los residuos 118-126 caracteriza el epítipo. Para 5C1, la mutagénesis de cualquiera de los residuos 120-122 tiene la mayor reducción de la unión. La mutagénesis del residuo 123 o 124 da como resultado una reducción significativa de la unión, pero no tanto como en una cualquiera de las posiciones 120-122. La mutagénesis del residuo 118, 119, 125 o el residuo 126 da como resultado una pérdida aún menor de la afinidad de unión, esencialmente sin cambios. Para simplificar, los efectos de la mutagénesis pueden subdividirse aproximadamente en tres categorías: reducción esencialmente completa de la unión para los residuos 120-122 (indistinguible del control negativo), esencialmente sin reducción de la unión para los residuos 118, 119, 125 y 126 (indistinguible del control positivo) y reducción intermedia de la afinidad de unión para los residuos 123 y 124. El epítipo de 5C1 se puede caracterizar aproximadamente por tanto como un epítipo lineal que consiste en o consiste esencialmente en los residuos 120-124 de SEQ ID NO: 1, con los residuos 120-122 haciendo la mayor contribución a la unión. Se proporcionan los anticuerpos que tienen el epítipo 5C1 como se caracteriza por una cualquiera de las descripciones en este párrafo. Algunos anticuerpos se caracterizan por un epítipo que consiste esencialmente en los residuos 120-122 y que excluye los residuos 119-120, lo que significa que los residuos 120-122 contribuyen cada vez más a la unión que cualquier otro residuo y los residuos 119 y 120 no hacen una contribución detectable a la unión (por ejemplo, por el método de escaneo de alanina del ejemplo). Los residuos 123 y 124 pueden o no hacer una contribución menor a la unión en dichos anticuerpos.

Para 5D12, el epítipo se caracteriza por la mutagénesis de la alanina de la siguiente manera. La mutagénesis de cualquiera de los residuos 120-122 tiene la mayor reducción de la unión. La mutagénesis del residuo 118, 119, 123 o 124 da como resultado una reducción significativa de la unión, pero no tanto como en cualquiera de las posiciones 120-122. La mutagénesis del residuo 125 o del residuo 126 da como resultado una pérdida aún menor de la afinidad de unión, esencialmente sin cambios. Para simplificar, los efectos de la mutagénesis pueden subdividirse aproximadamente en tres categorías: reducción esencialmente completa de la unión para la mutación de los residuos 120-122 (indistinguible del control negativo), esencialmente sin reducción de la unión de los residuos 125 y 126 (indistinguible del control positivo) y la reducción intermedia de la afinidad de unión para los residuos 118, 119, 123 y 124. El epítipo de 5D12 se puede caracterizar así aproximadamente como un epítipo lineal que consiste en o que consiste esencialmente en los residuos 118-124 de la SEQ ID NO: 1, con los residuos 120-122 haciendo la mayor contribución a la unión. También se proporcionan otros anticuerpos que tienen el epítipo de 5D12 según se caracteriza por cualquiera de las descripciones en este párrafo o en el Ejemplo 6.

Del mismo modo, el epítipo 9E4 se puede caracterizar por una mutación de los residuos 122 y 125 mostrando cada uno una mayor reducción de la unión que cualquiera de los residuos 118-121, 123, 124 o 126. Para simplificar, los efectos de la mutagénesis se pueden dividir aproximadamente en dos categorías: esencialmente reducción completa de la unión para los residuos 122 y 125 y esencialmente ninguna reducción en la unión para los residuos 118-121, 123, 124 y 126. El epítipo 9E4 se puede caracterizar así aproximadamente como un epítipo conformacional en el que los residuos 122 y 125 proporcionan los puntos de contacto (o la mayor contribución a la unión) con 9E4. Se proporcionan otros anticuerpos que tienen el epítipo 9E4 como se caracteriza por cualquiera de las descripciones en este párrafo o en el Ejemplo 6. Opcionalmente, el anticuerpo no es 9E4 u otro anticuerpo que tenga las mismas CDRs que 9E4 ni un anticuerpo que tenga al menos cinco CDRs de Kabat con al menos el 85% de identidad de secuencia con las CDRs correspondientes de 9E4.

Los anticuerpos que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado (por ejemplo, 5C1) también se pueden producir utilizando una variante del método de presentación de fagos. Véase Winter, documento de Patente WO 92/20791. Este método es particularmente adecuado para producir anticuerpos humanos. En este método, la región variable de cadena pesada o de cadena ligera del anticuerpo murino seleccionado se utiliza como material de partida. Si, por ejemplo, se selecciona una región variable de cadena ligera como material de partida, se construye una biblioteca de fagos en la que los miembros muestran la misma región variable de cadena ligera (es decir, el material de partida murino) y una región variable de cadena pesada diferente. Las regiones variables de cadena pesada se pueden obtener, por ejemplo, de una biblioteca de regiones variables de cadena pesada humana reorganizadas. Se selecciona un fago que muestra una fuerte unión específica para la α -sinucleína (por ejemplo, al menos 10^8 M⁻¹, y preferiblemente al menos 10^9 M⁻¹). La región variable de cadena pesada de este fago sirve como material de partida para construir una biblioteca de fagos adicional. En esta biblioteca, cada fago muestra la misma región variable de cadena pesada (es decir, la región identificada a partir de la primera biblioteca de visualización) y una región variable de cadena ligera diferente. Las regiones variables de cadena ligera se pueden obtener, por ejemplo, de una biblioteca de regiones de cadena ligera variable humana reorganizadas. De nuevo, se seleccionan los fagos que muestran una fuerte unión específica para la α -sinucleína. Los anticuerpos resultantes normalmente tienen la misma o similar especificidad de epítipo que el material de partida murino.

Otros anticuerpos se pueden obtener por mutagénesis del cDNA que codifica las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo ejemplar, tal como 5C1. En consecuencia, los anticuerpos monoclonales que son al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticos a 5C1 en la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera maduras y mantiene sus propiedades funcionales, y/o que difieren del anticuerpo respectivo en un pequeño número de sustituciones de aminoácidos funcionalmente inconsecuentes (por ejemplo, sustituciones conservativas), eliminaciones, o inserciones también se incluyen en la invención.

La invención también incluye anticuerpos monoclonales que tienen algunas o todas (por ejemplo, 3, 4, 5, y preferiblemente 6) CDRs en su totalidad o sustancialmente de 5C1. Dichos anticuerpos pueden incluir una región variable de cadena pesada que tiene al menos dos, y generalmente las tres, CDRs en su totalidad o sustancialmente de la región variable de cadena pesada de 5C1 y/o región variable de cadena ligera que tienen al menos dos, y generalmente las tres, CDRs en su totalidad o sustancialmente de la región variable de cadena ligera de 5C1. Anticuerpos preferidos incluyen tanto cadenas pesadas como ligeras. Una CDR es sustancialmente de una CDR de 5C1 correspondiente cuando no contiene más de 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o eliminaciones, excepto que CDRH2 (cuando está definido por Kabat) no puede tener más de 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o eliminaciones. Tales anticuerpos tienen preferiblemente al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con 5C1 en la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera maduras y mantienen sus propiedades funcionales, y/o difieren de 5C1 por un pequeño número de sustituciones de aminoácidos funcionalmente inconsecuentes (por ejemplo, sustituciones conservativas), eliminaciones, o inserciones.

Los anticuerpos preferidos muestran una actividad funcional similar a 5C1, por ejemplo, reduciendo los agregados de α -sinucleína neuríticos y/o axonales, reduciendo la distrofia neurítica, mejorando la función cognitiva, invirtiendo, tratando o inhibiendo el deterioro cognitivo, y/o preservando o aumentando la densidad sináptica y/o densidad dendrítica.

B. Anticuerpos quiméricos y recubiertos

La invención proporciona además formas quiméricas y recubiertas de anticuerpos no humanos, particularmente 5C1.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que las regiones variables maduras de cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo no humano (por ejemplo, un ratón) se combinan con regiones constantes de cadena ligera y pesada humanas. Típicamente, las regiones constantes de cadena ligera y pesada son de origen humano, pero las regiones constantes pueden originarse a partir de diferentes especies no humanas diferentes según sea necesario (por ejemplo, para facilitar el ensayo del anticuerpo no humano en un modelo animal apropiado). Dichos anticuerpos conservan sustancial o totalmente la especificidad de unión del anticuerpo de ratón, y pueden ser aproximadamente dos tercios de la secuencia humana contribuida por las regiones constantes humanas.

Un anticuerpo recubierto es un tipo de anticuerpo humanizado que retiene algunas y generalmente todas las CDRs y algunos de los residuos de marco de la región variable no humana de un anticuerpo no humano, pero reemplaza otros residuos del marco de región variable que pueden contribuir a los epítomos de las células B o T, por ejemplo, residuos expuestos (Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489, 1991) con residuos de las posiciones correspondientes de una secuencia de anticuerpo humano. El resultado es un anticuerpo en el que las CDRs son en su totalidad o sustancialmente de un anticuerpo no humano y los marcos de región variable del anticuerpo no humano se hacen más parecidos a los humanos por las sustituciones.

C. Anticuerpos humanizados

Los anticuerpos humanizados 5C1 se unen específicamente a la α -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 5C1 murino. Algunos anticuerpos humanizados tienen una afinidad que es la misma, dentro del error experimental, que la del 5C1 murino. Algunos anticuerpos humanizados tienen una afinidad mayor que la del 5C1 murino. Los anticuerpos humanizados preferidos se unen al mismo epítipo y/o compiten con el 5C1 murino para unirse a la α -sinucleína humana.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo genéticamente modificado en el que las CDRs de un anticuerpo "donador" no humano (por ejemplo, 5C1 murino) se injerta en secuencias de anticuerpos "aceptores" humanos (véase, por ejemplo, Queen, documentos de Patente US 5,530,101 y 5,585,089; Winter, documento de Patente US 5,225,539, Carter, documento de Patente US 6,407,213, Adair, documentos de Patente US 5,859,205 y 6,881,557, Foote, documento de Patente US 6,881,557). Las secuencias de anticuerpos aceptores pueden ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpo humano maduro, una composición de tales secuencias, una secuencia de consenso de secuencias de anticuerpos humanos, o una secuencia de región de línea germinal. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado 5C1 es un anticuerpo que tiene algunas o todas las CDRs en su totalidad o sustancialmente de 5C1 murino y la secuencia de marco de región variable y regiones constantes, si están presentes, en su totalidad o sustancialmente de secuencias de anticuerpos humanos. Similarmente una cadena pesada humanizada tiene al menos dos y generalmente las tres CDRs en su totalidad o sustancialmente de una cadena pesada de un anticuerpo donador, y una secuencia de marco de región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada, si está presente, sustancialmente de secuencias marco de región variable de cadena pesada y secuencias de región constante. Similarmente una cadena ligera humanizada tiene al menos dos y generalmente las tres CDRs en su totalidad o sustancialmente de una cadena ligera de anticuerpo donador, y una secuencia marco de región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera, si está presente, sustancialmente de secuencias marco de región variable de cadena ligera y secuencias de región constante. Aparte de nanocuerpos y dAbs, un anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. Preferiblemente al menos el 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos correspondientes (según lo define Kabat) son idénticos entre las respectivas CDRs. Las secuencias marco de región variable de una cadena de anticuerpo o la región constante de una cadena de anticuerpo son sustancialmente de una secuencia marco de región variable humana o región constante humana, respectivamente, cuando al menos el 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de los residuos correspondientes definidos por Kabat son idénticos.

Aunque los anticuerpos humanizados incorporan a menudo las seis CDRs (preferiblemente según lo define Kabat) de un anticuerpo de ratón, también se pueden hacer con menos de todas las CDRs (al menos 3, 4 o 5) CDRs de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169: 3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164: 1432-1441, 2000).

En algunos anticuerpos, solo se necesita una parte de las CDRs, concretamente el subconjunto de residuos de CDR necesarios para la unión, denominados residuos determinantes de la especificidad (SDRs) (Kashmiri et al., *Methods* (2005) 36(1): 25-34), necesarios para retener la unión en un anticuerpo humanizado. Los residuos de CDR que no entran en contacto con el antígeno y que no están en los SDR pueden identificarse en base a estudios previos (por ejemplo uno o más o todos los residuos H60-H65 en CDR H2 a veces 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 modelado molecular y/o empíricamente, o como se describe en Gonzales et al., *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. En dichos anticuerpos humanizados, en las posiciones en las que uno o más residuos de CDR donadores están ausentes o en las que se omite una CDR donante, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (mediante la numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor. El número de dichas sustituciones de aceptores para aminoácidos donadores en las CDRs para incluir refleja un equilibrio de consideraciones competitivas. 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 para sustituir también se pueden seleccionar empíricamente.

Las secuencias de anticuerpos aceptores humanos se pueden seleccionar opcionalmente de entre las muchas secuencias de anticuerpos humanos conocidas para proporcionar un alto grado de identidad de secuencia (por

ejemplo, 65%-85% de identidad) entre los marcos de región variable de la secuencia aceptora humana y los correspondientes marcos de región variable de una cadena de anticuerpo donador.

Ciertos aminoácidos de los residuos del marco de región variable humana pueden seleccionarse para la sustitución en base a su posible influencia en la conformación de CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de dichas posibles influencias se realiza mediante modelado, examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo de marco de región variable murina y un residuo de marco de región variable humano seleccionado, el aminoácido de marco humano se puede sustituir por el aminoácido de marco equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una de forma no covalente al antígeno directamente,
- (2) es adyacente a una región CDR,
- (3) de lo contrario, interactúa con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 6 Å de una región CDR), (por ejemplo, se identifica modelando la cadena ligera o pesada en la estructura resuelta de una cadena de inmunoglobulina conocida homóloga); y
- (4) un residuo que participa en la interfaz VL-VH.

Los residuos del marco de las clases (1) – (3) como se define en Queen, documento de Patente US 5,530,101 se refieren a veces alternativamente como residuos canónicos y vernier. Los residuos del marco que ayudan a definir la conformación de un bucle de CDR se denominan algunas veces como residuos canónicos (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987), Thornton & Martin J. Mol. Biol., 263, 800-815, 1996). Los residuos del marco que soportan las conformaciones del bucle de unión al antígeno y desempeñan un papel en el ajuste fino del ajuste de un anticuerpo al antígeno se denominan a veces residuos de vernier (Foote & Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224, 487-499).

Otros residuos del marco que son candidatos para la sustitución son los residuos que crean un sitio de glicosilación potencial. Aún otros candidatos para la sustitución son aminoácidos del marco humano aceptor que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donador del ratón o de las posiciones equivalentes de las inmunoglobulinas humanas más típicas.

La invención proporciona formas humanizadas del anticuerpo 5C1 de ratón. El anticuerpo de ratón comprende regiones variables de cadena pesada y ligera maduras que tienen secuencias de aminoácidos que comprenden SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 24, respectivamente. La invención proporciona cinco ejemplos de regiones variables de cadena pesada humana: H1, SEQ ID NO: 14; H2, SEQ ID NO: 15; H3, SEQ ID NO: 16; H4, SEQ ID NO: 17; y H5, SEQ ID NO: 18. La invención proporciona además cuatro ejemplos de regiones variables de cadena ligera humana: L1, SEQ ID NO: 29; L2, SEQ ID NO: 30; L3, SEQ ID NO: 31; y L4, SEQ ID NO: 32. Los anticuerpos incluyen cualquier permutación de estas regiones variables de cadena pesada y ligera madura que se proporcionen, es decir, H1L2, H1L3, H1L4, H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L1, H3L2, H3L3, H3L4, H4L1, H4L2, H4L3, H4L4, H5L1, H5L2, H5L3, o H5L4. La variante H4L3, que incluye ocho retromutaciones de cadena pesada y cinco retromutaciones de cadena ligera, tiene una afinidad a la α -sinucleína (medida en un instrumento Biacore) que está dentro de un factor de dos de las afinidades de los anticuerpos 5C1 murinos y quiméricos. Véase la Tabla 3, a continuación. Según lo medido por ELISA, la variante H4L3 tiene una afinidad por la α -sinucleína que es sustancialmente la misma que la de un anticuerpo quimérico 5C1 (dentro del error experimental) y superior al del anticuerpo 5C1 murino. Véase la Figura 5. Además, la variante H5L3, que incluye seis retromutaciones de cadena pesada y cinco retromutaciones de cadena ligera, proporciona una afinidad a la α -sinucleína humana (medida en un instrumento Biacore) que está dentro de un factor de cuatro las afinidades de los anticuerpos 5C1 murinos y quiméricos. Véase Tabla 3, a continuación. La variante H3L4, que incluye nueve retromutaciones de cadena pesada y dos retromutaciones de cadena ligera, también proporciona una afinidad a la α -sinucleína humana (medida por ELISA) que es sustancialmente la misma del anticuerpo 5C1 quimérico, dentro del error experimental, y las variantes H3L3 y H3L1, que incluye cada una nueve retromutaciones de cadena pesada y cinco y seis retromutaciones de cadena ligera, respectivamente, proporcionan afinidades a la α -sinucleína que son superiores al anticuerpo 5C1 murino (medido por ELISA).

La invención proporciona variantes del anticuerpo 5C1 humanizado H4L3 en las que la región variable de cadena pesada madura humanizada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con H4 (SEQ ID NO: 17) y la región variable de cadena ligera madura humanizada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con L3 (SEQ ID NO: 31). En alguno de dichos anticuerpos, se retiene al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, o las trece de las retromutaciones en H4L3. La invención también proporciona variantes del anticuerpo 5C1 humanizado H5L3 en las que la región variable de cadena pesada madura humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con H5 (SEQ ID NO: 18) y la región variable de cadena ligera madura humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con L3 (SEQ ID NO: 31). En alguno de dichos anticuerpos, se retiene al

menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o la once de las retromutaciones en H5L3. La invención también proporciona variantes del anticuerpo 5C1 humanizado H3L4 en las que la región variable de cadena pesada madura humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con H3 (SEQ ID NO: 16) y la región variable de cadena ligera madura humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con L4 (SEQ ID NO: 32). En alguno de dichos anticuerpos, se retienen al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o la once retromutaciones en H3L4. En algunos anticuerpos, al menos una de las posiciones H11, H27, H30, H48, y H73 en la región Vh está ocupada por L, Y, T, I, y K, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones H11, H27, H30, H48, y H73 en la región Vh están ocupadas por L, Y, T, I, y K, respectivamente. En algunos anticuerpos, al menos una de las posiciones H67, H69, H91, y H94 en la región Vh está ocupada por A, L, F, y S, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones H67, H69, y H94 en la región Vh está ocupada por A, L, y S, respectivamente, como en la versión H4. En algunos anticuerpos, la posición H94 está ocupada por S, como en la versión H5. En algunos anticuerpos, las posiciones H67, H69, H91 y H94 en la región Vh están ocupadas por A, L, F, y S, respectivamente, como en la versión H3. En algunos anticuerpos, al menos una de las posiciones L12 y L14 en la región Vk está ocupada por S. En algunos anticuerpos, las posiciones L12 y L14 en la región Vk están ambas ocupadas por S, como en las versiones L3 y L4. En algunos anticuerpos, al menos una de las posiciones L2, L45, L49, y L87 en la región Vk está ocupada por V, K, N, y F, respectivamente. En algunos anticuerpos, al menos una de las posiciones L2, L45, L49, y L87 en la región Vk está ocupada por V, K, N, y F, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L2, L49, y L87 en la región Vk están ocupadas por V, N, y F, respectivamente, como en la versión L3. En algunos anticuerpos, las posiciones L2, L45, L49, y L87 en la región Vk están ocupadas por V, K, N, y F, respectivamente, como en la versión L1. Las regiones CDR de dichos anticuerpos humanizados pueden ser idénticas o sustancialmente idénticas a las regiones CDR de H4L3 o H5L3, que son las mismas que las del anticuerpo donador de ratón. Las regiones CDR pueden definirse mediante cualquier definición convencional (por ejemplo, Chothia) pero son preferiblemente como las define Kabat. Una posibilidad de variación adicional en variantes de 5C1 humanizado son las retromutaciones adicionales en los marcos de región variable. Muchos de los residuos de los marcos que no están en contacto con las CDR en el mAb humanizado pueden acomodar sustituciones de aminoácidos de las posiciones correspondientes del mAb de ratón donador u otros anticuerpos de ratón o humanos, e incluso muchos residuos potenciales de contacto con CDR son también susceptibles de sustitución o incluso los aminoácidos dentro de las CDRs se pueden alterar, por ejemplo, con los residuos encontrados en la posición correspondiente de la secuencia aceptora humana utilizada para suministrar los marcos de región variable. Además, se puede utilizar secuencias aceptoras humanas alternativas, por ejemplo, para la cadena pesada y/o ligera. Si se utilizan diferentes secuencias aceptoras, es posible que una o más de las retromutaciones recomendadas anteriormente no puedan realizarse debido a que los residuos del donador y aceptor correspondientes ya no son los mismos sin la retromutación. Por ejemplo, cuando se utiliza una secuencia aceptora de cadena pesada en la que la posición H11 ya está ocupada por L, H48 ya está ocupada por I y/o H73 ya está ocupada por K, no es necesaria la retromutación correspondiente. De manera similar, cuando se utiliza una secuencia aceptora de cadena ligera en la que la posición L12 y/o L14 está ocupada por S, no es necesaria la correspondiente retromutación.

La invención también incluye anticuerpos humanizados en los que las regiones variables de cadena ligera y pesada maduras muestran al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con las regiones variables de cadena ligera y pesada maduras de los H1L1, H1L2, H1L3, H1L4, H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H3L1, H3L2, H3L3, H4L1, H4L2, H4L4, H5L1, H5L2, o H5L4 de 5C1 humanizados. Las regiones CDR de dichos anticuerpos humanizados pueden ser idénticas o sustancialmente idénticas a aquellas del anticuerpo donador de ratón. Las regiones CDR se pueden definir mediante cualquier definición convencional (por ejemplo, Chothia) pero son preferiblemente como las define Kabat.

D. Selección de la región constante

Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, humanizados (incluyendo recubiertos), o humanos se pueden unir a al menos una parte de una región constante suficiente para interactuar con el receptor Fc. La región constante es típicamente humana, pero se puede seleccionar una región constante no humana si es necesario.

La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea el complemento dependiente del anticuerpo y/o la toxicidad mediada por células. Por ejemplo, los isotipos humanos IgG1 e IgG3 tienen citotoxicidad mediada por el complemento mientras que los isotipos IgG2 e IgG4 tienen una citotoxicidad pobre o nula mediada por el complemento. Una región constante IgG1 humana adecuada para la inclusión en los anticuerpos de la invención puede tener la secuencia de SEQ ID NO: 38. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Una región constante de cadena ligera kappa humana adecuada para la inclusión en los anticuerpos de la invención puede tener la secuencia SEQ ID NO: 40. Los anticuerpos se pueden expresar como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, como cadenas pesadas separadas, como cadenas ligeras separadas, como Fab, Fab', F(ab')₂, o fragmentos Fv, o como anticuerpos monocatenarios en los que las regiones variables de cadena pesada y ligera se unen a través de un espaciador.

Las regiones constantes humanas muestran una variación alotípica y una variación isoalotípica entre individuos diferentes. 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. La referencia a una región constante humana incluye una región constante con cualquier alotipo natural o cualquier permutación de los residuos que ocupan las posiciones polimórficas en los alotipos naturales o hasta 3, 5 o 10 sustituciones para reducir o aumentar la función efectora como se describe a continuación.

- 5 Uno o varios aminoácidos en el extremo amino o carboxi de cadena ligera y/o pesada, tal como la lisina C-terminal de cadena pesada, pueden faltar o derivatizarse en parte o en la totalidad de las moléculas. Las sustituciones se pueden hacer en las regiones constantes para disminuir o aumentar la función efectora tal como la citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC (véase, por ejemplo, Winter et al., documento de Patente US No. 5,624,821; Tso et al., documento de Patente Us No. 5,834,597; y Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005, 2006), o
10 prolongar la vida media en humanos (véase, por ejemplo, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279: 6213, 2004). Ejemplos de sustituciones incluyen una Gln en la posición 250 y/o una Leu en la posición 428 (la numeración EU se utiliza en este párrafo para la región constante) para aumentar la vida media de un anticuerpo. La sustitución de cualquiera o todas las posiciones 234, 235, 236 y/o 237 reduce la afinidad por los receptores Fcγ, particularmente el receptor FcγRI (véase, por ejemplo, el documento de Patente US 6,624,821). Se puede utilizar una sustitución de alanina en
15 las posiciones 234, 235 y 237 de la IgG1 humano para reducir las funciones efectoras. Opcionalmente, las posiciones 234, 236 y/o 237 en la IgG2 humana se sustituyen con alanina y la posición 235 con glutamina (véase, por ejemplo, el documento de Patente 5,624,821). En algunos aspectos, se utiliza una mutación en una o más de las posiciones 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329, y 331 por la numeración de la UE de la IgG1 humana. En algunos aspectos, se utiliza una mutación en una o más de 318, 320, y 322 por la numeración de UE de la IgG1 humana. En
20 algunos aspectos, el isotipo es IgG2 o IgG4 humano.

E. Anticuerpos humanos

- Los anticuerpos humanos contra la α -sinucleína se proporcionan mediante una variedad de técnicas que se describen a continuación. Algunos anticuerpos humanos se seleccionan mediante experimentos de unión competitiva, o de lo contrario, para que tengan la misma o superpuesta especificidad de epítipo que el 5C1. Los
25 anticuerpos humanos se pueden también detectar para determinar la especificidad de un epítipo particular utilizando solo un fragmento de α -sinucleína (por ejemplo, residuos de aminoácidos 118-126) como inmunógeno, y/o detectar anticuerpos frente a una colección de mutantes de delección de α -sinucleína. Otra técnica para producir anticuerpos humanos es la metodología trioma (Oestberg et al., Hybridoma 2: 361-367 (1983); Oestberg, documento de Patente U.S. Pat. No. 4,634,664; y Engleman et al., documento de Patente U.S. Pat. No. 4,634,666). Otra técnica
30 implica ratones transgénicos inmunizantes que expresan genes de inmunoglobulina humanos, tales como el XenoMouse®, AlivaMab Mouse o Veloceimmune Mouse (véase, por ejemplo, Lonberg et al., documento de Patente WO93/1222, documentos de Patente U.S. Pat. No. 5,877,397, U.S. Pat. No. 5,874,299, U.S. Pat. No. 5,814,318, U.S. Pat. No. 5,789,650, U.S. Pat. No. 5,770,429, U.S. Pat. No. 5,661,016, U.S. Pat. No. 5,633,425, U.S. Pat. No. 5,625,126, U.S. Pat. No. 5,569,825, U.S. Pat. No. 5,545,806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology
35 14, 826 (1996), Kucheralapati, y documento de Patente WO 91/10741). Otra técnica es la presentación de fagos (véase, por ejemplo, Dower et al., documento de Patente WO 91/17271 y McCafferty et al., documentos de Patente WO 92/01047, U.S. Pat. No. 5,877,218, U.S. Pat. No. 5,871,907, U.S. Pat. No. 5,858,657, U.S. Pat. No. 5,837,242, U.S. Pat. No. 5,733,743 y U.S. Pat. No. 5,565,332). En estos métodos, se producen bibliotecas de fagos en las que los miembros muestran diferentes anticuerpos en sus superficies externas. Los anticuerpos se muestran
40 normalmente como fragmentos Fv o Fab. Los anticuerpos que muestran fagos con una especificidad deseada se seleccionan mediante el enriquecimiento por afinidad a un péptido de α -sinucleína o un fragmento del mismo. Otra técnica es secuenciar el DNA de células B humanas según los procedimientos generales descritos en Reddy et al., Nat Biotechnol. 2010 Sept 28(9): 965-9 (Epub 2010 Aug 29), y los documentos de Patente US 20110053803, 20100099103, 20100291066, 20100035763, y 20100151471. Brevemente, las células B se pueden obtener de un humano sospechoso de tener anticuerpos anti- α -sinucleína, por ejemplo, un humano inmunizado con α -sinucleína, fragmentos de la misma, polipéptidos más largos que contienen α -sinucleína o fragmentos de la misma, o anticuerpos anti-idiotípicos. El mRNA de los anticuerpos de las células B se retrotranscriben después en cDNA y se
45 secuencian utilizando, por ejemplo, la tecnología de secuenciación 454. Después de obtener las secuencias de las cadenas de cada anticuerpo, las cadenas se pueden emparejar juntas (por ejemplo, utilizando bioinformática), clonar, expresar, y secretar para las propiedades deseadas.
50

F. Expresión de anticuerpos recombinantes

- Se conocen varios métodos para producir anticuerpos quiméricos y humanizados utilizando líneas celulares que expresan anticuerpos (por ejemplo, hibridoma). Por ejemplo, las regiones variables de la inmunoglobulina de los anticuerpos se pueden clonar y secuenciar utilizando métodos bien conocidos. En un método, la región variable VH
55 de cadena pesada se clona mediante RT-PCR utilizando mRNA preparado a partir de células de hibridoma. Se emplean cebadores consensuados para el péptido líder de la región VH que abarca el codón de iniciación de la traducción como el cebador 5' y un cebador 3' específico de las regiones constantes g2b. Ejemplos de cebadores se describen en la solicitud de Patente U.S. 2005/0009150 de Schenk et al. (en adelante, "Schenk"). Las secuencias de múltiples clones derivados independientemente pueden compararse para garantizar que no se introduzcan cambios
60 durante la amplificación. La secuencia de la región VH se puede determinar también o confirmar mediante la secuenciación de un fragmento VH obtenido mediante la tecnología RACE RT-PCR de 5' y el cebador específico 3' de g2b.

La región variable VL de cadena ligera se puede clonar de manera análoga a la región VH. En un enfoque, un conjunto de cebadores consensuados diseñado para la amplificación de las regiones VL se diseña para hibridar con la región VL que abarca el codón de inicio de la traducción, y un cebador 3' específico para la región Ck posterior a la región de unión V-J. En un segundo enfoque, la metodología RACE RT-PCR de 5' se emplea para clonar un cDNA que codifica VL. Ejemplos de cebadores se describen en Schenk, supra. Las secuencias clonadas se combinan después con secuencias que codifican regiones constantes humanas (u otras especies no humanas). Ejemplos de secuencias que codifican regiones constantes humanas incluyen SEQ ID NO: 37, que codifica una región constante IgG1 humana, y SEQ ID NO: 39, que codifica una región constante de cadena ligera kappa humana.

En un enfoque, las regiones variables de cadena pesada y ligera se rediseñan genéticamente para codificar las secuencias donadoras de empalme posteriores a las uniones VDJ o VJ, y se clonan en el vector de expresión de mamíferos, tal como pCMV-hy1 para la cadena pesada, y pCMV-Mcl para la cadena ligera. Estos vectores codifican las regiones constantes γ 1 y Ck humanas como fragmentos exónicos posteriores al casete de región variable insertado. Tras la verificación de la secuencia, los vectores de expresión de cadena pesada y cadena ligera se pueden co-transfectar en células CHO para producir anticuerpos quiméricos. Se recogen medios condicionados 48 horas después de la transfección y se analizan mediante el análisis de transferencia de Western para la producción de anticuerpos o por ELISA para la unión del antígeno. Los anticuerpos quiméricos se humanizan como se describió anteriormente.

Los anticuerpos quiméricos, recubiertos, humanizados y humanos se producen típicamente mediante expresión recombinante. Los constructos de ácidos nucleicos recombinantes incluyen típicamente una secuencia de control de expresión unida operativamente a las secuencias codificantes de las cadenas de anticuerpos, que incluyen elemento(s) de control de expresión asociados de manera natural o heterólogos, tal como un promotor. Una vez que el vector se ha incorporado en un huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para un alto nivel de expresión de las secuencias de nucleótidos, y se recogen y purifican los anticuerpos de la reacción cruzada.

Estos vectores de expresión se replican típicamente en los organismos huéspedes como episomas o como parte integral del DNA cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección, por ejemplo, resistencia a la ampicilina o resistencia a la higromicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de DNA deseadas.

E. coli es un huésped procariota útil para la clonación de secuencias de DNA que codifican los polipéptidos descritos en la presente memoria. Los microbios, tales como la levadura son también útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C, y enzimas responsables para la utilización de maltosa y galactosa.

Las células de mamíferos son células huésped para la expresión de segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). Se han desarrollado varias líneas celulares de huéspedes adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas de células CHO, varias líneas de células COS, células HeLa, células L, células de riñón embrionario humano y líneas celulares de mieloma. Las células pueden ser no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tal como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., Immunol. Rev. 89: 49 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de empalme de RNA, sitios de poliadenilación, y secuencias de terminación transcripcional. Las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino, y similares. Véase Co et al., J. Immunol. 148: 1149 (1992).

Alternativamente, las secuencias que codifican anticuerpos se pueden incorporar en los transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y su posterior expresión en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, los documentos de Patente U.S. Pat. No. 5,741,957, U.S. Pat. No. 5,304,489, U.S. Pat. No. 5,849,992). Transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas en enlaces operables con un promotor o potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, tal como caseína o la beta-lactoglobulina.

Los vectores que contienen los segmentos de DNA de interés se pueden transferir en la célula huésped mediante métodos que dependen del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procarióticas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, la biofísica o la transfección basada en virus se pueden utilizar para otros huéspedes celulares. Otros métodos utilizados para transformar las células mamíferas incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección. Para la producción de animales transgénicos, los transgenes se pueden microinyectar en ovocitos fertilizados, o pueden incorporarse en el genoma de las células madre embrionarias, y los núcleos de dichas células se transfieren a ovocitos enucleados.

Habiendo introducido el vector(s) que codifica las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos en un cultivo celular, se pueden detectar los grupos de células para determinar la productividad de crecimiento y la calidad del producto en medios libres de suero. Los grupos de células de mayor producción pueden someterse después a la clonación de una sola célula basada en FACS para generar líneas monoclonales. Se pueden utilizar productividades específicas de más de 50 pg o 100 pg por célula por día, que corresponden a títulos de producto de más de 7,5 g/L de cultivo. Los anticuerpos producidos por clones de células individuales también se pueden probar para determinar la turbidez, las propiedades de filtración, PAGE, IEF, exploración UV, HP-SEC, mapeo de carbohidratos-oligosacáridos, espectrometría de masas y ensayos de unión, tales como ELISA o Biacore. Un clon seleccionado puede después depositarse en múltiples viales y almacenarse congelados para su uso posterior.

Una vez expresados, los anticuerpos se pueden purificar según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo captura de proteína A, purificación por HPLC, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Se puede emplear la metodología para la producción comercial de anticuerpos, incluyendo la optimización de codón, selección de promotores, elementos de transcripción, y terminadores, clonación de células individuales libres de suero, bancos de células, uso de marcadores de selección para la amplificación del número de copias, terminadores de CHO, clonación de células individuales libres de suero, mejora de los títulos de proteínas (véase, por ejemplo, los documentos de Patente US 5,786,464, US 6,114,148, US 6,063,598, US 7,569,339, WO2004/050884, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2005/019442, WO2008/107388, y WO2009/027471, y el documento de Patente US 5,888,809).

G. Ensayos de detección de anticuerpos

Los anticuerpos se pueden someter a varias detecciones que incluyen ensayos de unión, detecciones funcionales, detecciones en modelos animales de enfermedades asociadas los depósitos de α -sinucleína, y ensayos clínicos. Los ensayos de unión analizan la unión específica y, opcionalmente, la afinidad y la especificidad del epítipo a la α -sinucleína (o un fragmento de la misma, como los residuos de aminoácidos 118-126). Dichas detecciones se realizan a veces en competencia con un anticuerpo ejemplar como el 5C1. Opcionalmente, el anticuerpo o la diana de α -sinucleína se inmovilizan en dicho ensayo. Los ensayos funcionales se pueden realizar en modelos celulares que incluyen células que expresan de forma natural la α -sinucleína o se transfectan con DNA que codifica la α -sinucleína o un fragmento de la misma. Las células adecuadas incluyen células neuronales. Las células pueden detectarse para niveles reducidos de α -sinucleína (por ejemplo, mediante transferencia de Western o inmunoprecipitación de extractos celulares o sobrenadantes), niveles reducidos de α -sinucleína agregada (por ejemplo, mediante inmunohistoquímica y/o métodos confocales) y/o toxicidad reducida atribuible a la α -sinucleína.

Las detecciones de modelos animales prueban la capacidad del anticuerpo para tratar los signos o síntomas terapéuticos o profilácticos en un modelo animal que simula una enfermedad humana asociada con los depósitos de α -sinucleína, como una enfermedad del cuerpo de Lewy. Los signos o síntomas adecuados que pueden monitorizarse incluyen el equilibrio motor, la coordinación, y los déficits cognitivos. El grado de deterioro se puede determinar por comparación con un control apropiado, como el equilibrio motor, la coordinación o la deficiencia cognitiva en animales de control que han recibido un anticuerpo de control (por ejemplo, un anticuerpo de control del isotipo coincidente), un placebo, o ningún tratamiento en todos. Los modelos transgénicos u otros modelos animales de las enfermedades del cuerpo de Lewy pueden expresar un transgén de α -sinucleína humana. Para facilitar los ensayos en modelos animales, se pueden utilizar anticuerpos que tienen una región constante apropiada para el modelo animal. Se puede concluir que una versión humanizada de un anticuerpo será efectiva si el correspondiente anticuerpo de ratón o anticuerpo quimérico es efectivo en un modelo animal apropiado y el anticuerpo humanizado tiene una afinidad de unión similar (por ejemplo, por un factor de 1,5, 2, o 3, dentro del error experimental).

Los ensayos clínicos prueban la seguridad y la eficacia en un ser humano que tiene una enfermedad asociada con los depósitos de α -sinucleína.

H. Ácidos nucleicos

La invención proporciona además los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las cadenas pesada o ligera descritas anteriormente. Típicamente, los ácidos nucleicos codifican también un péptido señal unido a las cadenas pesadas y ligeras maduras. Ejemplos adecuados de péptidos señal incluyen los residuos de aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO: 6 (codificado por los nucleótidos 1-57 de SEQ ID NO: 5) y los residuos de aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO: 8 (codificado por los nucleótidos 1-57 de SEQ ID NO: 7). Las secuencias codificantes en los ácidos nucleicos pueden estar en una unión operable con secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias codificantes, tales como un promotor, potenciador, sitio de unión al ribosoma, señal de terminación de la transcripción y similares. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras pueden aparecer en forma aislada o pueden clonarse en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante síntesis en estado sólido o PCR de oligonucleótidos superpuestos. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras pueden unirse como un ácido nucleico contiguo, por ejemplo, dentro de un vector de expresión, o pueden estar separado, por ejemplo, cada uno clonado en su propio vector de expresión.

V. Aplicaciones terapéuticas

La invención proporciona varios métodos para tratar o efectuar profilaxis de la enfermedad del cuerpo de Lewy en pacientes que padecen o están en riesgo de contraer dicha enfermedad. Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos con riesgo de enfermedad de una LBD pero que no presentan síntomas, así como pacientes que presentan síntomas o signos de advertencia tempranos de sinucleinopatías, por ejemplo, desaceleración 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 el flujo sanguíneo cerebral), cambios sensoriales (olfato, dolor, sensaciones anormales de la discriminación del color), trastornos del sueño (trastorno de la conducta del sueño REM (RBD), síndrome de las piernas inquietas/movimientos periódicos de las extremidades, hipersomnia, insomnio) y otros signos y síntomas diversos (fatiga, diplopía, visión borrosa, seborrea, pérdida/ganancia de peso). Por lo tanto, los presentes métodos se pueden administrar profilácticamente a individuos que tienen un riesgo genético conocido de una 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 del riesgo hacia la PD incluyen mutaciones en los genes de α -sinucleína o Parkin, UCHL1, y CYP2D6; particularmente las mutaciones en las posiciones 30 y 53 del gen de la α -sinucleína. Los individuos que padecen actualmente la enfermedad de Parkinson pueden ser reconocidos por sus manifestaciones clínicas, incluyendo temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Normalmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcance los 40, 50, 60 o 70. El tratamiento implica generalmente múltiples dosis durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede controlarse analizando el anticuerpo, o las respuestas de las células T o B activadas a un agente terapéutico (por ejemplo, una forma truncada del péptido de la α -sinucleína) a lo largo del tiempo. Si la respuesta disminuye, se indica una dosis de refuerzo.

La invención proporciona métodos para tratar o efectuar profilaxis de la enfermedad de cuerpos de Lewy en un paciente por la administración de las composiciones de anticuerpos en condiciones que generan una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente (por ejemplo, la reducción de agregados de alfa-sinucleína neuríticos o axonales, reducción de la distrofia neurítica, mejora de la función cognitiva, y/o reversión, tratamiento o inhibición del deterioro cognitivo) en el paciente. En algunos métodos, las áreas de distrofia neurítica en el neuropilo del neocórtex y/o ganglios basales se pueden reducir en un 10%, 20%, 30%, 40% o más en comparación con un control.

El deterioro cognitivo, la disminución progresiva de la función cognitiva, los cambios en la morfología del cerebro y los cambios en la función cerebrovascular se observan con frecuencia en pacientes que padecen o que están en riesgo de contraer la enfermedad de cuerpos de Lewy. La invención proporciona métodos para inhibir el deterioro de la función cognitiva en tales pacientes.

La invención también proporciona métodos para preservar o aumentar la densidad sináptica y/o la densidad dendrítica. Un índice de cambios en la densidad sináptica o dendrítica se puede medir mediante marcadores de formación de sinapsis (sinaptofisina) y/o dendritas (MAP2). En algunos métodos, la densidad sináptica o dendrítica se puede restaurar al nivel de densidad sináptica o dendrítica en un sujeto sano. En algunos métodos, el nivel de densidad sináptica o dendrítica en un paciente puede elevarse en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o más en comparación con un control.

VI. Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

En aplicaciones profilácticas, un anticuerpo o una composición farmacéutica del mismo se administra a un paciente susceptible a, o 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 eficaz 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 y/o retrasar el desarrollo de déficits de comportamiento. En aplicaciones terapéuticas, se administra un anticuerpo a un paciente sospechoso de, o que ya padece una enfermedad del cuerpo 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 eficaz para reducir o al menos inhibir el aumento adicional de los niveles de alfa-sinucleína y fragmentos truncados, toxicidades asociadas y/o déficits de comportamiento.

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

Las dosis efectivas varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente incluyendo el tipo de enfermedad del cuerpo 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 ejemplo de intervalo de dosificación para anticuerpos es de aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg, y más normalmente de 0,1 a 3 mg/kg o 0,15-2 mg/kg o 0,15-1,5 mg/kg, de peso corporal del paciente. El anticuerpo puede administrarse como dosis diarias, o en días alternativos, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, trimestralmente, o según cualquier otro programa determinado mediante un análisis empírico. Un ejemplo de tratamiento implica la administración en dosis múltiples durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Ejemplos de regímenes de tratamiento adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

Los anticuerpos se pueden administrar por vía periférica (es decir, una en el que un anticuerpo administrado o introducido atraviesa la barrera hematoencefálica para alcanzar un sitio deseado en el cerebro. Las vías de administración incluyen administración tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. Algunas de las vías para la administración de anticuerpos son intravenosa y subcutánea. Este tipo de inyección se realiza más generalmente en los músculos de los brazos o las piernas. En algunos métodos, los anticuerpos se inyectan directamente en un tejido particular donde se acumulan depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal.

Composiciones farmacéuticas para la administración parenteral pueden ser estériles y sustancialmente isotónicas y fabricada bajo condiciones GMP. Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse en forma de dosis unitarias (es decir, la dosis para una administración única). Las composiciones farmacéuticas se pueden formular utilizando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la vía de administración elegida. Para inyección, los anticuerpos se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones compatibles fisiológicamente tales como la solución de Hank, 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, estabilización y/o dispersión. Alternativamente los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Los presentes regímenes se pueden administrar en combinación con otros agentes eficaces en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad que se está tratando. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Parkinson, la inmunoterapia frente a la alfa-sinucleína, documento de Patente WO/2008/103472, Levodopa, agonistas de la dopamina, inhibidores de la COMT, los inhibidores de la MAO-B, la amantadina, o agentes anticolinérgicos se pueden utilizar en combinación con los regímenes presentes.

VII. Otras aplicaciones

Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden utilizar para detectar α -sinucleína en el contexto del diagnóstico clínico o tratamiento o investigación. Los anticuerpos se pueden vender también como reactivos de investigación para investigación de laboratorio en la detección de células que contienen α -sinucleína y su respuesta a diversos estímulos. En dichos usos, los anticuerpos monoclonales se pueden marcar con moléculas fluorescentes, moléculas marcadas por spin, enzimas o radioisótopos, y se pueden proporcionar en la forma de un equipo de reactivos con todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo para la α -sinucleína. Los anticuerpos se pueden utilizar también para purificar α -sinucleína, por ejemplo, por cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos se pueden utilizar 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 su susceptibilidad. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar en un paciente que se presenta con síntomas de demencia. Si el paciente tiene LBs, entonces es probable que el paciente sufra una enfermedad de cuerpo de Lewy, tal como la enfermedad de Parkinson. Los métodos se pueden utilizar también en pacientes asintomáticos. La presencia de cuerpos de Lewy u otros depósitos anormales de α -sinucleína indica susceptibilidad a una futura enfermedad sintomática. Los métodos también son útiles para monitorizar la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes a los que se les ha diagnosticado previamente una enfermedad de cuerpo de Lewy.

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

Para el diagnóstico (por ejemplo, imágenes *in vivo*), los anticuerpos se pueden administrar mediante inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro mediante la inyección intracraneal o perforando un agujero a través del cráneo. La dosis de reactivo debe estar dentro de los mismos rangos que para los métodos de tratamiento. Típicamente, el 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 utilizando PET o SPECT.

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

Los anticuerpos se pueden utilizar 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-idiotipos se pueden utilizar en farmacocinéticas, farmacodinámicas, estudios de biodistribución así como en estudios clínicos 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 5C1 humanizados y, por lo tanto, pueden utilizarse para detectar anticuerpos 5C1 humanizados en estudios farmacocinéticos y ayudan a cuantificar las respuestas de anticuerpos humano-anti-humano (HAHA) en individuos tratados.

VIII. Equipo de reactivos

También se proporcionan equipos de reactivos que incluyen un anticuerpo específico de α -sinucleína e instrucciones de uso. Dichos equipos de reactivos se pueden utilizar, por ejemplo, para realizar los métodos de diagnóstico descritos anteriormente. Un equipo de reactivos también puede incluir una etiqueta. Los equipos de reactivos también suelen contener etiquetas que proporcionan instrucciones para el uso de los equipos de reactivos. El etiquetado también puede incluir un gráfico u otro régimen de correspondencia que correlaciona los niveles del marcador medido con los niveles de anticuerpos frente a la α -sinucleína. El término etiquetado se refiere generalmente a cualquier material escrito o grabado que se adjunte o acompañe de otro modo a un equipo de reactivos en cualquier momento durante su fabricación, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término etiquetado abarca folletos publicitarios y folletos, materiales de embalaje, instrucciones, casetes de audio o video, discos de computadora, así como la escritura impresa directamente en los equipos de reactivos.

También se proporcionan equipos de reactivos de diagnóstico para realizar imágenes *in vivo*. Tales equipos de reactivos contienen típicamente un anticuerpo que se une a un epítipo de α -sinucleína como se describe en la presente memoria. El anticuerpo se puede marcar o se incluye un reactivo de marcaje secundario en el equipo de reactivos. El equipo de reactivos puede incluir instrucciones para realizar un ensayo de imágenes *in vivo*.

Todas las solicitudes de Patente, el sitio web, otras publicaciones, los números de acceso y similares citados anteriormente o a continuación, se incorporan por referencia en su totalidad para todos los fines en la misma medida que si cada artículo individual se indicará específica e individualmente como tal. Si diferentes versiones de una secuencia están asociadas 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 significa la fecha de presentación real anterior a la fecha de presentación de una solicitud de prioridad, refiriéndose al número de acceso, si corresponde. Del mismo modo, si se publican diferentes versiones de una publicación, sitio web o similares en diferentes momentos, la versión más reciente publicada en la fecha de presentación efectiva de la solicitud se entiende a menos que se indique lo contrario. Cualquier característica, etapa, elemento, realización, o aspecto de la invención se puede utilizar en combinación con cualquier otra a menos que se indique específicamente lo contrario. Aunque la presente invención se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y los ejemplos con fines de claridad y comprensión, será evidente que ciertos cambios y modificaciones pueden ponerse en práctica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento del 5C1 murino

El anticuerpo 5C1 murino se generó en un ratón inyectado con un conjugado peptídico que contenía el inmunógeno peptídico VDPDNEAYEGGC (SEQ ID NO: 14) acoplado a un anticuerpo antirratón de oveja. El péptido, que incluye los residuos 118-126 de la α -sinucleína unida a un péptido GGC C-terminal, se acopló a un anticuerpo antirratón de oveja a través de un enlazador de maleimida unido al residuo de cisteína C-terminal.

Ejemplo 2: Inmunización pasiva con anticuerpos de α -sinucleína

Para probar el efecto de los anticuerpos de α -sinucleína en un modelo animal para la enfermedad del cuerpo de Lewy, se utilizaron varios anticuerpos de α -sinucleína para inmunizar ratones pasivamente. Se utilizaron ratones hembra de 3-4 meses de edad, knockout de α -sinucleína y transgénicos de α -sinucleína (línea 61) (n = 14/grupo). Los anticuerpos que se probaron incluyeron:

9E4 (IgG1, epítipo: aminoácidos 118-126 de α -sinucleína);

5C1 (IgG1, inmunogen: aminoácidos 118-126 de α -sinucleína, cys-enlazador);

5D12 (IgG2, inmunogen: aminoácidos 118-126 de α -sinucleína, n-enlazador);

1H7 (IgG1, epítipo: aminoácidos 91-99 de α -sinucleína); y

27-1 (IgG1 anticuerpo de control).

- 5 Los ratones recibieron una dosis de anticuerpo de 10 mg/kg durante un período de 5 meses, para un total de 21 inyecciones. Además, los animales se inyectaron con lentivirus (LV) que expresaba α -sinucleína humana (wt) mediante introducción unilateral de α -sinucleína humana (wt) en el hipocampo.

Los anticuerpos leídos incluyeron anticuerpos de α -sinucleína de Chemicon (epítipo: α -sinucleína de longitud completa), Millipore (epítipo: α -sinucleína de longitud completa), y ELADW 105 (epítipo: aminoácidos 121-124 de α -sinucleína, preferiblemente con α -sinucleína truncada en el residuo 122-124).

Puntos finales: los títulos de anticuerpos se controlaron antes de la finalización del experimento. El comportamiento se evaluó mediante el ensayo del laberinto de agua de Morris (MWM) y las pruebas de haz redondo horizontal. La prueba de haz redondo evalúa el equilibrio motor, la coordinación y la marcha utilizando dos haces de diámetro variable. El haz A (haz de entrenamiento) tiene un diámetro mayor y, por lo tanto, es más fácil de atravesar. El haz D (haz de prueba) es más pequeño en diámetro y, por lo tanto, más difícil de atravesar. El rendimiento del laberinto de agua se llevó a cabo en la semana 10 y justo antes de la terminación. Al finalizar el experimento, los ratones se sacrificaron y se obtuvieron mediciones neuropatológicas para la agregación de α -sinucleína, sinptofisina y MAP2. Además, se obtuvieron mediciones de bioquímica para la α -sinucleína, PSD95, y sinaptofisina. El etiquetado confocal y multimarcado seleccionado se llevó a cabo utilizando marcadores sinápticos, neuronales y gliales.

Resultados: Los resultados mostraron que todos los anticuerpos, excepto 5D12, produjeron una reducción significativa en la acumulación de α -sinucleína y la preservación de las densidades sinápticas y dendríticas, así como resultados positivos en el rendimiento de MWM. El anticuerpo 9E4 fue efectivo en estudios *in vitro* e *in vivo*, así como en ensayos de comportamiento. En particular, los resultados indican que los anticuerpos de α -sinucleína pueden reducir los agregados de α -sinucleína neuríticos/axonales.

Resultados de comportamiento: Los anticuerpos 5C1 y 9E4 mejoraron el rendimiento del laberinto de agua en ratones transgénicos de α -sinucleína, al igual que el 1H7, aunque en menor medida. Véase la Figura 3. En contraste, el anticuerpo 5D12 no mejoró el rendimiento del laberinto de agua en ratones transgénicos de α -sinucleína. Con respecto al ensayo del haz redondo horizontal, los anticuerpos 9E4 y 1H7 mejoraron el rendimiento medido tanto por la velocidad como por el número de errores, mientras que los anticuerpos 5D12 y 5C1 no lo hicieron. Véase la Figura 4. Los datos de la Figura 4 se presentan como el número de deslizamientos/10 cm (es decir, "errores") y la relación de la distancia recorrida dividida por el tiempo que se tarda en recorrer la distancia (es decir, "velocidad", medida en unidades de 10 cm/s).

Resultados de neuropatología: Los anticuerpos 5C1, 9E4 y 1H7 redujeron la distrofia neurítica positiva de ELADW-105, mientras que el anticuerpo 5D12 no lo hizo. En ratones transgénicos de α -sinucleína, el anticuerpo 9E4 redujo el área de neuropil en un 43% en el neocórtex y en un 40% en los ganglios basales, en comparación con los ratones de control (es decir, ratones que recibieron el anticuerpo de control 27-1 IgG1). El anticuerpo 9E4 también conservó la tinción para sinaptofisina y MAP2 en el neocórtex y en los ganglios basales.

Ejemplo 3: Secuenciación de los dominios variables de 5C1

El mRNA se extrajo y purificó a partir de una célula de hibridoma 5C1 utilizando un equipo de reactivos QIAGEN® OLIGOTEX® mRNA. El mRNA purificado se transcribió a continuación en cDNA utilizando un cebador anti-sentido oligo dT y el equipo de reactivos INVITROGEN® SUPERScript® II. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de 5C1 se amplificaron a partir de cDNA mediante PCR, utilizando cebadores de sentido VH y VL degenerados y un cebador anti-sentido específico del gen (CH/CL). Los productos de PCR, que se diseñaron para incluir la secuencia del péptido señal, el dominio variable, y el dominio constante (hasta el cebador anti-sentido), se purificaron en gel, se clonaron en un vector romo o un vector TA, y se secuenciaron después. Las secuencias se dedujeron del análisis de al menos 3 clones independientes que tienen un marco de lectura abierto que comienza con una metionina y se extiende a través de la región variable hasta la región constante.

El ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada de 5C1 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5. La secuencia de proteínas correspondiente (Fig. 1), que incluye un péptido señal en las posiciones 1-19 (subrayada) es la siguiente:

MERHWIFLFLLSVTGGVHSQVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFTNYWMN
WIKARPGQGLEWIGATNPNNGYTDYNQRFKDKAILTADKSSNTAYMHLSSLTSE
DSAVYFCASGGHLAYWGQGT VTVSA (SEQ ID NO: 6)

El ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera de 5C1 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 7. La secuencia de proteínas correspondiente (Fig. 2), que incluye un péptido señal en las posiciones 1-19 (subrayada) es la siguiente:

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSQSLFHSKGN
 TYLHWYLQKPGQSPKLLINRVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLG
 VYFCSQSAHVPWTFGGGTKLEIR (SEQ ID NO: 8)

- 5 La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada de 5C1 maduro (SEQ ID NO: 9) se muestra en la Tabla 1 (a continuación), y la secuencia de aminoácidos correspondiente para la región variable de cadena ligera de 5C1 maduro (SEQ ID NO: 24) se muestra en la Tabla 2 (a continuación). La numeración de Kabat se utiliza en todo.

Ejemplo 4: Humanización de 5C1 murino

- 10 El análisis de las CDRs de la región Vh de 3H6 revela una CDR-H1 de 5 residuos (SEQ ID NO: 10), una CDR-H2 de 17 residuos (SEQ ID NO: 11), y una CDR-H3 de 6 residuos (SEQ ID NO: 12). Análisis similares de las CDRs de la región Vk de 3H6 revela una CDR-L1 de 16 residuos (SEQ ID NO: 25), una CDR-L2 de 7 residuos (SEQ ID NO: 26), y una CDR-L3 de 9 residuos (SEQ ID NO: 27).

- 15 El análisis de los residuos en la interfaz entre las regiones Vk y Vh de 5C1 revela que la mayoría de los residuos son los que se encuentran comúnmente.

Una búsqueda en la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes del NCBI permitió la selección de marcos humanos adecuados en los que injertar las CDRs murinas de 5C1. Para Vk, se eligió una cadena ligera kappa humana con el código de acceso NCBI CAB51293.1 (GI: 5578786; SEQ ID NO: 28). Para Vh, se eligió la cadena pesada de Ig humana AAY42876.1 (GI: 66096557; SEQ ID NO: 13).

- 20 Ejemplos de diseños Vh y Vk humanizados, con retromutaciones basadas en los marcos humanos seleccionados, se muestran en la Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente.

Ejemplos de diseños de Vh humanizada

- 25 Se diseñaron cinco diferentes versiones de la región Vh de 5C1, H1, H2, H3, H4 y H5. En la selección de retromutaciones, los residuos H11, H27, H30, H48, H67, H69, H73, H91 y H94 se centraron en última instancia. En cada uno de los diseños de la región Vh humanizada, los residuos H11, H27, H30, H48 y H73 fueron retromutados a L, Y, T, I y K, respectivamente, porque los residuos formaban parte de CDR-H1 según la definición de Chothia (H27 y H30) o los residuos correspondientes en la secuencia de marco humana eran residuos de baja frecuencia (V en la posición H11, M en la posición H48, y E en la posición H73). Para la versión H1 (SEQ ID NO: 14), los residuos adicionales H67 y H69 fueron retromutados (a A y L, respectivamente) para preservar el empaquetamiento de CDR.
- 30 En la versión H2 (SEQ ID NO: 15), no se introdujeron retromutaciones adicionales (es decir, se eliminaron las retromutaciones en las posiciones H67 y H69 en la versión H1). En la versión H3 (SEQ ID NO: 16), los residuos adicionales H67, H69, H91 y H94 fueron retromutados (a A, L, F, y S, respectivamente). Las retromutaciones H67, H69, y H94 fueron para preservar el empaquetamiento de CDR, mientras que H91, un residuo de interfaz Vh/Vk, se retromutó para probar su impacto en la interfaz. En la versión H4 (SEQ ID NO: 17), los residuos adicionales H67, H69 y H94 se retromutaron (a A, L y S, respectivamente). Por lo tanto, la versión H4 difiere de H3 en que se elimina la mutación en H91. En la versión H5 (SEQ ID NO: 18), el residuo adicional H94 se retromutó también (a S), para
- 35 preservar el empaquetamiento de CDR.

Tabla 1: Regiones Vh de 5C1 humanizadas

Kabat #	Lineal #	FR o CDR	5C1 Murino (SEQ ID NO: 9)	FR Aceptor de Hu VH (SEQ ID NO: 13)	5C1 H1 (SEQ ID NO: 14)	5C1 H2 (SEQ ID NO: 15)	5C1 H3 (SEQ ID NO: 16)	5C1 H4 (SEQ ID NO: 17)	5C1 H5 (SEQ ID NO: 18)
				Acc#AAY42876.1					
1	1	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V

Kabat #	Lineal #	FR o CDR	5C1 Murino (SEQ ID NO: 9)	FR Aceptor de Hu VH (SEQ ID NO: 13)	5C1 H1 (SEQ ID NO: 14)	5C1 H2 (SEQ ID NO: 15)	5C1 H3 (SEQ ID NO: 16)	5C1 H4 (SEQ ID NO: 17)	5C1 H5 (SEQ ID NO: 18)
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	A	K	K	K	K	K	K
13	13	Fr1	K	K	K	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	T	S	S	S	S	S	S
17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	Q	K	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	M	V	V	V	V	V	V
21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
26	26	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
27	27	Fr1	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y
28	28	Fr1	T	T	T	T	T	T	T
29	29	Fr1	F	F	F	F	F	F	F
30	30	Fr1	T	N	T	T	T	T	T
31	31	CDR-H1	N	N	N	N	N	N	N
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	W	A	W	W	W	W	W
34	34	CDR-H1	M	I	M	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	N	N	N	N	N	N	N
35A		CDR-H1	—	—	—	—	—	—	—
35B		CDR-H1	—	—	—	—	—	—	—

Kabat #	Lineal #	FR o CDR	5C1 Murino (SEQ ID NO: 9)	FR Aceptor de Hu VH (SEQ ID NO: 13)	5C1 H1 (SEQ ID NO: 14)	5C1 H2 (SEQ ID NO: 15)	5C1 H3 (SEQ ID NO: 16)	5C1 H4 (SEQ ID NO: 17)	5C1 H5 (SEQ ID NO: 18)
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	I	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R	R	R	R	R
39	39	Fr2	A	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	G	G	G	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	I	I	I	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	A	G	A	A	A	A	A
51	51	CDR-H2	T	I	T	T	T	T	T
52	52	CDR-H2	N	I	N	N	N	N	N
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	—	—	—	—	—	—	—
52C		CDR-H2	—	—	—	—	—	—	—
53	54	CDR-H2	N	I	N	N	N	N	N
54	55	CDR-H2	N	F	N	N	N	N	N
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	D	T	D	D	D	D	D
59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	N	A	N	N	N	N	N
61	62	CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
62	63	CDR-H2	R	K	R	R	R	R	R
63	64	CDR-H2	F	F	F	F	F	F	F
64	65	CDR-H2	K	Q	K	K	K	K	K
65	66	CDR-H2	D	G	D	D	D	D	D
66	67	Fr3	K	R	R	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	A	V	A	A	V

ES 2 701 406 T3

Kabat #	Lineal #	FR o CDR	5C1 Murino (SEQ ID NO: 9)	FR Aceptor de Hu VH (SEQ ID NO: 13)	5C1 H1 (SEQ ID NO: 14)	5C1 H2 (SEQ ID NO: 15)	5C1 H3 (SEQ ID NO: 16)	5C1 H4 (SEQ ID NO: 17)	5C1 H5 (SEQ ID NO: 18)
68	69	Fr3	I	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	L	I	L	I	L	L	I
70	71	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	K	E	K	K	K	K	K
74	75	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T	T	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	N	N	N	N	N	N
77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	M	M	M	M	M	M	M
81	82	Fr3	H	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	R	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	S	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	F	Y	Y	Y	F	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
94	98	Fr3	S	R	R	R	S	S	S
95	99	CDR-H3	G	E	G	G	G	G	G
96	100	CDR-H3	G	G	G	G	G	G	G
97	101	CDR-H3	H	N	H	H	H	H	H
98		CDR-H3	—	L	—	—	—	—	—
99		CDR-H3	—	N	—	—	—	—	—

Kabat #	Lineal #	FR o CDR	5C1 Murino	FR Aceptor de Hu VH	5C1 H1	5C1 H2	5C1 H3	5C1 H4	5C1 H5
			(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 17)	(SEQ ID NO: 18)
100		CDR-H3	—	W	—	—	—	—	—
100A	102	CDR-H3	L	L	L	L	L	L	L
100B		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100C		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100D		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100E		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100F		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100G		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100H		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100I		CDR H3	—	—	—	—	—	—	—
100J		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
100K		CDR-H3	—	—	—	—	—	—	—
101	103	CDR-H3	A	D	A	A	A	A	A
102	104	CDR-H3	Y	P	Y	Y	Y	Y	Y
103	105	Fr4	W	W	W	W	W	W	W
104	106	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
105	107	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	108	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
107	109	Fr4	T	T	T	T	T	T	T
108	110	Fr4	V	L	L	L	L	L	L
109	111	Fr4	V	V	V	V	V	V	V
110	112	Fr4	T	T	T	T	T	T	T
111	113	Fr4	V	V	V	V	V	V	V
112	114	Fr4	S	S	S	S	S	S	S
113	115	Fr4	A	S	S	S	S	S	S

Ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos que codifican H1, H2, H3, H4 y H5 de 5C1 humanizado se proporcionan en SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22, y 23, respectivamente.

5 Ejemplos de diseños de Vk humanizados

Se diseñaron cuatro diferentes versiones humanizadas L1, L2, L3 y L4 de la región Vk de 5C1. En la selección de retromutaciones, los residuos L2, L12, L14, L45, L49, y L87 se centraron en última instancia. En cada uno de los diseños de la región Vk humanizada, los residuos L12 y L14 fueron retromutados a S debido a que los residuos correspondientes en la secuencia de marco humano (P y T, respectivamente) son residuos de baja frecuencia. Para la versión L1 (SEQ ID NO: 29), los residuos adicionales L2, L45, L49, y L87 fueron retromutados (a V, K, N, y F, respectivamente). L2 es un residuo canónico/que interactúa con CDR; L45 sufre un cambio de polaridad/carga de las secuencias de marco murino a humano (K a Q), y por lo tanto podría impactar el plegamiento; L49 es un residuo de Vernier; y L87 es un residuo de interfaz Vh/Vk. En la versión L2 (SEQ ID NO: 30), el residuo adicional L45 se retromutó a K. Por lo tanto, en relación con L1, se eliminaron las retromutaciones en los residuos L2, L49, y L87. En la versión L3 (SEQ ID NO: 31), los residuos adicionales L2, L49, y L87 se retromutaron (a V, N, y F, respectivamente). Por lo tanto, en relación con L1, se eliminó la retromutación en el residuo L45. En la versión L4 (SEQ ID NO: 32), no se retromutaron los residuos adicionales (es decir, solo se retromutaron los residuos L12 y L14).

Tabla 2: Regiones Vk de 5C1 humanizado

Kabat #	Lineal #	FR o CDR	VL de 5C1 Murino (SEQ ID NO: 24)	FR Aceptor de Hu VK (SEQ ID NO: 28)	5C1 L1 (SEQ ID NO: 29)	5C1 L2 (SEQ ID NO: 30)	5C1 L3 (SEQ ID NO: 31)	5C1 L4 (SEQ ID NO: 32)
				Acc# CAB51293.1				
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	V	I	V	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	I	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	Y	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	P	S	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	T	S	S	S	S
15	15	Fr1	P	P	P	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	D	E	E	E	E	E
18	18	Fr1	Q	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A

Kabat #	Lineal #	FR o CDR	VL de 5C1 Murino	FR Aceptor de Hu VK	5C1 L1 (SEQ ID NO:29)	5C1 L2 (SEQ ID NO: 30)	5C1 L3 (SEQ ID NO: 31)	5C1 L4 (SEQ ID NO: 32)
			(SEQ ID NO: 24)	(SEQ ID NO: 28)				
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	F	L	F	F	F	F
27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	H	H
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1						
28	33	CDR-L1	K	N	K	K	K	K
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	N	Y	N	N	N	N
31	36	CDR-L1	T	N	T	T	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	H	D	H	H	H	H
35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	K	K	K	K	K	K
40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	Q	K	K	Q	Q
46	51	Fr2	L	L	L	L	L	L
47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I

Kabat #	Lineal #	FR o CDR	VL de 5C1	FR Aceptor	5C1 L1 (SEQ ID NO:29)	5C1 L2 (SEQ ID NO: 30)	5C1 L3 (SEQ ID NO: 31)	5C1 L4 (SEQ ID NO: 32)
			Murino (SEQ ID NO: 24)	de Hu VK (SEQ ID NO: 28)				
49	54	Fr2	N	Y	N	Y	N	Y
50	55	CDR-L2	R	L	R	R	R	R
51	56	CDR-L2	V	G	V	V	V	V
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N	N
54	59	CDR-L2	R	R	R	R	R	R
55	60	CDR-L2	F	A	F	F	F	F
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	K	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	G	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	L	V	V	V	V	V

Kabat #	Lineal #	FR o CDR	VL de 5C1 Murino	FR Aceptor de Hu VK	5C1 L1	5C1 L2	5C1 L3	5C1 L4
			(SEQ ID NO: 24)	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 32)
84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	F	Y	F	Y	F	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	S	M	S	S	S	S
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	S	A	S	S	S	S
92	97	CDR-L3	A	L	A	A	A	A
93	98	CDR-L3	H	Q	H	H	H	H
94	99	CDR-L3	V	T	V	V	V	V
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
95B		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
95C		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
95D		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
95E		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
95F		CDR-L3	—	—	—	—	—	—
96	101	CDR-L3	W	P	W	W	W	W
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	G	G	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	V	V	V	V	V
105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I	I
106A		Fr4	—	—	—	—	—	—
107	112	Fr4	R	K	K	K	K	K

Ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos que codifican L1, L2, L3, y L4 de 5C1 humanizado se proporcionan en SEQ ID NOs: 33, 34, 35, y 36, respectivamente.

Ejemplo 5: Afinidad de anticuerpos 5C1 humanizados para alfa-sinucleína

- 5 La afinidad de varias combinaciones de proteínas de cadena pesada humanizada y cadena ligera humanizada de 5C1 para α -sinucleína se analizó mediante ELISA. Como se muestra en la Figura 5, la versión H1L1 del anticuerpo 5C1 humanizado no mostró afinidad por la α -sinucleína en las condiciones del ensayo. En contraste, el anticuerpo 5C1 quimérico tuvo una afinidad mayor para la α -sinucleína que el anticuerpo 5C1 murino. Las versiones humanizadas H3L4, H4L3, y H + L3 quimérico se comportaron de manera comparable, y casi tan bien como el
- 10 anticuerpo 5C1 quimérico. Además, las versiones humanizadas H3L3 y H3L1 se realizaron de manera comparable, aunque con una afinidad ligeramente más baja que H3L4, H4L3 Y H + L3 quimérico.

Varias versiones de anticuerpos 5C1 humanizados se analizaron también por Biacore, para determinar con mayor precisión las afinidades de unión. Se preparó un chip CM5 de IgG anti-humana de Biacore siguiendo el protocolo

suministrado por GE Healthcare. Cada versión de anticuerpo 5C1 humanizado se capturó independientemente a un nivel donde R_{max} no excedería de 50, utilizando la ecuación:

$$R_{max} = (RU \text{ del anticuerpo capturado}) * (MW \text{ de la sinucleína}) / (MW \text{ del anticuerpo capturado}) * 2$$

5 El factor de 2 en el denominador es para el número de sitios de unión en el anticuerpo. La alfa-sinucleína se hizo fluir sobre el corte a una concentración que varió de ~10x por encima de la KD esperada a ~10x por debajo de la KD esperada. Los datos se recopilaron y se restó la doble referencia para tener en cuenta la deriva y una pequeña cantidad de unión no específica. Los datos se analizaron utilizando el software de evaluación BIAcore utilizando un modelo 1:1 y un ajuste global.

10 Los resultados del análisis de Biacore se resumen en la Tabla 3 (a continuación). Los datos indican que la mayor parte de la pérdida de afinidad por la alfa-sinucleína se debe a un aumento de la tasa de desconexión en algunas versiones de anticuerpos. Sobre la base de los datos de afinidad, H4L3 se identificó como un anticuerpo preferido.

Tabla 3: Afinidades determinadas por Biacore de variantes de anticuerpos 5C1

Variante de 5C1	# Ratón de marco AAs		K_D	K_{on}	K_{off}
	HC	LC			
m5C1	82	80	68.7 nM	$7.5 \times 10^4/s$	$5.1 \times 10^3/s$
Ch5C1	82	80	86.0 nM	$6.1 \times 10^4/s$	$5.3 \times 10^3/s$
h5C1_H3L4	65, incl. 9 retromutaciones (V11L, G27Y, N30T, M48I, V67A, I69L, E73K, Y91F, R94S)	69, incl. 2 retromutaciones (P12S, T14S)	1237.0 nM	$4.4 \times 10^4/s$	$54.5 \times 10^3/s$
h5C1_H4L3	64, incl. 8 retromutaciones (V11L, G27Y, N30T, M48I, V67A, I69L, E73K, R94S)	72, incl. 5 retromutaciones (I2V, P12S, T14S, Y49N, Y87F)	119.8 nM	$4.4 \times 10^4/s$	$5.1 \times 10^3/s$
h5C1_H4L4		69, incl. 2 retromutaciones (P12S, T14S)	600.9 nM	$5.3 \times 10^4/s$	$32.4 \times 10^3/s$
h5C1_H5L3	62, incl. 6 retromutaciones (V11L, G27Y, N30T, M48I, E73K, R94S)	72, incl. 5 retromutaciones (I2V, P12S, T14S, Y49N, Y87F)	283.1 nM	$3.9 \times 10^4/s$	$11.1 \times 10^3/s$
h5C1_H5L4		69, incl. 2 retromutaciones (P12S, T14S)	1062.0 nM	$3.7 \times 10^4/s$	$40.3 \times 10^3/s$

Ejemplo 6: Mutagénesis de barrido de alanina

15 Los epítomos unidos por los anticuerpos 5C1, 9E4 y 5D12 se han mapeado aproximadamente para que estén dentro de los residuos 118-126 de la alfa-sinucleína debido a los anticuerpos que se unen a los péptidos superpuestos. Este ejemplo describe un mapeo más preciso, mediante la mutagénesis de barrido de alanina, de cada residuo entre las posiciones 118 y 126 de la alfa sinucleína. La alanina se utiliza debido a su grupo funcional metilo, no voluminoso, químicamente inerte, que sin embargo imita las preferencias de estructura secundaria que poseen

20 muchos de los otros aminoácidos. Las partes superiores de las Figs. 6, 7 y 8 muestran los resultados de las transferencias de Western teñidas con los anticuerpos 9E4, 5C1 y 5D12, respectivamente. Las transferencias incluyen alfa-sinucleína de longitud completa y mutantes puntuales de la alfa-sinucleína producidos por mutagénesis de barrido de alanina de los residuos 118-126 y se tiñeron con 0,5 µg/ml de anticuerpo. Las mutaciones en las posiciones 122 y 125 anulan esencialmente la unión de 9E4, mientras que las mutaciones en otras posiciones tienen

25 poco o ningún efecto. Por lo tanto, 9E4 se pone en contacto predominantemente con los residuos 122 y 125. Las mutaciones en las posiciones 120-122 eliminan esencialmente la unión de 5C1, y las mutaciones en las posiciones 123 y 124 reducen sustancialmente pero no eliminan la unión. Por lo tanto, 5C1 se pone en contacto

5 predominantemente con los residuos 120-122 y, en menor medida, con los restos 123-124. Las mutaciones en las posiciones 120-122 eliminaron esencialmente la unión de 5D12, y las mutaciones en las posiciones 118, 119, 123 y 124 redujeron sustancialmente pero no eliminaron la unión. Por lo tanto, 5D12 se une predominantemente a las posiciones 120-122 y, en menor medida, a las posiciones 118, 119, 123 y 124. En cada una de las Figs. 6-8, el anticuerpo 1H7 se utiliza como control. 1H7 se une a los residuos 91-98 de la alfa-sinucleína, y por lo tanto se espera que se una a la alfa-sinucleína independientemente de la presencia de mutaciones en los residuos 118-126.

10 Las diferentes especificidades de unión de 9E4 en comparación con 5C1 y 5D12 pueden reflejar en parte sus respectivos métodos de producción. El 9E4 se preparó mediante inmunización con alfa-sinucleína de longitud completa dando como resultado un anticuerpo que se une a un epítipo conformacional. 5C1 y 5D12 se prepararon mediante inmunización con un péptido de 10 aminoácidos dando como resultado un epítipo lineal.

La Fig. 9 es un modelo de bola y palo de los aminoácidos en la alfa-sinucleína próximos a los sitios de unión de los anticuerpos 9E4, 5C1 y 5D12. Los dos residuos discontinuos del epítipo enlazado por 9E4, los residuos 122 y 125, forman un bolsillo en la conformación de la proteína de alfa-sinucleína de longitud completa.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende tres CDRs de cadena ligera como lo define Kabat que tienen secuencias de SEQ ID NOs: 25-27 y tres CDRs de cadena pesada como lo define Kabat que tienen secuencias de SEQ ID NOs: 10-12.
- 5 2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es 5C1 o una forma quimérica, recubierta, o humanizada del mismo, en donde 5C1 es un anticuerpo de ratón caracterizado por una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 24.
- 10 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 17 (H4) y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 31 (L3), en donde el anticuerpo se une específicamente a alfa-sinucleína humana.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, siempre que las posiciones 11, 27, 30, 48 y 73 de la región variable de cadena pesada madura estén ocupadas por L, Y, T, I y K, respectivamente, y las posiciones 12 y 14 de la región variable de cadena ligera madura estén ocupadas por S.
- 15 5. El anticuerpo de la reivindicación 4, siempre que las posiciones 67, 69 y 94 de la región variable de cadena pesada madura estén ocupadas por A, L, y S, respectivamente.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, siempre que las posiciones 2, 49 y 87 de la región variable de cadena ligera madura estén ocupadas por V, N, y F, respectivamente.
- 20 7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 17 (H4) y una región variable de cadena ligera madura al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 31 (L3).
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la región variable de cadena pesada madura se une a la región constante de cadena pesada y la región variable de cadena ligera madura se une a la región constante de cadena ligera, opcionalmente una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 38 siempre que falte la lisina C-terminal, y/o una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 40.
- 25 9. El anticuerpo de la reivindicación 3 o 8, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 17 (H4) y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 31 (L3).
- 30 10. El anticuerpo de la reivindicación 3 o 8, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 18 (H5) y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 31 (L3).
11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un fragmento Fab.
- 35 12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Un ácido nucleico que codifica las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
14. El anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento o la realización de profilaxis de una enfermedad de cuerpo de Lewy.

40

		5C1-VH																			
Numeración de Kabat	m5C1VH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
		Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	K	P	G	T	S	V	Q	M
Numeración de Kabat	m5C1VH	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
		S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>M</u>	<u>N</u>	<u>W</u>	I	K	A	R
Numeración de Kabat	m5C1VH	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59
		P	G	Q	G	L	E	W	I	C	A	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>
Numeración de Kabat	m5C1VH	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
		<u>N</u>	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	K	A	I	L	T	A	D	K	S	S	N	T	A	Y
Numeración de Kabat	m5C1VH	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
		M	H	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	A	S	<u>G</u>	<u>G</u>
Numeración de Kabat	m5C1VH	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	-	-
		<u>H</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	V	V	T	V	S	A	-	-	-

FIG. 1

		5C1-VL																			
Numeración de Kabat	m5C1VL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
		D	V	V	M	T	Q	I	P	L	Y	L	S	V	S	P	G	D	Q	A	S
Numeración de Kabat	m5C1VL	21	22	23	24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	27E	27F	28	29	30	31	32	33	34
		I	S	C	R	S	S	Q	S	L	F	H	S	-	K	G	N	T	Y	L	H
Numeración de Kabat	m5C1VL	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
		W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	N	R	V	S	N	R
Numeración de Kabat	m5C1VL	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
		F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K
Numeración de Kabat	m5C1VL	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
		I	S	G	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	F	C	S	Q	S	A	H	V
Numeración de Kabat	m5C1VL	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107							
		P	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	R							

FIG. 2

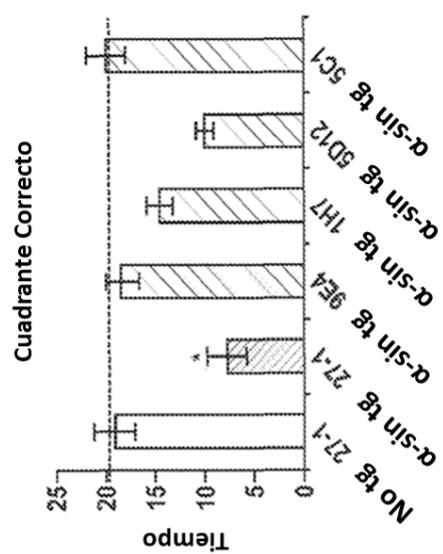
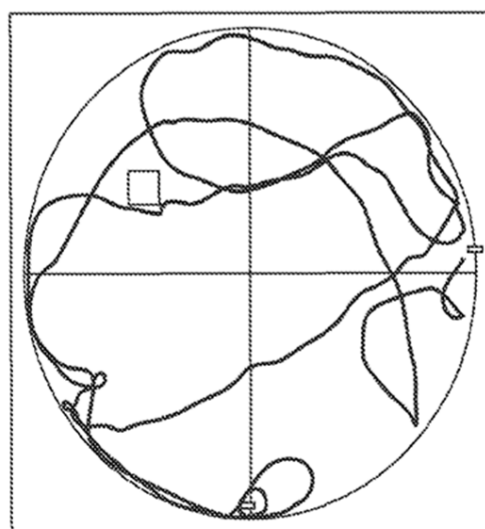


FIG. 3

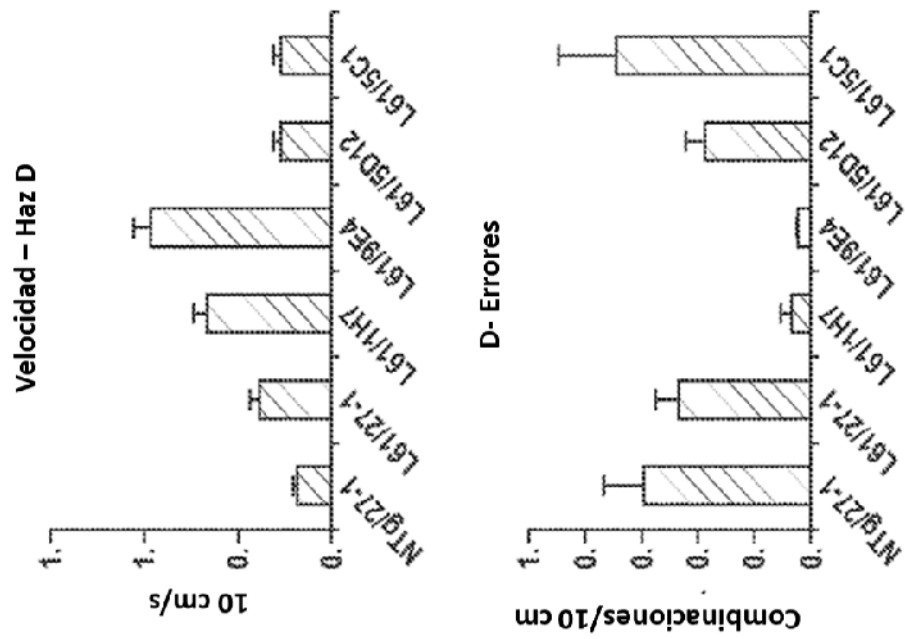
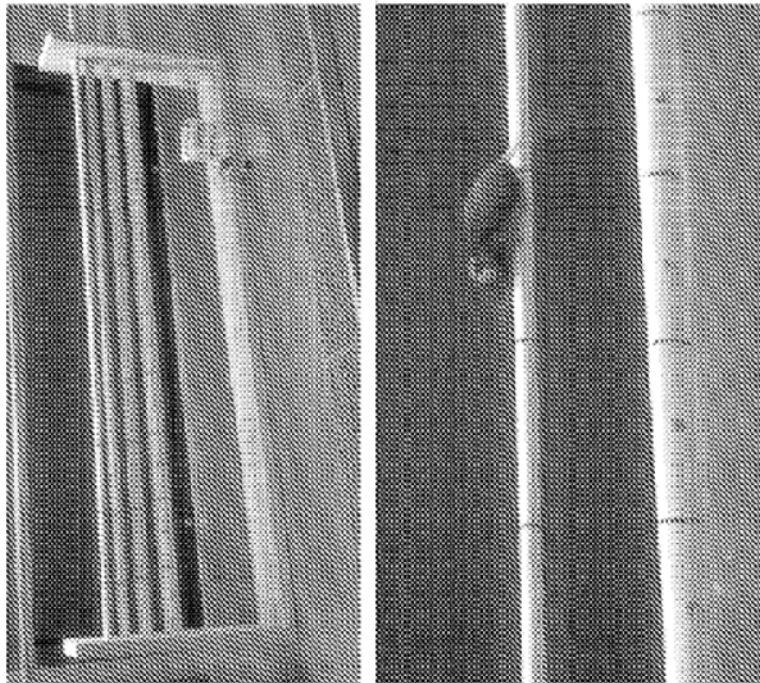


FIG. 4



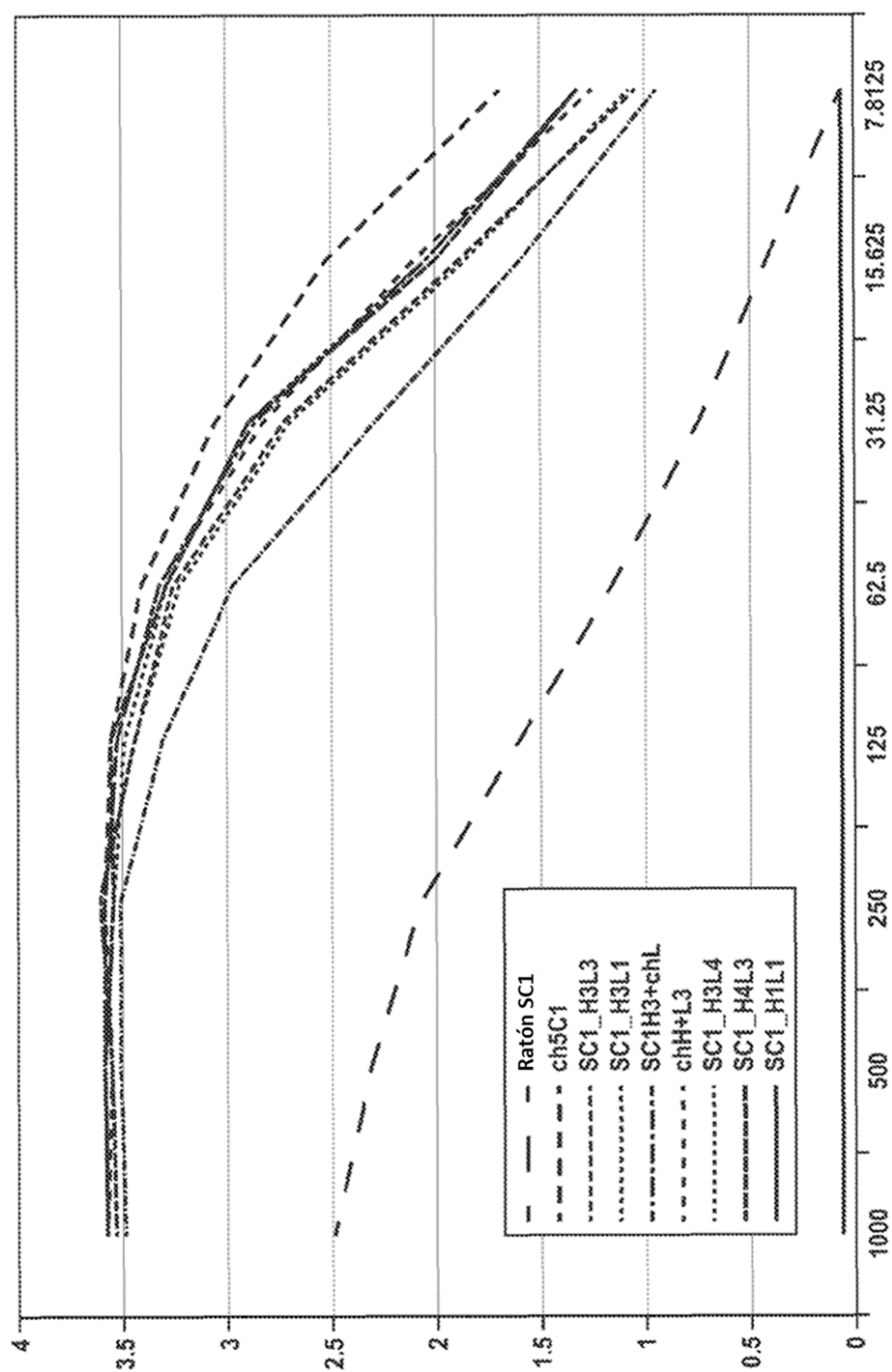


FIG. 5

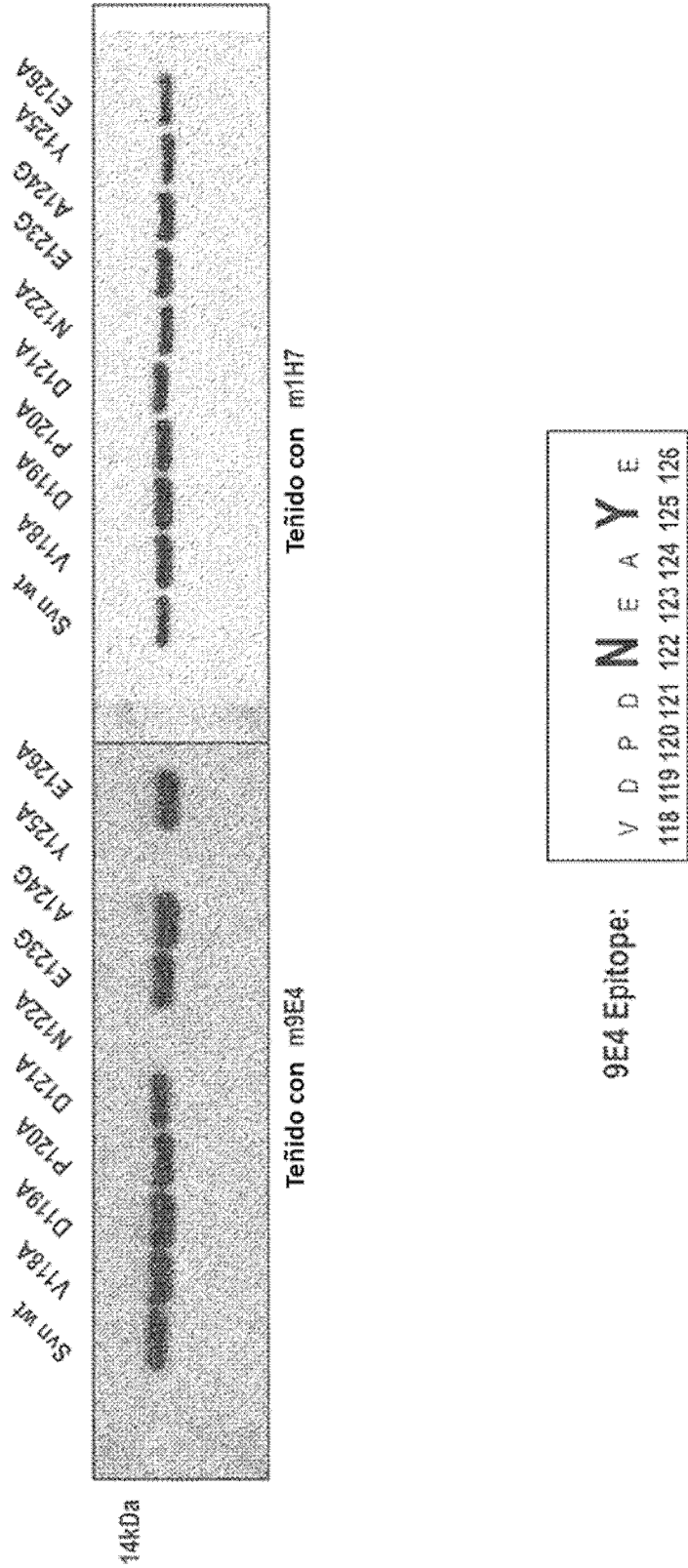
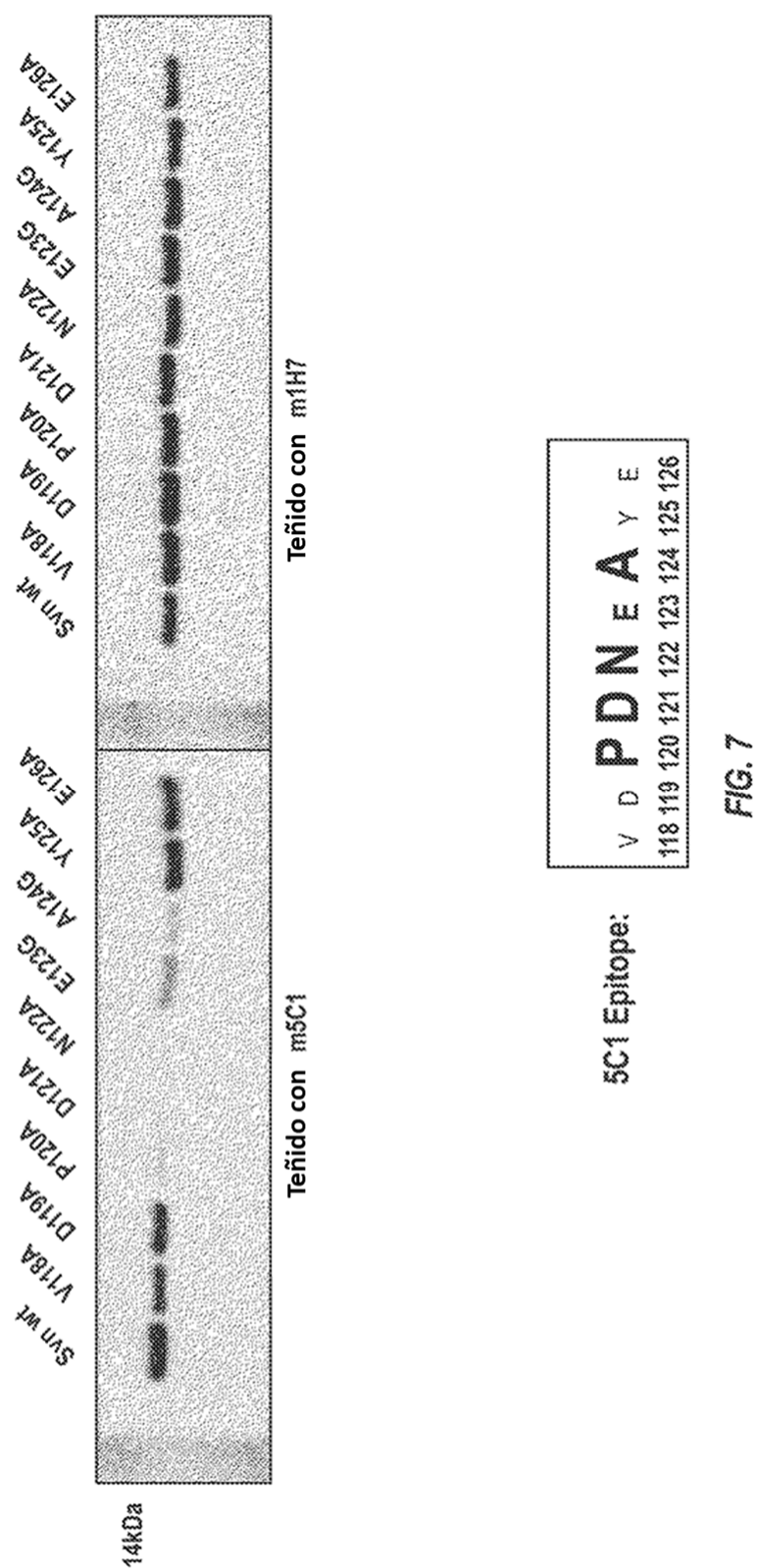
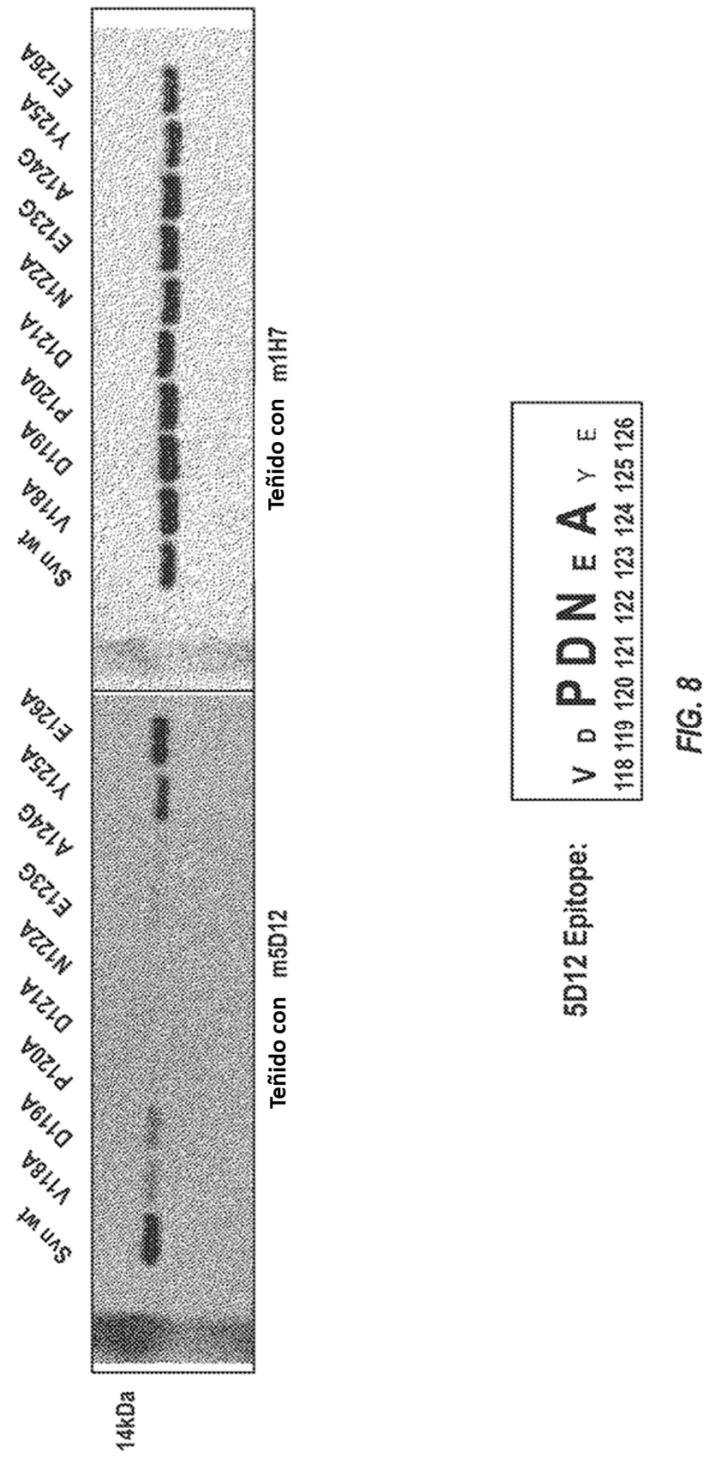


FIG. 6





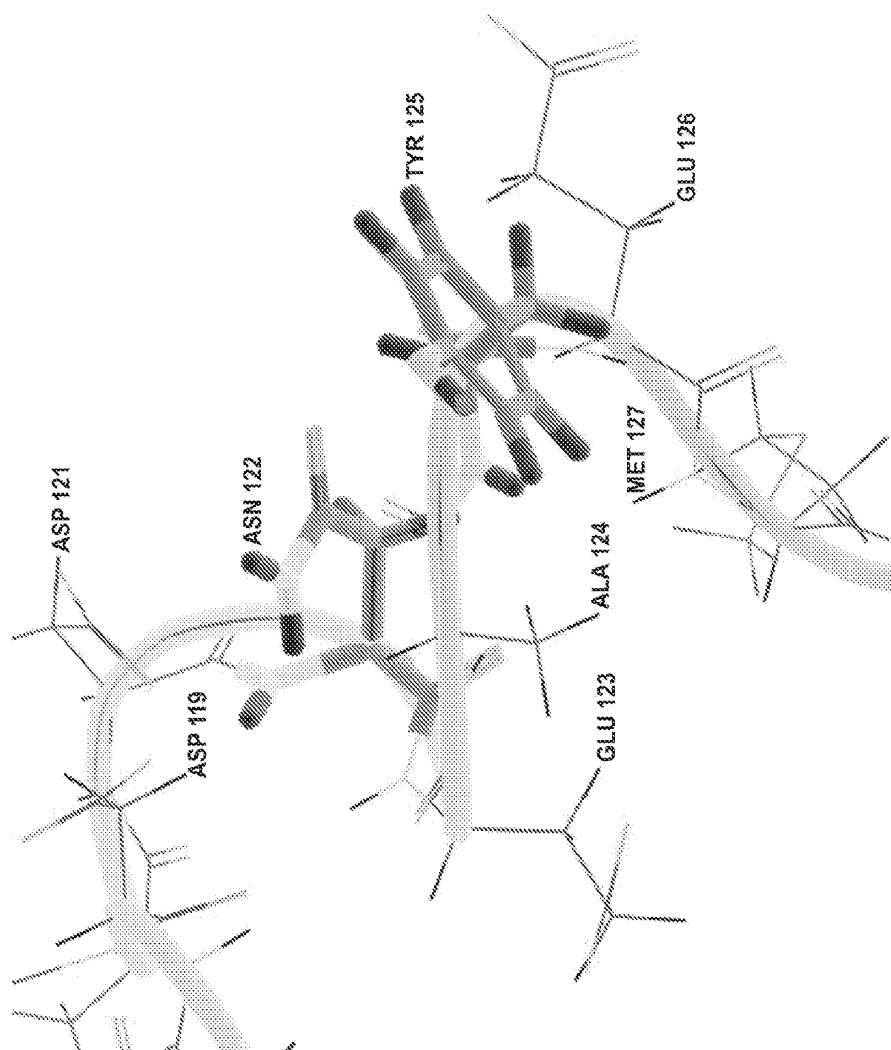


FIG. 9