

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 133**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2017** **PCT/EP2017/082749**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018** **WO18109058**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2017** **E 17835611 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024** **EP 3555127**

54 Título: **Agentes, usos y métodos**

30 Prioridad:

**16.12.2016 DK PA201600769**

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

**21.03.2025**

73 Titular/es:

**H. LUNDBECK A/S (100.00%)**

**Ottiliavej 9  
2500 Valby, DK**

72 Inventor/es:

**KALLUNKI, PEKKA;  
FOG, KARINA y  
STAVENHAGEN, JEFFREY B.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

### Observaciones:

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

ES 3 008 133 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

## Agentes, usos y métodos

- 5 La presente invención se refiere a una nueva clase de anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la alfa-sinucleína, así como a métodos para utilizar estas moléculas y sus fragmentos de unión a la alfa-sinucleína en el tratamiento y diagnóstico de las sinucleinopatías.

## Referencia al listado de secuencias

- 10 La presente solicitud incluye uno o más Listados de Secuencias de conformidad con el 37 C.F.R. 1.821 y siguientes, que se divulgan en soportes legibles por ordenador (nombre del archivo: 1074-WO-PCT\_ST25.txt, creado el 11 de diciembre de 2017, y que tiene un tamaño de 43 kB), archivo que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

## 15 Antecedentes de la invención

- Las sinucleinopatías, también conocidas como enfermedades por cuerpos de Lewy (LBD), se caracterizan por el depósito de agregados proteicos intracelulares visibles microscópicamente en forma de cuerpos de Lewy (LB) y/o neuritas de Lewy, cuyo componente principal es la proteína alfa-sinucleína (Jellinger, *Mov Disord.* Enero de 2012;27(1):8-30; McKeith et al., *Neurology* (1996) 47:1113-24). Las sinucleinopatías incluyen la enfermedad de Parkinson (incluidas las formas idiopáticas y hereditarias de la enfermedad de Parkinson) y la enfermedad por cuerpos de Lewy difusa (DCL) (también conocida como demencia por cuerpos de Lewy (DCL), variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV), enfermedad combinada de Alzheimer y Parkinson (EP), insuficiencia autonómica pura y atrofia multisistémica (AMS; p. ej., atrofia olivopontocerebelosa, degeneración estriatonigral y síndrome de Shy-Drager)). Las sinucleinopatías presentan con frecuencia degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal, responsable de los principales déficits motores en el parkinsonismo (rigidez, bradicinesia, temblor en reposo), pero también hay una presencia generalizada de cuerpos de Lewy y neuritas distróficas de Lewy en el sistema nervioso central, periférico y autónomo y en regiones cerebrales y otros órganos asociados con disfunciones no motoras, como la demencia y los déficits del sistema nervioso autónomo. Se cree que varios de los signos y síntomas no motores preceden a los síntomas motores en la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías. Entre estos primeros signos se 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 sinucleinopatías siguen siendo una causa frecuente de trastornos del movimiento y deterioro cognitivo en la población de edad avanzada (Galasko et al., *Arch. Neurol.* (1994) 51:888-95).

- Se considera que el aumento y la alteración de los patrones de disparo en el núcleo subtalámico (NST) contribuyen a los síntomas de la EP y la descarga del NST en el estado parkinsoniano está fuertemente sincronizada con la actividad oscilatoria cortical (Shimamoto et al., *J Neurosci.* 24 de abril de 2013;33(17):7220-33). En los pacientes con EP, las neuronas del NST presentan patrones de disparo oscilatorio alterados en los intervalos theta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz) y beta (12-30 Hz) (Levy et al., *Brain.* 2002; 125:1196-1209), y una sincronización exagerada con las unidades del NST vecinas y con los potenciales de campo local (LFP) del NST en el intervalo beta (Moran et al., *Brain.* 2008;131:3395-3409). De forma similar a la EP humana, en modelos animales de EP se han observado alteraciones significativas en los patrones de disparo en el NST, por ejemplo, en el sentido de que el porcentaje de neuronas con un patrón de disparo regular disminuyó, mientras que aquellos con patrones irregulares, mixtos o de ráfaga aumentaron (Ryu et al *Neurosci Lett.* 2011; Nov 14;505(2):113-8). El impulso optogénico en las fibras aferentes del NST con estimulación de alta frecuencia mejoró de forma robusta y reversible los síntomas de la EP, medidos por comportamientos rotacionales (Gradinaru et al., *Science* 2009; 17 de abril;324(5925):354-9). Del mismo modo, la estimulación cerebral profunda del NST puede revertir los síntomas de la EP en modelos animales (Li et al., 2012) y en pacientes humanos (revisado en Hickey y Stacy *Front Neurosci.* 2016; 28 de abril;10:173).

- La alfa-sinucleína es miembro de una familia de proteínas que incluye la beta y la gamma-sinucleína y la sinoretina. La alfa-sinucleína se expresa en estado normal asociada a las sinapsis y se cree que desempeña un papel en la regulación de la liberación de vesículas sinápticas, afectando así a la comunicación neuronal, la plasticidad, el aprendizaje y la memoria.

- Varios estudios han relacionado la alfa-sinucleína con un papel central en la patogénesis de la EP. La proteína puede agregarse para formar fibrillas insolubles intracelulares en condiciones patológicas. Por ejemplo, la sinucleína se acumula en los LB (Spillantini et al., *Nature* (1997) 388:839-40; Takeda et al., *J. Pathol.* (1998) 152:367-72; Wakabayashi et al., *Neurosci. Lett.* (1997) 239:45-8). Las mutaciones en el gen de la alfa-sinucleína, así como las duplicaciones y triplicaciones del gen, coexisten con formas familiares raras de parkinsonismo (Kruger et al., *Nature Gen.* (1998) 18:106-8; Polymeropoulos, et al., *Science* (1997) 276:2045-7).

- Un hallazgo importante ha sido que la alfa-sinucleína puede secretarse al líquido extracelular y estar presente en el plasma y el líquido cefalorraquídeo (LCR). Varios estudios, por ejemplo de Pacheco et al. (2015) y otros (Pacheco et al *J Neurochem.* marzo de 2015;132(6):731-4;Conway et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97:571-576; Volles et al., *J. Biochem.* 42:7871-7878, 2003) han sugerido que la sinucleína extracelular desempeña un papel

patogénico en el cerebro. Demostraron que los oligómeros extracelulares de alfa-sinucleína son neurotóxicos para las membranas plasmáticas de las neuronas cerebrales. Otra hipótesis intrigante basada en los datos de la secreción de sinucleína es que una propagación de tipo prion de la alfa-sinucleína subyace a la progresión de la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías (Lee et al. 2014, Nat Rev Neurol. febrero de 2014;10(2):92-8; Hansen y Li 2012, Trends Mol Med. mayo de 2012;18(5):248-55). Estos hallazgos han suscitado la esperanza de que la sinucleína extracelular pueda ser objeto de inmunoterapia (Vekrellis et al. 2011, Lancet Neurol. noviembre de 2011;10(11):1015-25).

Se ha demostrado que los autoanticuerpos naturales contra la alfa-sinucleína están presentes tanto en pacientes con EP como en controles sanos. A veces no hay diferencias significativas entre estos grupos (Smith et al. 2012, PLoS One. 2012;7(12):e52285; Maetzler et al. 2014, PLoS One. 21 de febrero de 2014;9(2):e88604, Papachroni et al. 2007 J Neurochem. mayo de 2007;101(3):749-56 y Woulfe et al. 2002, Neurology. 14 de mayo de 2002;58(9):1435-6), a veces aumentan los niveles de autoanticuerpos contra la alfa-sinucleína en la EP (Gruden et al. 2011, J Neuroimmunol. abril de 2011;233(1-2):221-7, Gruden et al. 2012, Neuroimmunomodulation. 2012;19(6):334-42 y Yanamandra 2011, PLoS One. 25 de abril de 2011;6(4):e18513) o disminuyen los autoanticuerpos frente a alfa-sinucleína en pacientes con EP en comparación con controles sanos (Besong-Agbo et al 2013, Neurology. 8 de enero de 2013;80(2):169-75). La posibilidad de que los autoanticuerpos anti-alfa-sinucleína circulantes puedan desempeñar una función protectora con respecto a la agregación de la alfa-sinucleína se sugirió muy pronto tras el hallazgo de los autoanticuerpos (Woulfe et al. 2002, Neurology. 14 de mayo de 2002;58(9):1435-6).

La sobreexpresión de alfa-sinucleína en ratones transgénicos imita algunos aspectos patológicos de la enfermedad por cuerpos de Lewy. En los últimos diez años se han generado varias líneas transgénicas diferentes de ratones que sobreexpresan alfa-sinucleína (descritas en las revisiones: Koehler et al 2014, PLoS One. 31 de mayo de 2013;8(5):e64649; Fleming y Chesselet, 2006, Behav Pharmacol. septiembre de 2006;17(5-6):383-91; Springer y Kahle 2006, Curr Neurol Neurosci Rep. septiembre de 2006;6(5):432-6). Las líneas de ratones con promotores de Thy-1 y PDGFbeta desarrollan déficits motores y cognitivos y se han utilizado para demostrar un efecto neuroprotector de los anticuerpos dirigidos contra la alfa-sinucleína *in vivo*. Sin embargo, ninguna de las líneas transgénicas tiene una degeneración robusta de las neuronas dopaminérgicas, y a menudo los fenotipos motores son impulsados por la expresión en las neuronas motoras, que normalmente no degeneran en la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto, no está claro si el resultado positivo de un posible tratamiento modificador de la enfermedad está mediado por efectos en las neuronas dopaminérgicas o en otras neuronas del sistema nervioso central.

Un hallazgo sólido en los modelos de ratones transgénicos ha sido que la sobreexpresión crónica de alfa-sinucleína humana deteriora la función sináptica. Mediante estudios en sistemas *in vitro* e *in vivo* se demostró que la sobreexpresión de alfa-sinucleína humana de tipo silvestre (ts) deterioraba la transmisión sináptica en el hipocampo (Nemani et al. 2010, Neuron. 14 de enero de 2010;65(1):66-79; Paumier et al. 2013, PLoS One. 1 de agosto de 2013;8(8):e70274). Esto se demostró en la región CA1 del hipocampo, donde ambos estudios hallaron una reducción de la transmisión sináptica basal. Se supuso que el mecanismo subyacente era la acumulación intracelular de alfa-sinucleína que conducía a una liberación sináptica disfuncional. Sin embargo, los recientes descubrimientos sobre la secreción de alfa-sinucleína en el espacio extracelular de las sinapsis y los efectos tóxicos de los oligómeros de alfa-sinucleína en la función sináptica abren la posibilidad de un papel de la alfa-sinucleína extracelular en la disfunción sináptica y, como tal, de la capacidad de los anticuerpos terapéuticos para rescatar el déficit.

El uso de vectores virales para sobreexpresar la alfa-sinucleína representa una forma importante de modelar la EP en roedores porque esta estrategia produce una degeneración progresiva relativamente rápida de las neuronas nigroestriatales, una característica aún no reproducida por mutaciones genéticas en ratones o ratas (Kirik y Bjorklund, 2003, Trends Neurosci. julio de 2003;26(7):386-92). Además, el suministro viral de genes reveló la capacidad de la alfa-sinucleína ts para inducir la patología nigroestriatal (Kirik et al. 2002, J Neurosci. 1 de abril de 2002;22(7):2780-91), un hallazgo que concuerda con la evidencia en formas familiares de EP con duplicaciones y triplicaciones de alfa-sinucleína (Lee y Trojanowski, 2006, Neuron. 5 de octubre de 2006;52(1):33-8). En un estudio, se ha demostrado que los anticuerpos de cabra contra el N-terminal de la alfa-sinucleína protegieron contra la muerte de células dopaminérgicas y mejoraron los déficits de comportamiento en un modelo de rata basado en AAV-alfa-sinucleína de la enfermedad de Parkinson (Shahaduzzaman et al 2015, PLoS One. 6 de febrero de 2015;10(2):e0116841).

Recientemente se ha demostrado que la propagación de la patología de la alfa-sinucleína, similar a la de los priones, desarrolla la patología de la alfa-sinucleína y también la muerte de las células dopaminérgicas (Luk et al. 2012, Science. 16 de noviembre de 2012;338(6109):949-53). Este modelo se ha utilizado para demostrar que los anticuerpos contra la alfa-sinucleína son capaces de mejorar la patología (Tran et al. 2014, Cell Rep. 26 de junio de 2014;7(6):2054-65). En este modelo, el tratamiento con anticuerpos fue capaz de reducir la acumulación de alfa-sinucleína fosforilada en varias regiones cerebrales, incluidas las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, y reducir el desarrollo del déficit motor.

Además de las mutaciones, el corte y empalme alternativo del gen de la alfa-sinucleína y las modificaciones postraduccionales de la proteína, como la fosforilación, la ubiquitinación, la nitración y el truncamiento, pueden crear formas proteicas de alfa-sinucleína con mayor capacidad para formar formas agregadas y/o tóxicas de alfa-sinucleína (Beyer y Ariza, Mol Neurobiol. abril de 2013;47(2):509-24). Sin embargo, aún se desconoce la especie patológica precisa de la alfa-sinucleína. Se han asociado a la toxicidad varias especies mal plegadas/agregadas/secretadas, desde oligómeros a fibrillas, y diferentes modificaciones postraduccionales, pero no hay consenso sobre cuál es la más importante, si es que existe una única especie tóxica. Recientemente se ha informado de la existencia de niveles alterados de isoformas de corte y empalme de  $\alpha$ -sin en pacientes que padecen EP, DCL y AMS (Cardo et al. Neurosci Lett 2014; 562(6): 45-49, y Brudek et al. J Neurochem 2016. Enero;136(1):172-85). El mayor potencial de agregación de la isoforma 112-alfa-sinucleína (Manda et al. PLoS One, 3 de junio de 2014;9(6)) junto con el aumento de sus niveles podría desempeñar un papel en la fisiopatología de la EP o patologías relacionadas, como la MSA.

En general, la acumulación de alfa-sinucleína con alteraciones morfológicas y neurológicas similares en modelos animales tan diversos como humanos, ratones y moscas sugiere que esta molécula es fundamental en la patogénesis de las enfermedades por cuerpos de Lewy.

Varios anticuerpos diferentes contra la alfa-sinucleína han demostrado tener efecto terapéutico en modelos preclínicos en animales. Tanto un anticuerpo dirigido a un epítipo que implica a los restos 91-99 de alfa-sinucleína como anticuerpos dirigidos a un epítipo que implica a los restos 118-126 de alfa-sinucleína han demostrado tener un efecto sobre los déficits motores y cognitivos en ratones transgénicos (Games et al. 2014, J Neurosci. 9 de julio de 2014;34(28):9441-54). El más avanzado de estos anticuerpos es un anticuerpo humanizado basado en el anticuerpo monoclonal de ratón 9E4, que se dirige a un epítipo que implica a los restos 118-126 de alfa-sinucleína, y que se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase I. Un anticuerpo C-terminal 274 que se dirige a un epítipo que implica a los restos 120-140 de alfa-sinucleína (Bae et al. 2012, J Neurosci. 26 de septiembre de 2012;32(39):13454-69) también demostró tener un efecto en un modelo preclínico sobre la propagación de la patología de célula a célula. Además, se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos a especies conformacionales como los oligómeros y las fibrillas de alfa-sinucleína pueden, al menos, reducir los niveles de estas especies de alfa-sinucleína presumiblemente tóxicas (Lindström et al. 2014, Neurobiol Dis. septiembre de 2014;69:134-43 y Spencer et al. 2014, Mol Ther. octubre de 2014;22(10):1753-67). También se demostró que estos anticuerpos conformacionales que reducen los niveles de oligómeros de alfa-sinucleína *in vivo*, como el mab47, se dirigen a epítopos en el C-terminal de la alfa-sinucleína, desde el aminoácido 121-125 (documento US20120308572). Otros anticuerpos conformacionales, específicos de fibrillas y oligómeros también se dirigen a secuencias C-terminales (Vaikath et al. Neurobiol Dis. 2015;79:81-99). El documento WO2007/012061 describe el anticuerpo 8A5, que se une al extremo C-terminal de la alfa-sinucleína humana. El documento KR20120090612 y E. Bae et al (The Journal of Neuroscience, 26 de septiembre de 2012, 32(39):13454-13469) divulgan un anticuerpo IgG2a específico contra la alfa-sinucleína, el anticuerpo 274, que es capaz de reducir la transmisión de célula a célula de los agregados de alfa-sinucleína.

La presente invención se refiere a un anticuerpo de ratón 2E6 (y versiones humanizadas, quiméricas y con la afinidad madurada) que se une a la alfa-sinucleína de longitud completa. El anticuerpo fue superior en un cribado funcional entre 50 anticuerpos monoclonales contra la alfa-sinucleína y resultó ser sorprendentemente eficaz en la prevención de la acumulación celular de fibrillas de alfa-sinucleína. También se descubrió que era sorprendentemente bueno en la unión a la alfa-sinucleína patológica del cerebro humano enfermo, uniéndose a muchas más especies truncadas o de corte y empalme alternativo de alfa-sinucleína que otro anticuerpo contra la alfa-sinucleína 9E4 (Masliah et al., PLoS One, 2011, 29 de abril;6(4) - secuencia publicada en la patente US 8609820). El anticuerpo 2E6 puede prevenir la agregación de alfa-sinucleína *in vitro* y puede disolver agregados preformados de alfa-sinucleína. Las formas agregadas de alfa-sinucleína pueden formar un inmunocomplejo con el anticuerpo y la presencia del anticuerpo 2E6 aumenta la captación de estos inmunocomplejos a través de la fagocitosis mediada por Fc. El anticuerpo 2E6 se une a las fibrillas y las bloquea o neutraliza, impidiendo que se formen nuevos agregados de alfa-sinucleína en un modelo celular. *In vivo*, el anticuerpo, tras una única dosis periférica, puede revertir las alteraciones en el disparo neuronal en ratones transgénicos para alfa-sinucleína, y administrado de forma crónica durante varios meses, el anticuerpo reduce el efecto de la sobreexpresión de alfa-sinucleína en la alteración de la liberación vesicular. Este efecto puede traducirse en una mejora de la transmisión sináptica en pacientes humanos con EP tratados con este anticuerpo.

Finalmente, mostramos en un modelo de Parkinson de rata con alfa-sinucleína, tras un tratamiento crónico de dos meses, que el anticuerpo 2E6 puede revertir el disparo irregular patológico de las neuronas en el NST. Dado que la actividad patológica del NST desempeña un papel primordial en los síntomas de la EP, revertir los cambios patológicos en la vía cortico-subtalámica es importante para mejorar los déficits motores.

El anticuerpo de ratón original se ha humanizado y madurado por afinidad para generar un anticuerpo terapéutico para el tratamiento de las alfa-sinucleinopatías. El anticuerpo humanizado, así como las formas con la afinidad madurada, conservan las mismas funciones de unión y celulares que el anticuerpo original.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un anticuerpo de ratón denotado m2E6, ch2E6 quimérico, así como a 3 formas humanizadas (2E6-HLD1, 2E6-HLD2 y 2E6-HLD3) y formas con la afinidad madurada de HLD1: 7A10, 5A1, 9D7, 9G11, 7C4, L3, 8D9, 9C12 o 6B6 para crear anticuerpos de mayor afinidad.

Los anticuerpos monoclonales específicos se describen en las reivindicaciones 1-9 del presente documento.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La fig. 1 muestra la cascada de cribados. Se inmunizó a tres ratones con diferentes formas agregadas de alfa-sinucleína. Se examinaron los ratones en busca de títulos elevados y se generaron líneas celulares monoclonales. Mediante un ELISA de alfa-sinucleína se recuperaron 50 clones positivos de ~1000 pocillos. Se examinó la capacidad de los cincuenta anticuerpos monoclonales que reconocen la alfa-sinucleína para prevenir la acumulación de alfa-sinucleína fibrilada en células SK-mel5 (ejemplo 1). Sorprendentemente, solo unos pocos (cuatro de 50) anticuerpos contra la alfa-sinucleína fueron capaces de inhibir la acumulación de alfa-sinucleína fibrilada. Se seleccionó m2E6 como el anticuerpo más eficiente y posteriormente perfilado en modelos celulares y animales de EP. Además, m2E6 se humanizó a 2E6-HLD-1, 2 y 3 (ejemplo 2) y se maduró la afinidad de 2E6-HLD1 a HLD1-7A10. Los datos cinéticos de unión de todas las variantes frente a la alfa-sinucleína figuran en las tablas 5, 6 y 7) (ejemplo 2).

La fig. 2 muestra los datos de ELISA del mapeo de epítomos del anticuerpo m2E6 a los péptidos de la secuencia de aminoácidos 136-140 de la alfa-sinucleína (los otros péptidos no enlazantes no se muestran). El panel superior muestra que la secuencia peptídica YEPEA es necesaria para la unión completa del anticuerpo m2E6. El panel central muestra los mismos péptidos en los que el resto de tirosina se sustituye por nitrotirosina (que aparece como número 5 en la secuencia). La nitración de la tirosina 136 suprimió la unión del anticuerpo al péptido. El panel inferior muestra la mutagénesis de barrido de alanina doble de aminoácidos seleccionados. Las dobles sustituciones de alanina presentes en la matriz apuntan hacia un papel crítico de los penúltimos aminoácidos P138, E139 y A 140. (Ejemplo 3).

La fig. 3 muestra la diferencia en el contenido de alfa-sinucleína y alfa-sinucleína fosforilada (Ser129) entre cinco homogeneizados cerebrales de pacientes con demencia por cuerpos de Lewy (DCL) y controles sanos de edad coincidente (CTR). Estos homogeneizados se utilizan para fraccionamientos posteriores para enriquecer formas patológicas de alfa-sinucleína, es decir, agregada y fosforilada en Ser129 (ejemplo 4).

La fig. 4 muestra la inmunoprecipitación de la alfa-sinucleína de la fracción soluble (S1) y las fracciones enriquecidas en formas patológicas (P1 y P2) de alfa-sinucleína de pacientes con DCL (carriles con texto en negrita) y controles sanos de edad coincidente (CTR) (carriles con texto en gris) con anticuerpos m2E6 y las versiones humanizadas de m2E6; 2E6-HLD1, 2 y 3. La figura muestra que m2E6 y las variantes humanizadas 2E6-HLD1-3 son notablemente diferentes del anticuerpo de alfa-sinucleína de comparación 9E4 (tanto de ratón como humanizado). m2E6 y las variantes humanizadas son capaces de inmunoprecipitar versiones truncadas o empalmadas alternativamente de alfa-sinucleína, mientras que 9E4 no lo hace. Además, m2E6 y las variantes humanizadas reconocen las formas patológicas agregadas de alfa-sinucleína en las fracciones P1 y P2, mientras que 9E4 no lo hace (ejemplo 4).

La fig. 5 muestra la inhibición de la agregación de alfa-sinucleína *in vitro* por m2E6. Cuando la alfa-sinucleína monomérica se incubaba en agitación a 37 °C durante varios días, se produce un aumento de la fluorescencia de la tioflavina que indica la agregación de la alfa-sinucleína en amiloide (curva de control). Una cantidad creciente de m2E6 mezclada con alfa-sinucleína monomérica muestra una inhibición dependiente de la dosis en el aumento de la fluorescencia de tioflavina (ejemplo 5).

La fig. 6 muestra la disociación de las fibrillas de alfa-sinucleína por m2E6. Las fibrillas de alfa-sinucleína preformadas se trataron con ultrasonidos para romperlas en microfibrillas más pequeñas. El anticuerpo m2E6 se añadió en diferentes proporciones molares a las fibrillas tratadas con ultrasonidos. Las fibrillas de control sin anticuerpo (sin ac) o las fibrillas incubadas con un anticuerpo de control del isotipo que no se une a la alfa-sinucleína (B12) muestran una extensa red fibrilar visualizada por microscopía electrónica. Las fibrillas incubadas con diferentes concentraciones de m2E6 muestran una disminución dependiente de la dosis de fibrillas de mayor tamaño.

La fig. 7 muestra que m2E6 se une a las fibrillas de alfa-sinucleína en el medio e inhibe su acumulación en células no fagocíticas. A) Inmunoprecipitación de fibrillas de alfa-sinucleína añadidas a medios de cultivo celular. Esto demostró que m2E6 era capaz de reconocer y extraer las fibrillas de alfa-sinucleína del medio, mientras que los anticuerpos de control B12 (IgG humana no reactiva) y otro anticuerpo contra alfa-sinucleína 5G4 (de Roboscreen) no lo hacían.

B) Transferencia de Western de células SHSY-5Y tratadas con fibrillas de alfa-sinucleína y anticuerpos durante 24 horas, luego lavadas y lisadas. Esto demostró que 2E6-HLD1 redujo la cantidad de fibrillas acumuladas en las células, mientras que el anticuerpo B12 no lo hizo.

C) Imagen fluorescente automatizada de la acumulación de fibrillas de alfa-sinucleína en células SKmel5, co-incubación durante 24 h con fibrillas, m2E6 y péptidos de alfa-sinucleína según se indica. Esto demostró que m2E6 reduce la acumulación de fibrillas en las células. Este efecto es específico, ya que podría inhibirse por el péptido 126-140 que cubre el epítipo de m2E6, pero no por un péptido fuera del epítipo (aminoácidos 113-120).

D) Acumulación de fibrillas de alfa-sinucleína en células SKmel5, 24 horas, dosis-respuesta de un anticuerpo 2E6-HLD1 con la afinidad madurada, 2E6\_7A10 de 0,1 a 10 µg/ml. Por tanto, 2E6\_7A10 se une a las fibrillas de alfa-sinucleína en solución y reduce su acumulación en las células de forma dependiente de la dosis.

Los asteriscos (\*\*\*) indican un valor *p* inferior a 0,0001 en una prueba de la *t* bilateral en comparación con las fibrillas únicamente (ejemplo 6).

La fig. 8 muestra que m2E6 se une a la alfa-sinucleína fibrilar producida en mamíferos en medios e inhibe su acumulación en neuronas corticales primarias.

1. A) muestra que todas las variantes 2E6 arrastraron los oligómeros de alfa-sinucleína del medio, tanto la versión completa como algunas versiones truncadas (bandas de bajo peso molecular más débiles). El anticuerpo de comparación m9E4 también extrajo la alfa-sinucleína de longitud completa, in embargo, la versión humanizada de 9E4 (patente estadounidense 20080175838) fue mucho menos eficaz en la inmunoprecipitación de las formas truncadas y de la forma completa de 14 kDa de alfa-sinucleína, lo que indica una menor unión a la proteína de mamífero en el medio. Otro anticuerpo de comparación (12F4 de Biogen, documento US 8.940.276) solo dio una banda débil que no era muy diferente del control B12.

2. B) muestra que la incubación con el anticuerpo m2E6 conduce a una menor acumulación de agregados intracelulares de alfa-sinucleína en neuronas corticales primarias.

3. C) y D) muestran (en dos lecturas del mismo experimento) que la co-incubación de las PFF de Sin-BAP (fibrillas preformadas =PFF- la alfa-sinucleína de mamíferos se convierte en fibrillas, que se tratan con ultrasonidos para producir PFF, precursores o semillas de fibrillas completas) con B12 no reactiva o con el anticuerpo comparador 9E4 no cambió la acumulación de PFF Sin-BAP en las células, mientras que el tratamiento con m2E6 o 2E6-HLD1 redujo el nivel de acumulación al nivel de fondo. Las células tratadas únicamente con PFF de Sin-BAP mostraron alrededor de 4,5 puntos por célula (figura 8D); de nuevo B12 o h9E4 no cambiaron esto significativamente. El tratamiento con m2E6, h2E6-HLD2 o h2E6-HLD3 redujo significativamente el nivel de acumulación (a unos 3 puntos por célula) y 2E6-HLD1 mostró una tendencia hacia un menor número de puntos (ejemplo 6).

La fig. 9 muestra que 2E6 se une a las fibrillas de alfa-sinucleína en los medios condicionados e inhibe la transferencia de célula a célula.

1. A) Inmunoprecipitación de medios condicionados de células SK-mel5 tratadas con fibrillas de alfa-sinucleína durante 24 horas. Se recogieron los medios y se utilizaron para la IP (inmunoprecipitación). 2E6 inmunoprecipitó eficientemente la alfa-sinucleína.

2. B) Tras la adición de fibrillas de alfa-sinucleína a los medios, se cuantificó el porcentaje de células que acumulaban fibrillas intracelulares de alfa-sinucleína en la placa "alimentadora" como % de células que contenían puntos de alfa-sinucleína, C) se transfirieron los medios de las células alimentadoras a la placa receptora y, de nuevo, se cuantificó el porcentaje de células con fibrillas intracelulares de alfa-sinucleína en la placa "receptora". B) y C) muestra que m2E6 reduce significativamente el número de células con agregados de alfa-sinucleína (puntos) tanto en la placa "alimentadora" como en la "receptora". El anticuerpo de comparación 1H7 (documento WO2005047860) no tuvo efecto en ninguna de las placas. Un anticuerpo de control (B12) tampoco tuvo efecto. (Ejemplo 6).

La fig.10 muestra que 2E6-HLD1 inhibe de forma dependiente de la dosis la siembra de alfa-sinucleína endógena. Se transfectaron células HEK293 con un plásmido que expresaba alfa-sinucleína con un marcador de HA, seguido de la transfección de fibrillas de alfa-sinucleína y la adición de diversas concentraciones de 2E6-HLD1. Tras 48 horas, los lisados celulares se fraccionaron mediante ultracentrifugación en fracciones solubles en Tritón y SDS y se analizaron mediante inmunotransferencia. La alfa sinucleína con marcador de HA corre hasta valores superiores a 17 KD. La proporción de fosfo-sinucleína y beta-actina se utilizó para cuantificar la alfa-sinucleína insoluble (fracción soluble en SDS).

1. A. Transferencia de Western de la fracción soluble en SDS de células HEK293. La imagen superior muestra una inmunotransferencia utilizando el anticuerpo 4B12, que detecta la alfa-sinucleína humana, y el anticuerpo para la beta-actina. La imagen inferior muestra la inmunotransferencia utilizando el anticuerpo Ab51253, que detecta la fosfo-sinucleína. El tratamiento con 2E6-HLD1 muestra una inhibición dependiente de la dosis de la agregación y fosforilación de la alfa-sinucleína en comparación con el anticuerpo de control, B12.

2. B. Cuantificación de la transferencia de Western sobre la fosfo-sinucleína de la figura 10A. 2E6-HLD1 inhibió la conversión de la alfa-sinucleína soluble en la fracción insoluble de forma dependiente de la dosis (ejemplo 6).

La fig. 11 muestra alteraciones en la transmisión sináptica basal y en la facilitación de impulsos pareados en la sinapsis colateral de Schaffer - CA1 en el hipocampo de ratones transgénicos F28-snca y de ratones de control de edad coincidente. Los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) se evocaron mediante un único estímulo aplicado al colateral de Schaffer, y la transmisión sináptica basal se evaluó midiendo la pendiente de los fEPSP en función de la intensidad de estimulación (a). La plasticidad sináptica a corto plazo se evaluó mediante la inducción de la facilitación de pulso emparejado (b), en la que se aplicó un estímulo doble con un intervalo entre estímulos variable, y se midió la relación entre la pendiente del segundo fEPSP y el primer fEPSP. Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA bilateral con medidas repetidas seguido de la prueba de la *t* de Bonferroni (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) (ejemplo 7).

Las figuras 12 y 13 muestran el efecto agudo de 9E4 (15 mg/kg i.p.) sobre las alteraciones en la transmisión sináptica basal y la facilitación de impulsos emparejados en la sinapsis colateral de Schaffer-CA1 en el hipocampo de ratones transgénicos F28-snca.

En la figura 12 se evocaron potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) mediante un único estímulo aplicado al colateral de Schaffer, y se evaluó la transmisión sináptica basal midiendo la pendiente de los fEPSP en función de la intensidad de la estimulación. 9E4 fue capaz de revertir parcialmente el déficit

En la figura 13 se evaluó la plasticidad sináptica a corto plazo mediante la inducción de la facilitación de pulso emparejado, en la que se aplicó un estímulo doble con un intervalo entre estímulos variable, y se midió la relación entre la pendiente de la segunda fEPSP y la primera fEPSP. 9E4 no fue capaz de revertir el déficit.

Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA bilateral con medidas repetidas seguido de la prueba de la *t* de Bonferroni (ejemplo 7).

La fig. 14 muestra el efecto beneficioso agudo de m2E6 (15 mg/kg i.p.) sobre las alteraciones en la transmisión sináptica basal en la sinapsis colateral de Schaffer-CA1 en el hipocampo de ratones transgénicos F28-snca.

En la figura 14 se evocaron potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) mediante un único estímulo aplicado al colateral de Schaffer, y se evaluó la transmisión sináptica basal midiendo la pendiente del fEPSP en función de la intensidad de estimulación. m2E6 fue capaz de revertir completamente los déficits.

En la figura 15 se evaluó la plasticidad sináptica a corto plazo mediante la inducción de la facilitación de pulso emparejado, en la que se aplicó un estímulo doble con un intervalo entre estímulos variable, y se midió la relación entre la pendiente de la segunda fEPSP y la primera fEPSP. m2E6 no tuvo ningún efecto agudo sobre la PPF alterada en ratones transgénicos F28-snca (sin embargo, se observó un efecto tras el tratamiento crónico).

Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA bilateral con medidas repetidas seguido de la prueba de la *t* de Bonferroni (ejemplo 7).

Las figuras 16 y 17 muestran un efecto dependiente de la dosis aguda de m2E6 en la reversión del deterioro de la transmisión sináptica basal. Efecto de m2E6 a 5 (figura 16) y 2,5 (figura 17) mg/kg i.p. sobre las alteraciones de la transmisión sináptica basal en la sinapsis colateral de Schaffer-CA1 en el hipocampo de ratones transgénicos F28-snca. Los datos muestran un efecto dependiente de la dosis de m2E6 en la reversión del déficit.

Los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) se evocaron mediante un único estímulo aplicado al colateral de Schaffer, y la transmisión sináptica basal se evaluó midiendo la pendiente de los

fEPSP en función de la intensidad de estimulación. Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA bilateral con medidas repetidas seguido de la prueba de la *t* de Bonferroni (ejemplo 7).

La fig. 18 muestra una mayor eficacia a dosis bajas del 2E6 humanizado; 2E6-HLD1 en comparación con ch2E6 quimérico (dominio variable m2E6) en la reversión del deterioro de la transmisión sináptica basal.

Efecto agudo de ch2E6 y 2E6-HLD1, ambos a 2,5 mg/kg i.p. sobre las alteraciones en la transmisión sináptica basal y la facilitación de impulsos pareados en la sinapsis colateral de Schaffer-CA1 en el hipocampo de ratones transgénicos F28-snca. Se evocaron potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) mediante un único estímulo aplicado al colateral de Schaffer, y se evaluó la transmisión sináptica basal midiendo la pendiente de los fEPSP en función de la intensidad de la estimulación. ch2E6 mostró una fuerte tendencia a revertir el deterioro, mientras que la misma dosis baja de la forma humanizada 2E6-HLD1 revirtió completamente el deterioro.

En la figura 19 se evaluó la plasticidad sináptica a corto plazo mediante la inducción de la facilitación de pulso emparejado, en la que se aplicó un estímulo doble con un intervalo entre estímulos variable, y se midió la relación entre la pendiente de la segunda fEPSP y la primera fEPSP. Como se observó con m2E6, 2E6 quimérico no tuvo ningún efecto significativo sobre la PPF alterada en ratones transgénicos F28-snca.

Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA bilateral con medidas repetidas seguido de la prueba de la *t* de Bonferroni (ejemplo 7).

Las figuras 20 y 21 muestran que m2E6 reduce los niveles extracelulares de alfa-sinucleína en ratones que se mueven libremente, mientras que 9E4 no lo hace.

La figura 20 muestra el efecto de la administración sistémica de 2E6 o del isotipo de control 5C9 (15 mg/kg, i.p.) sobre los niveles de  $\alpha$ -sinucleína humana en el hipocampo de ratones transgénicos F28snca en movimiento libre. La  $\alpha$ -sinucleína humana basal se tomó como la media de la concentración de  $\alpha$ -sinucleína humana en dos muestras consecutivas ( $11,9 \pm 2,4$  ng/ml) y se fijó en el 100 % dentro del mismo animal. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; 2E6 frente a anticuerpo de control de isotipo 5C9.

La figura 21 muestra el efecto de la administración sistémica de h9E4 o anti-hel isotipo de control (ambos 15 mg/kg, i.p.) sobre los niveles extracelulares de  $\alpha$ -sinucleína humana en el hipocampo de ratones transgénicos F28snca en movimiento libre. La  $\alpha$ -sinucleína humana basal se tomó como la media de la concentración de  $\alpha$ -sinucleína humana en 2-3 muestras consecutivas ( $7,8 \pm 1,2$  ng/ml) y se fijó en el 100 % dentro del mismo animal. (Ejemplo 8).

La fig. 22 muestra una representación esquemática de la cronología del tratamiento con anticuerpos en el modelo AAV de alfa-sinucleína de rata, las inyecciones virales y las mediciones electrofisiológicas (ejemplo 9).

Las fig. 23 y 24 muestran que el patrón de actividad neuronal en una zona del cerebro, el núcleo subtalámico, cambia en las ratas en las que se sobreexpresa la alfa-sinucleína humana. El tratamiento con m2E6 normaliza el patrón de disparo neuronal anormal.

El patrón de disparo de las neuronas NST en ratas no tratadas con sobreexpresión de GFP o ratas con sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína tratadas con un mlgG1 de control o m2E6 (15 mg/kg i.p., dos veces por semana) durante 8-10 semanas tras la inyección del virus. En la figura 23 se analizó el coeficiente de variación (CV) del intervalo entre espigas mediante un ANOVA unilateral seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni. El tratamiento con m2E6 dio lugar a una tendencia no significativa a la disminución de su ISI CV.

En la figura 24 se analizó la proporción de neuronas que disparan con un patrón de disparo regular, irregular o en ráfagas mediante una prueba de Chi-cuadrado. El tratamiento con m2E6 indujo una normalización significativa de la proporción de neuronas que mostraban los 3 patrones de disparo distintos.

N: número de animales; n: número de neuronas.\*\*, Las ratas tratadas con PBS  $\alpha$ -sinucleína se compararon con las ratas no tratadas con GFP, \*\*  $p < 0,01$ . ▫ m2E6 se comparó con mlgG1 en ratas con sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína, ▫  $p < 0,05$ , ▫▫  $p < 0,01$  (ejemplo 9).

La fig. 25 muestra un efecto beneficioso de m2E6 tras un tratamiento crónico (15 mg/kg i.p. en 16-18 semanas) sobre la facilitación de impulsos pareados en la sinapsis colateral de Schaffer-CA1 en el hipocampo de ratones transgénicos F28-snca.



Tratamiento crónico con m2E6 o una mlgG1 de control (5C9) sobre la facilitación de impulsos emparejados en la sinapsis colateral de Schaffer-CA1 en el hipocampo de ratones transgénicos F28-sncA y ratones de control de edad coincidente. Los potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) se evocaron mediante un único estímulo aplicado al colateral de Schaffer, y la transmisión sináptica basal se evaluó midiendo la pendiente de los fEPSP en función de la intensidad de estimulación. La plasticidad sináptica a corto plazo se evaluó mediante la inducción de la facilitación de pulso emparejado (PPF), en la que se aplicó un estímulo doble con un intervalo entre estímulos variable, y se midió la relación entre la pendiente de la segunda fEPSP y la primera fEPSP. Todos los datos se analizaron mediante un ANOVA bilateral con medidas repetidas seguido de la prueba de la *t* de Bonferroni (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  para Tg-sncA + 5C9 frente a edad coincidente + 5C9;  $\square$   $p < 0,05$ ,  $\blacksquare$   $p < 0,01$ ,  $\blacksquare\blacksquare$   $p < 0,001$  para Tg.sncA + m2E6 frente a Tg-sncA + 5C9). (Ejemplo 9).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "alfa-sinucleína" es sinónimo de la proteína alfa-sinucleína y se refiere a cualquiera de las isoformas de la proteína alfa-sinucleína (identificadas en, por ejemplo, UniProt como P37840, 1-3). La numeración de aminoácidos de la alfa-sinucleína se da con respecto a la SEQ ID NO: 1 como se muestra a continuación, siendo la metionina (M) el resto de aminoácido 1:

SEQ ID NO: 1:

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAAGKTKEGVLVVGSKTKEGVVHGVAT  
VAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQE  
GILEDMPVDPDNEAYEMPSEEYQDYEPEA

La presente invención se refiere a anticuerpos y a fragmentos de anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a la alfa-sinucleína, y en particular a la alfa-sinucleína humana. En particular, los anticuerpos y fragmentos de los mismos muestran la capacidad de unirse específicamente al epítipo 126-140 de la alfa-sinucleína humana, SEQ ID NO: 2.

El término "anticuerpo" (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina o según algunas realizaciones de la invención puede ser un fragmento de una molécula de inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse específicamente a un epítipo de una molécula ("antígeno"). Los anticuerpos naturales suelen estar formados por un tetrámero compuesto por al menos dos cadenas pesadas (H) y al menos dos cadenas ligeras (L). Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada, normalmente compuesta por tres dominios (CH1, CH2 y CH3). Las cadenas pesadas pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgG (subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE. Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Las cadenas ligeras incluyen las cadenas kappa y las cadenas lambda. La región variable de las cadenas pesada y ligera suele ser responsable del reconocimiento del antígeno, mientras que la región constante de las cadenas pesada y ligera puede mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. Las regiones VH y VL pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad", que se intercalan con regiones de secuencia más conservada, denominadas "regiones marco" (FR). Cada VH y VL se compone de tres dominios CDR (región determinante de la complementariedad) y cuatro dominios FR dispuestos del amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Son especialmente importantes los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígenos que han sido "aislados" para que existan en un medio físico distinto de aquel en el que pueden encontrarse en la naturaleza o que han sido modificados para que difieran de un anticuerpo natural en la secuencia de aminoácidos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo" significa un fragmento de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un epítipo. Un fragmento de unión a antígeno puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o los 6 dominios CDR de dicho anticuerpo y, aunque sea capaz de unirse específicamente a dicho epítipo, puede presentar una especificidad, afinidad o selectividad hacia dicho epítipo que difiera de la de dicho anticuerpo. Sin embargo, preferiblemente, un fragmento de unión a antígeno contendrá los 6 dominios CDR de dicho anticuerpo. Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser una única cadena polipeptídica (p. ej., un scFv) o puede comprender dos o más cadenas polipeptídicas, teniendo cada una un extremo amino y un extremo carboxilo (p. ej., un diacuerpo, un fragmento Fab, un fragmento Fab<sub>2</sub>, etc.). Los fragmentos de anticuerpo que muestran capacidad de unión a antígenos pueden obtenerse, por ejemplo, por escisión por proteasas de anticuerpos intactos. Más preferiblemente, aunque los dos dominios del fragmento Fv,

VL y VH, estén codificados por genes separados, dichas secuencias genéticas o su ADNc codificante pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador flexible que permita fabricarlos como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se asocien para formar moléculas monovalentes de unión a antígeno (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véanse p. ej., Bird et al., (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5879-5883). Como alternativa, empleando un enlazador flexible que sea demasiado corto (p. ej., menos de 9 restos) para permitir que las regiones VL y VH de una única cadena polipeptídica se asocien entre sí, se puede formar un anticuerpo biespecífico, diacuerpo o molécula similar (en la que dos cadenas polipeptídicas de este tipo se asocian entre sí para formar una molécula bivalente de unión a antígeno) (véase, por ejemplo, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) para una descripción de los diacuerpos). Entre los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno comprendidos en la presente invención se incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente formado por los dominios VL, VH, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio VH y también llamado anticuerpos de dominio (Holt et al, Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11) :484-90); (vi) camélidos o nanocuerpos (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. enero de 2005;5\_(I): I II-24) y (vii) una CDR aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite fabricarlos como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena única o Fv de cadena única (scFv), véase por ejemplo Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) y Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883

(1988)). Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención se tratan con más detalle en el presente documento. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye polipéptidos similares a anticuerpos, como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados por cualquier técnica conocida, como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo. Tal como se utiliza en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada. Dichos fragmentos de anticuerpo se obtienen mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia; los fragmentos adecuados capaces de unirse a un epítipo deseado pueden analizarse fácilmente para determinar su utilidad del mismo modo que un anticuerpo intacto.

El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que contiene dos dominios de unión independientes que se dirigen cada uno a dianas independientes. Estas dianas pueden ser proteínas diferentes o epítopos diferentes de la misma diana. Las moléculas de anticuerpos biespecíficos pueden fabricarse utilizando cambios aminoacídicos compensatorios en las regiones constantes de los HC de las moléculas de anticuerpos bivalentes monoespecíficos parentales. El anticuerpo heterodimérico resultante contiene un Fab aportado por dos anticuerpos monoespecíficos progenitores diferentes. Los cambios de aminoácidos en el dominio Fc conducen a una mayor estabilidad del anticuerpo heterodimérico con una biespecificidad estable en el tiempo (Ridgway et al., Protein Engineering 9, 617-621 (1996), Gunasekaran et al., JBC 285, 19637-19641(2010), Moore et al., MAbs 3:6 546-557 (2011), Strop et al., JMB 420, 204-219 (2012), Metz et al., Protein Engineering 25:10 571-580 (2012), Labrijn et al., PNAS 110:113, 5145 -5150 (2013), Spreter Von Kreudenstein et al., MAbs 5:5 646-654 (2013)). Los anticuerpos biespecíficos también pueden incluir moléculas generadas mediante fusiones scFv. A continuación, dos scFv monoespecíficos se unen de forma independiente a dominios Fc capaces de formar heterodímeros estables para generar una única molécula biespecífica (Mabry et al., PEDS 23:3 115-127 (2010). Las moléculas biespecíficas tienen doble capacidad de unión. Por ejemplo, dirigirse tanto a una diana terapéutica como a un receptor de superficie transcitosante con el fin de administrar un anticuerpo terapéutico a través de la barrera hematoencefálica para tratar una enfermedad del SNC.

La expresión "anticuerpo humanizado", tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son específicamente inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una CDR del receptor se sustituyen por los restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, el conejo o la rata que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco de Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado comprenderá restos que no se encuentran ni en el receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas, pero que se incluyen para refinar y optimizar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso humana. De manera óptima, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Los

anticuerpos pueden tener regiones Fc modificadas conocidas por los expertos en la materia. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, lo que también se denomina una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

La expresión "anticuerpo humano", tal y como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos con regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o durante el reordenamiento génico o por mutación somática *in vivo*).

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. La composición de un anticuerpo monoclonal convencional muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo concreto. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal puede estar compuesto por más de un dominio Fab, aumentando así la especificidad para más de una diana.

Por anticuerpo "2E6 de ratón" o "m2E6" se entiende un anticuerpo compuesto por la cadena ligera de SEQ ID NO: 19 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 20.

El anticuerpo "2E6 quimérico" o "ch2E6" se refiere a un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 21 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 22.

Por anticuerpo "'2E6-HLD-1" o "h2E6-HLD-1" o "H2E6-HLD-1" o "2E6-HLD1" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 23 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 24.

Por anticuerpo "'2E6-HLD-2" o "h2E6-HLD-2" o "H2E6-HLD-2" o "2E6-HLD2" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 25 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 26.

Por anticuerpo "'2E6-HLD-3" o "h2E6-HLD-3" o "H2E6-HLD-3" o "2E6-HLD3" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 27 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 28.

Por anticuerpo "'6B6" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 45 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 46.

Por anticuerpo "'5A1" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 29 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 30.

Por anticuerpo "'9D7" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 31 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 32.

Por anticuerpo "'9G11" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 33 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 34.

Por anticuerpo "'L3" o "L3-11" (utilizados indistintamente en el presente documento) se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 38.

Por anticuerpo "'7A10" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 39 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 40.

Por anticuerpo "'8D9" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 41 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 42.

Por anticuerpo "'9C12" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 43 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 44.

Por anticuerpo "'6B6" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 45 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 46.

Por anticuerpo "'7C4" se entiende un anticuerpo formado por la cadena ligera de SEQ ID NO: 35 y la cadena pesada de SEQ ID NO: 36.

A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o región constante es según el sistema de numeración UE, también llamado índice de EU, tal como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Tal como se utiliza en el presente documento, se dice que un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une "específicamente" a una región de otra molécula (es decir, un epítipo) si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad o avidez con ese epítipo en relación con epítopos alternativos. En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención se une al menos 10 veces más fuertemente a su diana (alfa sinucleína humana) que a otra molécula; preferiblemente al menos 50 veces más fuertemente y más preferiblemente al menos 100 veces más fuertemente. Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une en condiciones fisiológicas, por ejemplo, *in vivo*. Por tanto, por "unión específica" a los aminoácidos 126-140 ([SEQ ID NO: 2]) de la alfa-sinucleína humana incluimos la capacidad del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de unirse a los aminoácidos 126-140 con dicha especificidad y/o en dichas condiciones. Los métodos adecuados para determinar dicha unión serán conocidos por los expertos en la materia, y en los ejemplos adjuntos se describen métodos ilustrativos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado se refiere típicamente a la unión con una afinidad correspondiente a una KD de aproximadamente  $10^{-7}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-8}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-9}$  M o menos cuando se determina mediante, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 o T200 utilizando el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una KD que es al menos diez veces menor, por ejemplo, al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1.000 veces menor, por ejemplo, al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces menor que su afinidad de unión a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o de un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la KD del anticuerpo, de modo que cuando la KD del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), entonces la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno inespecífico puede ser de al menos 10.000 veces.

El término "kd" (véase -1 o 1/s), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se denomina valor koff.

El término "ka" ( $M^{-1} \times s^{-1}$  o 1/Mseg), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

El término "KD" (M), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la kd por la ka.

El término "KA" ( $M^{-1}$  o 1/M), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de asociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la ka por la kd.

El hecho de que la alteración de un solo aminoácido de un resto de CDR pueda provocar la pérdida de la unión funcional (Rudikoff, S. etc. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983) proporciona un medio para identificar sistemáticamente secuencias de CDR funcionales alternativas. En un método preferido para obtener dichas CDR variantes, se mutageniza un polinucleótido que codifica la CDR (por ejemplo mediante mutagénesis aleatoria o por un método dirigido al sitio (p. ej., amplificación mediada por reacción en cadena de la polimerasa con cebadores que codifican el locus mutado)) para producir una CDR que tenga un resto de aminoácido sustituido. Comparando la identidad del residuo relevante en la secuencia CDR original (funcional) con la identidad de la secuencia CDR variante sustituida (no funcional), se puede identificar la puntuación de sustitución BLOSUM62.ijj para esa sustitución. El sistema BLOSUM proporciona una matriz de sustituciones de aminoácidos creada mediante el análisis de una base de datos de secuencias para alineaciones de confianza (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?", Nature Biotech. 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective," J. Mol. Biol. 219, 555-565. Actualmente, la base de datos BLOSUM más avanzada es la base de datos BLOSUM62 (BLOSUM62.ijj). La **tabla 1** presenta las puntuaciones de sustitución de BLOSUM62.ijj (cuanto mayor es la puntuación, más conservadora es la sustitución y, por tanto, más probable es que la sustitución no afecte a la función). Si un fragmento de unión a antígeno que comprende la CDR resultante no se une a la alfa-sinucleína, por ejemplo, la puntuación de sustitución BLOSUM62.ijj se considera insuficientemente conservadora, y se selecciona y produce una nueva sustitución candidata que tenga una puntuación de sustitución más alta. Por tanto, por ejemplo, si el resto original era glutamato (E), y el resto sustituto no funcional era histidina (H), la puntuación de sustitución BLOSUM62.ijj será 0, y se prefieren cambios más conservadores (como a aspartato, asparagina, glutamina o lisina).

| Tabla 1 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |    |    |
|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|
|         | A  | R  | N  | D  | C  | Q  | E  | G  | H  | I  | L  | K  | M  | F  | P  | S  | T  | W   | Y  | V  |
| A       | +4 | -1 | -2 | -2 | 0  | -1 | -1 | 0  | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | +1 | 0  | -3  | -2 | 0  |
| R       | -1 | +5 | 0  | -2 | -3 | +1 | 0  | -2 | 0  | -3 | -2 | +2 | -1 | -3 | -2 | -1 | -1 | -3  | -2 | -3 |
| N       | -2 | 0  | +6 | +1 | -3 | 0  | 0  | 0  | +1 | -3 | -3 | 0  | -2 | -3 | -2 | +1 | 0  | -4  | -2 | -3 |
| D       | -2 | -2 | +1 | +6 | -3 | 0  | +2 | -1 | -1 | -3 | -4 | -1 | -3 | -3 | -1 | 0  | -1 | -4  | -3 | -3 |
| C       | 0  | -3 | -3 | -3 | +9 | -3 | -4 | -3 | -3 | -1 | -1 | -3 | -1 | -2 | -3 | -1 | -1 | -2  | -2 | -1 |
| Q       | -1 | +1 | 0  | 0  | -3 | +5 | +2 | -2 | 0  | -3 | -2 | +1 | 0  | -3 | -1 | 0  | -1 | -2  | -1 | -2 |
| E       | -1 | 0  | 0  | +2 | -4 | +2 | +5 | -2 | 0  | -3 | -3 | +1 | -2 | -3 | -1 | 0  | -1 | -3  | -2 | -2 |
| G       | 0  | -2 | 0  | -1 | -3 | -2 | -2 | +6 | -2 | -4 | -4 | -2 | -3 | -3 | -2 | 0  | -2 | -2  | -3 | -3 |
| H       | -2 | 0  | +1 | -1 | -3 | 0  | 0  | -2 | +8 | -3 | -3 | -1 | -2 | -1 | -2 | -1 | -2 | -2  | +2 | -3 |
| I       | -1 | -3 | -3 | -3 | -1 | -3 | -3 | -4 | -3 | +4 | +2 | -3 | +1 | 0  | -3 | -2 | -1 | -3  | -1 | +3 |
| L       | -1 | -2 | -3 | -4 | -1 | -2 | -3 | -4 | -3 | +2 | +4 | -2 | +2 | 0  | -3 | -2 | -1 | -2  | -1 | +1 |
| K       | -1 | +2 | 0  | -1 | -3 | +1 | +1 | -2 | -1 | -3 | -2 | +5 | -1 | -3 | -1 | 0  | -1 | -3  | -2 | -2 |
| M       | -1 | -1 | -2 | -3 | -1 | 0  | -2 | -3 | -2 | +1 | +2 | -1 | +5 | 0  | -2 | -1 | -1 | -1  | -1 | +1 |
| F       | -2 | -3 | -3 | -3 | -2 | -3 | -3 | -3 | -1 | 0  | 0  | -3 | 0  | +6 | -4 | -2 | -2 | +1  | +3 | -1 |
| P       | -1 | -2 | -2 | -1 | -3 | -1 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | -1 | -2 | -4 | +7 | -1 | -1 | -4  | -3 | -2 |
| S       | +1 | -1 | +1 | 0  | -1 | 0  | 0  | 0  | -1 | -2 | -2 | 0  | -1 | -2 | -1 | +4 | +1 | -3  | -2 | -2 |
| T       | 0  | -1 | 0  | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | +1 | +5 | -2  | -2 | 0  |
| W       | -3 | -3 | -4 | -4 | -2 | -2 | -3 | -2 | -2 | -3 | -2 | -3 | -1 | +1 | -4 | -3 | -2 | +11 | +2 | -3 |
| Y       | -2 | -2 | -2 | -3 | -2 | -1 | -2 | -3 | +2 | -1 | -1 | -2 | -1 | +3 | -3 | -2 | -2 | +2  | +7 | -1 |
| V       | 0  | -3 | -3 | -3 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | +3 | +1 | -2 | +1 | -1 | -2 | -2 | 0  | -3  | -1 | +4 |

Por tanto, la invención contempla el uso de mutagénesis aleatoria para identificar CDR mejoradas. En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservativas pueden definirse por sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las tres tablas siguientes:

#### Clases de restos de aminoácidos para sustituciones conservadoras:

| Tabla 2                       |  |
|-------------------------------|--|
| Restos ácidos                 | Asp (D) y Glu (E)                            |
| Restos básicos                | Lys (K), Arg (R) y His (H)                   |
| Restos hidrófilos no cargados | Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)          |
| Restos alifáticos no cargados | Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I) |
| Restos no polares sin carga   | Cys (C), Met (M) y Pro (P)                   |
| Restos aromáticos             | Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)                   |

#### Clases alternativas de sustitución conservadora de restos de aminoácidos:

|                |          |          |          |
|----------------|----------|----------|----------|
| <b>Tabla 3</b> |          |          |          |
| 1              | <b>A</b> | <b>S</b> | <b>T</b> |
| 2              | <b>D</b> | <b>E</b> |          |
| 3              | <b>N</b> | <b>Q</b> |          |
| 4              | <b>R</b> | <b>K</b> |          |
| 5              | <b>I</b> | <b>L</b> | <b>M</b> |
| 6              | <b>F</b> | <b>Y</b> | <b>W</b> |

#### Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de los restos de aminoácidos:

|  |  |
|--|--|
| <b>Tabla 4</b>                             |  |
| Restos que contienen grupos alcohol        | Arena T                                |
| Restos alifáticos                          | I, L, V y M                            |
| Restos asociados a cicloalqueno            | F, H, W e Y                            |
| Restos hidrófobos                          | A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y |
| Restos cargados negativamente              | D y E                                  |
| Restos polares                             | C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T          |
| Restos cargados positivamente              | H, K y R                               |
| Restos pequeños                            | A, C, D, G, N, P, S, T y V             |
| Restos muy pequeños                        | A, G y S                               |
| Restos implicados en la formación de giros | A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T |
| Restos flexibles                           | Q, T, K, S, G, P, D, E y R             |

- 5 Las agrupaciones de sustituciones más conservadoras incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

También pueden formularse grupos adicionales de aminoácidos utilizando los principios descritos, p. ej., en Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2.<sup>a</sup> Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

10 La tecnología de visualización de fagos puede utilizarse como alternativa para aumentar (o disminuir) la afinidad de las CDR. Esta tecnología, denominada maduración de la afinidad, emplea la mutagénesis o "recorrido de CDR" y la re-selección utiliza el antígeno diana o un fragmento antigénico de unión a antígeno del mismo para identificar anticuerpos que tienen CDR que se unen con mayor (o menor) afinidad al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o precursor (véase, p. ej., Glaser et al. (1992) *J. Immunology* 149:3903). Mutagenizar codones enteros en lugar de nucleótidos individuales da lugar a un repertorio semialeatorio de mutaciones de aminoácidos. Se pueden construir bibliotecas que consistan en un conjunto de clones variantes, cada uno de los cuales difiera en una única alteración aminoacídica en una única CDR y que contenga variantes que representen cada posible sustitución de aminoácidos para cada resto de la CDR. Los mutantes con mayor (o menor) afinidad de unión por el antígeno pueden examinarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Puede usarse cualquier método de cribado conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con afinidad aumentada o disminuida por el antígeno (p. ej., ELISA) (véase Wu et al. 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155:1994). Se puede utilizar el recorrido de CDR que aleatoriza la cadena ligera (véase, Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551).

25 Los métodos para llevar a cabo dicha maduración de la afinidad se describen, por ejemplo, en: Krause, J.C. et al. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody," *MBio*. 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas," *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes," *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41," *MAbs* 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naïve Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth," *Virology* 393(1):112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions," *J. Mol. Biol.*

388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development," *Methods Mol. Biol.* 525:353-376; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification," *Mol. Immunol.* 46(1):135-144; y Barderas, R. et al. (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105(26):9029-9034.

El término "epítipo" designa un determinante antigénico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos suelen consistir en agrupaciones superficiales de moléculas, como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y suelen tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender restos de aminoácidos directamente implicados en la unión y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, como restos de aminoácidos que están bloqueados eficazmente por el péptido de unión específica al antígeno (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión específica al antígeno).

Los términos "tratamiento" o "tratar", tal como se utilizan en el presente documento, significan mejorar, ralentizar o invertir el progreso o la gravedad de una enfermedad o trastorno, o mejorar, ralentizar o invertir uno o más síntomas o efectos secundarios de dicha enfermedad o trastorno. A efectos de la presente invención, "tratamiento" o "tratar" significa además una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados, donde "resultados clínicos beneficiosos o deseados" incluyen, sin limitación, el alivio de un síntoma, la disminución de la extensión de un trastorno o enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) de una enfermedad o trastorno, retraso o ralentización de la progresión de una enfermedad o trastorno, mejora o paliación de una enfermedad o trastorno y remisión de una enfermedad o trastorno, ya sea parcial o total, detectable o indetectable.

Una "cantidad eficaz", cuando se aplica a un anticuerpo de la invención, se refiere a una cantidad suficiente, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un efecto biológico previsto o un resultado terapéutico deseado, incluidos, sin limitación, los resultados clínicos. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" cuando se aplica a un anticuerpo de la invención pretende denotar una cantidad del anticuerpo que es suficiente para mejorar, paliar, estabilizar, invertir, ralentizar o retrasar la progresión de un trastorno o estado de enfermedad, o de un síntoma del trastorno o enfermedad. En una realización, el método de la presente invención prevé la administración del anticuerpo en combinaciones con otros compuestos. En dichos casos, la "cantidad eficaz" es la cantidad de la combinación suficiente para causar el efecto biológico deseado.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti alfa sinucleína puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo anti alfa sinucleína para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o de la porción de anticuerpo se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo denominado 2E6 en el presente documento para unirse a un epítipo de la alfa-sinucleína. En particular, los anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 126-140 (SEQ ID NO: 2). En una realización específica, el anticuerpo puede unirse al epítipo que comprende o consiste en P138, E139 y A140.

Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos humanizados.

En consecuencia, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las siguientes CDR de:

SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos con no más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena pesada que comprenda las siguientes CDR:

SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

5 SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

10 SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

15 Según una realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

20 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

25 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

30 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

35 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las siguientes CDR de:

40 SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

45 SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

50 SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos con no más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno puede comprender una región variable de cadena pesada que comprenda las siguientes CDR:

55 SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

60 SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

65 SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.



Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

- 5 En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las siguientes CDR de:

10 SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

15 SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos con no más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

- 20 El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena pesada que comprenda las siguientes CDR:

25 SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

30 SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

SEQ ID NO: 18 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

- 35 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

40 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

- 45 En otra realización de la invención, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las siguientes CDR de:

SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

50 SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

55 SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos con no más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

- 60 El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena pesada que comprenda las siguientes CDR:

SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

5 SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

10 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38.

15 Según otra realización de la invención, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las siguientes CDR de:

SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

20 SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

25 SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos con no más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

30 El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena pesada que comprenda las siguientes CDR:

SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

35 SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

40 SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

45 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

50 Según otra realización de la invención, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las siguientes CDR de:

SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

55 SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

60 SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos con no más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

65 El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena pesada que comprenda las siguientes CDR:

SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

5 SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

10 SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

15 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34.

Según una realización de la invención, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las siguientes CDR de:

20 SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

25 SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

30 SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos con no más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender la región variable de cadena pesada que comprende las siguientes CDR:

35 SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

40 SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

45 SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

50 Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.

Según otra realización de la invención, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las siguientes CDR de:

55 SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

60 SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

65 SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos con no más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena pesada que comprenda las siguientes CDR:

5 SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos;

10 SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos; y

15 SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos que no presente más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos.

Según otra realización, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.

20 Según una realización, el anticuerpo puede ser incapaz de provocar una respuesta inmunitaria a través de receptores de inmunoglobulina conocidos. El anticuerpo puede alterarse para limitar o reducir su capacidad de interactuar con receptores de inmunoglobulina conocidos. Por ejemplo, el anticuerpo podría estar desglicosilado, contener cambios de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada o ambas cosas.

25 La presente invención también proporciona un método para reducir la formación de agregados de alfa-sinucleína en un paciente, que comprende administrar al paciente que necesita dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención.

30 Además, los anticuerpos pueden estar en una composición junto con un portador, diluyente y/o estabilizante farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse en terapia. En particular, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse en el tratamiento de sinucleinopatías como la enfermedad de Parkinson (incluidas las formas idiopáticas y hereditarias de la enfermedad de Parkinson), la enfermedad de Gaucher, la enfermedad difusa por cuerpos de Lewy (DLBD), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV), la enfermedad combinada de Alzheimer y Parkinson, la insuficiencia autonómica pura y la atrofia multisistémica. Los anticuerpos de la invención también pueden ser capaces de tratar a personas con riesgo de desarrollar EP en función de su perfil genético y/o de síntomas centrales no relacionados con la EP que les hagan propensos a desarrollar EP en el futuro.

40 El tratamiento puede ser crónico y el paciente puede ser tratado al menos durante 2 semanas, como al menos durante 1 mes, 6, meses, 1 año o más.

45 Los anticuerpos de la presente invención pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales producidos por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), o pueden producirse por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de fagotecas de anticuerpos utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada. Por tanto, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de hibridomas preparados a partir de células de linfocitos B esplénicos murinos obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o de mamíferos no humanos como ratas, conejos, perros, ovejas, cabras, primates, etc.

55 En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra la alfa-sinucleína pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos portadores de partes del sistema inmunitario humano y con un repertorio de ratón parcialmente inactivado. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente.

60 El ratón HuMAb contiene un minilocus genético de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina humana de cadena pesada variable y constante ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y de cadena ligera variable y constante ( $\kappa$ ) no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus de las cadenas  $\mu$  y  $\kappa$  endógenas (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). En consecuencia, dichos ratones presentan una expresión reducida de IgM o IgK de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos, sufren un cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales humanos IgG,  $\kappa$  de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado en Lonberg, N., Handbook of

Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N., Ann. N. Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb se describe detalladamente en Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Véanse también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

Los ratones HCo7, HCo12, HCo17 y HCo20 tienen una alteración JKD en sus genes de cadena ligera endógena ( $\kappa$ ) (como se describe en Chen et al., EMBO J. 12, (1993)), una alteración CMD en sus genes de cadena pesada endógena (como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 01/14424), y un transgén de cadena ligera  $\kappa$  humana KCo5 (como se describe en Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)). Además, los ratones HCo7 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429), los ratones HCo12 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo12 (como se describe en el ejemplo 2 del documento WO 01/14424), los ratones HCo17 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo17 (como se describe en el ejemplo 2 del documento WO 01/09187) y los ratones HCo20 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo20. Los ratones resultantes expresan transgenes de cadenas pesadas y ligeras  $\kappa$  de inmunoglobulina humana en un fondo homocigoto para la interrupción de los locus endógenos de cadenas pesadas y ligeras  $\kappa$  de ratón.

En la cepa de ratón KM, el gen endógeno de la cadena ligera  $\kappa$  de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993) y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón lleva un transgén de cadena ligera  $\kappa$  humana, KCo5, como se describe en Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma humano de cadena pesada compuesto por el fragmento hCF (SC20) del cromosoma 14, tal y como se describe en el documento WO 02/43478. Los ratones HCo12-Balb/c, HCo17-Balb/c y HCo20-Balb/c pueden generarse cruzando HCo12, HCo17 y HCo20 con KCo5[J/K](Balb) como se describe en el documento WO 09/097006.

Los esplenocitos de estos ratones transgénicos pueden utilizarse para generar hibridomas que segreguen anticuerpos monoclonales humanos según técnicas bien conocidas. Los anticuerpos monoclonales o policlonales humanos de la presente invención, o los anticuerpos de la presente invención procedentes de otras especies también pueden generarse transgénicamente mediante la generación de otro mamífero no humano o planta que sea transgénico para las secuencias de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable a partir del mismo. En relación con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos pueden producirse en la leche de cabras, vacas u otros mamíferos y recuperarse de ella. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.827.690, US 5.756.687, US 5.750.172 y US 5.741.957.

El anticuerpo de la invención puede ser de cualquier isotipo. La elección del isotipo suele estar guiada por las funciones efectoras deseadas, como la inducción de ADCC. Algunos isotipos ilustrativos son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Puede utilizarse cualquiera de las regiones constantes de la cadena ligera humana,  $\kappa$  o  $\lambda$ . Si se desea, la clase de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína de la presente invención puede cambiarse por métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que originalmente era IgM puede cambiarse de clase a un anticuerpo IgG de la presente invención. Además, pueden utilizarse técnicas de cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo de IgG1 a IgG2. Así, la función efectora de los anticuerpos de la presente invención puede modificarse mediante el cambio de isotipo a, p. ej., un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 para diversos usos terapéuticos. En una realización un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG1, por ejemplo una IgG1,  $\kappa$ .

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente un anticuerpo IgG, en particular un anticuerpo IgG1,  $\kappa$ . En otra realización, el anticuerpo de la invención es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena simple.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico se diseña para convertirse en un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para los humanos, conservando la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano precursor. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, p. ej., CDR, (o porciones de las mismas) proceden de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de las mismas) proceden de secuencias de anticuerpos humanos. Opcionalmente, un anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos restos FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (p. ej., el anticuerpo del que proceden los restos de HVR), p. ej., para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para fabricarlos se revisan, p. ej., en Almagro y Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633 (2008), y se describen con más detalle, p. ej., en Riechmann et al., Nature 332:323-329

(1988); Queen et al., Proc. Nat 'IUSA 86:10029-10033 (1989); Patentes Estadounidenses 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (describe el injerto de región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan, Mol. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse, p. ej., por fragmentación mediante técnicas convencionales, y la utilidad de los fragmentos puede examinarse de la misma manera que se describe en el presente documento para los anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pueden generarse tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro y producir fragmentos Fab'. Los fragmentos Fab pueden obtenerse tratando un anticuerpo IgG con papaína; los fragmentos Fab' pueden obtenerse con la digestión con pepsina de un anticuerpo IgG. También puede producirse un fragmento F(ab')<sub>2</sub> mediante la unión del Fab' descrito a continuación a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Un fragmento Fab' es un fragmento de anticuerpo obtenido cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')<sub>2</sub>. Un fragmento Fab' puede obtenerse tratando un fragmento F(ab')<sub>2</sub> con un agente reductor, como el ditiotreitól. El fragmento de anticuerpo también puede generarse mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos en células recombinantes (véase, por ejemplo, Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen quimérico que codifique una porción de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> podría incluir secuencias de ADN que codifiquen el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguidas de un codón de parada traslacional para producir dicha molécula de fragmento de anticuerpo truncado.

En una realización, el anticuerpo anti-alfa-sinucleína es un anticuerpo monovalente, preferiblemente un anticuerpo monovalente como se describe en WO2007059782 (que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad) que tiene una delección de la región bisagra. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente, en donde dicho anticuerpo anti-alfa-sinucleína se construye por un método que comprende: i) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región CL constante de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están enlazadas operablemente entre sí, y en donde, en el caso de un subtipo IgG1, la secuencia de nucleótidos que codifica la región CL se ha modificado de tal manera que la región CL no contiene ningún aminoácido capaz de formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CL en presencia de IgG humana policlonal o cuando se administra a un animal o ser humano; ii) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifique la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica una región CH constante de una Ig humana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH ha sido modificada de tal manera que la región correspondiente a la región bisagra y, según requiera el subtipo de Ig, otras regiones de la región CH, como la región CH3, no comprenda ningún resto de aminoácido que participe en la formación de enlaces disulfuro o enlaces covalentes o no covalentes estables entre cadenas pesadas con otros péptidos que comprendan una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CH de la Ig humana en presencia de IgG humana policlonal o cuando se administre a un ser humano animal, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig estén unidas operablemente entre sí; iii) proporcionar un sistema de expresión celular para producir dicho anticuerpo monovalente; iv) producir dicho anticuerpo monovalente mediante la coexpresión de las construcciones de ácido nucleico de (i) y (ii) en células del sistema de expresión celular de (iii).

Del mismo modo, en una realización, el anticuerpo anti-alfa-sinucleína es un anticuerpo monovalente, que comprende:

(i) una región variable de un anticuerpo de la invención tal como se describe en el presente documento o una porción de unión a antígeno de dicha región, y

(ii) una región CH de una inmunoglobulina o un fragmento de unión a antígeno de la misma que comprende las regiones CH2 y CH3, en donde la región CH o el fragmento de unión a antígeno de la misma se ha modificado de tal manera que la región correspondiente a la región bisagra y, si la inmunoglobulina no es un subtipo IgG4, otras regiones de la región CH, como la región CH3, no comprendan ningún resto de aminoácido capaz de formar enlaces disulfuro con una región CH idéntica u otros enlaces covalentes o no covalentes estables entre cadenas pesadas con una región CH idéntica en presencia de IgG humana policlonal.

En realizaciones adicionales, la cadena pesada del anticuerpo monovalente anti-alfa-sinucleína ha sido modificada de tal manera que se ha eliminado toda la bisagra.

En otras realizaciones adicionales, la secuencia de dicho anticuerpo monovalente ha sido modificada para que no comprenda ningún sitio aceptor para la N-glucosilación.

En realizaciones adicionales, el anticuerpo Fab monovalente para la sinucleína se une a un Fab o scFv adicional dirigido a una proteína diferente para generar un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico puede tener

una doble función, por ejemplo una función terapéutica conferida por un dominio de unión antisinucleína y una función de transporte que puede unirse a una molécula receptora para mejorar la transferencia a través de una barrera biológica, como la barrera hematoencefálica.

Los anticuerpos anti-alfa-sinucleína de la invención también incluyen anticuerpos de cadena simple. Los anticuerpos de cadena simple son péptidos en los que las regiones Fv de las cadenas pesada y ligera están conectadas. En una realización, la presente invención proporciona un Fv de cadena única (scFv) en donde las cadenas pesada y ligera en el Fv de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína de la presente invención se unen con un enlazador peptídico flexible (típicamente de unos 10, 12, 15 o más restos de aminoácidos) en una cadena peptídica única. Los métodos de producción de dichos anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento US 4.946.778, Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994), Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988), Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988) y McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554 (1990). El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente, si solo se utiliza un único VH y VL, bivalente, si se utilizan dos VH y VL, o polivalente, si se utilizan más de dos VH y VL.

En general, los anticuerpos anti-alfa-sinucleína descritos en el presente documento pueden modificarse mediante la inclusión de cualquier número adecuado de aminoácidos modificados y/o asociaciones con dichos sustituyentes conjugados. La idoneidad en este contexto se determina generalmente por la capacidad de conservar al menos sustancialmente la selectividad de la alfa-sinucleína y/o la especificidad anti-alfa-sinucleína asociada con el anticuerpo anti-alfa-sinucleína original no derivatizado. La inclusión de uno o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa, por ejemplo, para aumentar la semivida sérica del polipéptido, reducir la antigenicidad del polipéptido o aumentar la estabilidad de almacenamiento del polipéptido. Los aminoácidos se modifican, por ejemplo, de forma cotraduccional o postraduccional durante la producción recombinante (p. ej., N-glicosilación en motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifican por medios sintéticos. Algunos ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glicosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (p. ej., farnesilado, geranilgeranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado, y similares. Las referencias adecuadas para guiar a un experto en la modificación de aminoácidos abundan en toda la bibliografía. Pueden encontrarse ejemplos de protocolos en Walker (1998) *Protein Protocols On CD-Rom*, Humana Press, Totowa, NJ. El aminoácido modificado puede, por ejemplo, seleccionarse entre un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico o un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico.

Los anticuerpos contra la alfa-sinucleína también pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida circulante. En los documentos US 4.766.106, US 4.179.337, US 4.495.285 y US 4.609.546, por ejemplo, se ilustran polímeros ilustrativos y métodos para unirlos a péptidos. Otros polímeros ilustrativos son los polioles polioxiethylados y el polietilenglicol (PEG) (p. ej., un PEG con un peso molecular comprendido entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, por ejemplo, entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 20.000, p. ej., aproximadamente 3.000-12.000 g/mol).

Los anticuerpos pueden utilizarse además en un método de diagnóstico o como ligando de diagnóstico por imagen.

En una realización, se proporcionan anticuerpos anti-alfa-sinucleína que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Un anticuerpo anti-alfa-sinucleína radiomarcado puede utilizarse tanto con fines diagnósticos como terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otra característica posible). Algunos ejemplos no limitantes de dichos marcadores incluyen, pero sin limitación, bismuto ( $^{213}\text{Bi}$ ), carbono ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ), cromo ( $^{51}\text{Cr}$ ), cobalto ( $^{57}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ), cobre ( $^{64}\text{Cu}$ ), disprosio ( $^{165}\text{Dy}$ ), erbio ( $^{169}\text{Er}$ ), flúor ( $^{18}\text{F}$ ), gadolinio ( $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ), galio ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), germanio ( $^{68}\text{Ge}$ ), oro ( $^{198}\text{Au}$ ), holmio ( $^{166}\text{Ho}$ ), hidrógeno ( $^3\text{H}$ ), indio ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{115}\text{In}$ ), yodo ( $^{121}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), iridio ( $^{192}\text{Ir}$ ), hierro ( $^{59}\text{Fe}$ ), criptón ( $^{81\text{m}}\text{Kr}$ ), lantano ( $^{140}\text{La}$ ), lutecio ( $^{177}\text{Lu}$ ), manganeso ( $^{54}\text{Mn}$ ), molibdeno ( $^{99}\text{Mo}$ ), nitrógeno ( $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ), oxígeno ( $^{15}\text{O}$ ), paladio ( $^{103}\text{Pd}$ ), fósforo ( $^{32}\text{P}$ ), potasio ( $^{42}\text{K}$ ), praseodimio ( $^{142}\text{Pr}$ ), prometio ( $^{149}\text{Pm}$ ), renio ( $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ), rodio ( $^{105}\text{Rh}$ ), rubidio ( $^{81}\text{Rb}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ), rutenio ( $^{82}\text{Ru}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ), samario ( $^{153}\text{Sm}$ ), escandio ( $^{47}\text{Sc}$ ), selenio ( $^{75}\text{Se}$ ), sodio ( $^{24}\text{Na}$ ), estroncio ( $^{85}\text{Sr}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{92}\text{Sr}$ ), azufre ( $^{35}\text{S}$ ), tecnecio ( $^{99}\text{Tc}$ ), talio ( $^{201}\text{Tl}$ ), estaño ( $^{113}\text{Sn}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ), xenón ( $^{133}\text{Xe}$ ), iterbio ( $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{177}\text{Yb}$ ), itrio ( $^{90}\text{Y}$ ) y cinc ( $^{65}\text{Zn}$ ). Los métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados peptídicos relacionados son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Junghans et al., en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2.<sup>a</sup> edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y los documentos US 4.681.581, US 4.735.210, US 5.101.827, US 5.102.990 (US RE35.500), US 5.648.471 y US 5.697.902). Por ejemplo, un radioisótopo puede conjugarse mediante un método de cloramina T (Lindgren, S. et al. (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl)Benzoate As An Intermediate," *Nucl. Med. Biol.* 25(7):659-665; Kurth, M. et al. (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor," *J. Med. Chem.* 36(9):1255-1261; Rea, D.W. et al. (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors," *Cancer Res.* 50(3 Suppl):857s-861s).

La invención también proporciona anticuerpos anti-alfa-sinucleína que están marcados detectablemente usando un marcador fluorescente (tal como un quelato de tierras raras (p. ej., un quelato de europio)), un marcador de tipo

fluoresceína (p. ej., fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, fluoresceína diclorotriazinilamina), un marcador de tipo rodamina (p. ej., ALEXA FLUORO 568 (Invitrogen), TAMRA® o cloruro de dansilo), VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™ (Perkin Elmer), ficoeritrina; umbeliferona, Lissamina; una cianina; una ficoeritrina, Texas Red, BODIPY FL-SE® (Invitrogen) o un análogo de los mismos, todos ellos adecuados para la detección óptica. Pueden emplearse marcadores quimioluminiscentes (p. ej., luminol, luciferasa, luciferina y aequorina). Dicho diagnóstico y detección también pueden llevarse a cabo mediante el acoplamiento de la molécula de diagnóstico de la presente invención a sustancias detectables que incluyen, pero sin limitación, diversas enzimas, enzimas que incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa, o a complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina.

Pueden emplearse marcadores quimioluminiscentes (p. ej., luminol, luciferasa, luciferina y aequorina). Dicho diagnóstico y detección también pueden llevarse a cabo mediante el acoplamiento de la molécula de diagnóstico de la presente invención a sustancias detectables que incluyen, pero sin limitación, diversas enzimas, enzimas que incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa, o a complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina. También pueden emplearse etiquetas paramagnéticas, que se detectan preferiblemente mediante tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). Dichos marcadores paramagnéticos incluyen, pero sin limitación compuestos que contienen iones paramagnéticos de aluminio (Al), bario (Ba), calcio (Ca), cerio (Ce), disprosio (Dy), erbio (Er), europio (Eu), gadolinio (Gd), holmio (Ho), iridio (Ir), litio (Li), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (M), neodimio (Nd), osmio (Os), oxígeno (O), paladio (Pd), platino (Pt), rodio (Rh), rutenio (Ru), samario (Sm), sodio (Na), estroncio (Sr), terbio (Tb), tulio (Tm), estaño (Sn), titanio (Ti), wolframio (W), y circonio (Zr), y en particular,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Ga}^{+3}$ ,  $\text{Mn}^{+3}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Ti}^{+3}$ ,  $\text{V}^{+3}$ , y  $\text{V}^{+4}$ , metales emisores de positrones mediante diversas tomografías por emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Por tanto, en una realización, el anticuerpo anti-alfa-sinucleína de la invención puede marcarse con un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador paramagnético, un marcador radioisotópico o un marcador enzimático. El anticuerpo marcado puede utilizarse para detectar o medir la presencia o cantidad de dicha alfa-sinucleína en el cerebro de un sujeto. Este método puede comprender la detección o medición de imágenes *in vivo* del anticuerpo anti-alfa-sinucleína unido a dicha alfa-sinucleína y puede comprender imágenes *ex vivo* de dicho anticuerpo anti-alfa-sinucleína unido a dicha alfa-sinucleína.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a un vector de expresión que codifica una o más cadenas polipeptídicas de un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Dichos vectores de expresión pueden utilizarse para la producción recombinante de anticuerpos de la invención.

Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector de ADN o ARN adecuado, incluidos los vectores cromosómicos, no cromosómicos y de ácido nucleico sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Algunos ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, y vectores de ácido nucleico viral (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico codificador de anticuerpo anti-alfa-sinucleína está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe en, por ejemplo, Sykes y Johnston, Nat Biotech 12, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico como pBR322, pUC 19/18, o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "enano" (como se describe, por ejemplo, en Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada  $\text{CaPO}_4$  (tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, Somatic Cell Genetics 2, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y su uso son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

En una realización, el vector es adecuado para la expresión de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína o un fragmento de unión a antígeno anti-alfa-sinucleína del mismo en una célula bacteriana. Algunos ejemplos de dichos vectores incluyen vectores de expresión como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke y Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison, WI) y similares).

Un vector de expresión puede ser también o como alternativa un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Puede emplearse cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles como el factor alfa, la alcohol oxidasa y la PGH (revisado en: F. Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley InterScience New York (1987), y Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544

(1987)).



En un vector de expresión de la invención, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-alfa-sinucleína pueden comprender o estar asociados con cualquier promotor, potenciador y otros elementos facilitadores de la expresión adecuados. Algunos ejemplos de dichos elementos incluyen promotores de expresión fuertes (p. ej., el promotor/ potenciador IE del CMV humano, así como los promotores LTR del RSV, SV40, SL3-3, MMTV y VIH),

secuencias de terminación poli (A) eficaces, un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador de selección, y/o un sitio de clonación conveniente (p. ej., un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en contraposición a un promotor constitutivo como el CMV IE (el experto reconocerá que dichos términos son en realidad descriptores de un grado de expresión génica en determinadas condiciones).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una célula hospedadora recombinante eucariota o procariota, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo de la invención tal como se define en el presente documento o una molécula biespecífica de la invención tal como se define en el presente documento. Algunos ejemplos de células hospedadoras son las levaduras, las bacterias y las células de mamíferos, como las células CHO o HEK. Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado de forma estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína de la presente invención o un fragmento de unión a antígeno de unión a alfa-sinucleína del mismo. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo anti-alfa-sinucleína de la invención, comprendiendo dicho método los pasos de a) cultivar un hibridoma o una célula hospedadora de la invención como se describe en el presente documento, y b) purificar el anticuerpo de la invención a partir de los medios de cultivo.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- ☐ un anticuerpo anti-alfa-sinucleína como se define en el presente documento, y
- ☐ un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro adyuvante y excipiente conocido, de acuerdo con técnicas convencionales como las divulgadas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22.<sup>a</sup> Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013.

Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido, deben ser adecuados para el compuesto elegido de la presente invención y el modo de administración elegido. La idoneidad de los soportes y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en función de la ausencia de un impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto o composición farmacéutica elegidos de la presente invención (p. ej., menos de un impacto sustancial (10 % o menos de inhibición relativa, 5 % o menos de inhibición relativa, etc.)) sobre la unión al antígeno.

Una composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (p. ej., un detergente no iónico, como Tween-20 o Tween-80), estabilizantes (p. ej., azúcares o aminoácidos sin proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica. El diluyente se selecciona para que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Algunos ejemplos de dichos diluyentes son el agua destilada, la solución salina fisiológica tamponada con fosfato, las soluciones de Ringer, la solución de dextrosa y la solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros portadores, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares. Las composiciones también pueden incluir macromoléculas grandes de metabolización lenta, como proteínas, polisacáridos como el quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (p. ej., sefrosa funcionalizada con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (p. ej., gotas de aceite o liposomas).

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y la historia médica previa del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía y modo adecuados, incluyendo: parenteral, tópica, oral o intranasal para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral. Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen, entre otros, la inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea, intraespinal y la infusión.

Otras vías adecuadas de administración de un compuesto de la presente invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden seleccionarse por los expertos en la materia.

En una realización, la composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención.

Algunos ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo, y/o diversos tampones. Otros portadores son bien conocidos en la técnica farmacéutica.

Los soportes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfato sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, como palmitato de ascorbilo, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, como azúcares, polialcoholes, como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden mejorar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención pueden prepararse con portadores que protejan el compuesto contra la liberación rápida, como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Dichos portadores pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables y biocompatibles como el acetato de etileno vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Véase, p. ej., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En una realización, los compuestos de la presente invención pueden formularse para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Los soportes farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. También pueden incorporarse a las composiciones compuestos activos suplementarios.

Las composiciones farmacéuticas inyectables deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada del fármaco. El portador puede ser un disolvente

o medio de dispersión acuoso o no acuoso que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioles (como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como glicerol, manitol, sorbitol o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción del anticuerpo, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, p. ej. los enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de una microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios, por ejemplo, de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, algunos ejemplos de métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente filtrada estérilmente.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de una microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, algunos ejemplos de métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente filtrada estérilmente.

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos descritos en el presente documento se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y uniformizar la dosificación. La forma farmacéutica unitaria, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas farmacéuticas unitarias de la presente invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes al arte de componer dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Las dosis eficaces y las pautas posológicas de los anticuerpos antisinucleína dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden determinarse por los expertos en la materia. En cualquier día en que se administre una dosis, ésta puede oscilar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg/kg, y más habitualmente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg de peso corporal. Por tanto, las dosis ilustrativas incluyen: de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/kg/peso corporal, por ejemplo, aproximadamente 0,15 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 0,2 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 0,5 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 1,5 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 2 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal o aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal.

Un médico experto en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz necesaria de la composición farmacéutica. Por ejemplo, el médico podría iniciar las dosis del anticuerpo anti-alfa-sinucleína empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. La administración puede ser, p. ej., intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos adecuados a lo largo del día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias. Aunque es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos marcados de la invención pueden utilizarse con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o controlar enfermedades o trastornos. La invención proporciona la detección o diagnóstico de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo o cognitivo, que incluye pero no limitado a la enfermedad de Alzheimer,

que comprende: (a) detectar la existencia de fragmentos de A $\beta$  piroglutamados en células o muestras de tejido de un sujeto utilizando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a la alfa-sinucleína; y (b) comparar el nivel del antígeno con un nivel de control, por ejemplo, niveles en muestras de tejido normal, por lo que un aumento en el nivel ensayado del antígeno comparado con el nivel de control del antígeno es indicativo de la enfermedad o trastorno, o indicativo de la gravedad de la enfermedad o trastorno.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para analizar monómeros, oligómeros, formas fibrilares o fragmentos de alfa-sinucleína en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistoquímicos bien conocidos en la técnica. Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar proteínas son los inmunoensayos, como el inmunoensayo enzimático (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y los ensayos basados en plataformas de descubrimiento a mesoescala (MSD). En dichos kits y métodos pueden utilizarse etiquetas de anticuerpos adecuadas, y las etiquetas conocidas en la técnica incluyen etiquetas de enzimas, como la fosfatasa alcalina y la glucosa oxidasa; etiquetas de radioisótopos, como yodo ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ) azufre ( $^{35}\text{S}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), indio ( $^{121}\text{In}$ ) y tecnecio ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ); y etiquetas luminiscentes, como luminol y luciferasa; y etiquetas fluorescentes, como fluoresceína y rodamina.

La presencia de anticuerpos anti-alfa-sinucleína marcados o de sus fragmentos de unión a la alfa-sinucleína puede detectarse *in vivo* con fines diagnósticos. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar a un sujeto una cantidad eficaz de dicha molécula marcada; b) esperar un intervalo de tiempo tras la administración para permitir que la molécula marcada se concentre en los sitios (si los hay) de deposición de A $\beta$  y para permitir que la molécula marcada no unida se elimine hasta el nivel de fondo; c) determinar un nivel de fondo; y d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de forma que la detección de molécula marcada por encima del nivel de fondo sea indicativa de que el sujeto padece la enfermedad o trastorno, o sea indicativa de la gravedad de la enfermedad o trastorno. De acuerdo con dicha realización, la molécula se marca con un resto de formación de imágenes adecuado para la detección mediante un sistema de formación de imágenes particular conocido por los expertos en la materia. Los niveles de fondo pueden determinarse por diversos métodos conocidos en la técnica, incluida la comparación de la cantidad de anticuerpo marcado detectada con un valor estándar determinado previamente para un sistema de formación de imágenes concreto. Los métodos y sistemas que pueden utilizarse en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, entre otros, la tomografía computarizada (TC), el escáner de cuerpo entero como la tomografía por emisión de positrones (PET), la resonancia magnética (RM) y la ecografía.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención, para su uso en medicina.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención, para su uso en el tratamiento, diagnóstico o formación de imágenes de sinucleinopatías.

En una realización, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es para uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson idiopática, enfermedad difusa por cuerpos de Lewy (DLBD), variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV), enfermedad combinada de Alzheimer y Parkinson, insuficiencia autonómica pura o atrofia multisistémica.

En aspectos adicionales, la invención se refiere al uso del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, diagnóstico o formación de imágenes de sinucleinopatías.

En otros aspectos, la invención se refiere a un tratamiento, diagnóstico o formación de imágenes de la enfermedad de Parkinson u otras sinucleinopatías, que comprende la administración de una dosis eficaz de un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención.

Preferiblemente, en los usos y métodos de dichos aspectos de la invención, el tratamiento es crónico, y es preferiblemente durante al menos 2 semanas, tal como al menos durante 1 mes, 6 meses, 1 año o más.

En aspectos adicionales, la invención proporciona un kit que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención.

#### Secuencias

| SEQ ID NO | Descripción          |    |  |
|-----------|----------------------|----|--|
| 1         | $\alpha$ -sinucleína |    |  |
| 2         | Epítipo 126-140      |    |  |
| 3         | CDR1                 | VL |  |
| 4         | CDR2                 | VL |  |

| SEQ ID NO | Descripción       |    |            |
|-----------|-------------------|----|------------|
| 5         | CDR3              | VL |            |
| 6         | CDR1              | VH |            |
| 7         | CDR2              | VH |            |
| 8         | CDR3              | VH |            |
| 9         | CDR1              | VL | 7C4        |
| 10        | CDR1              | VL | 7A10 y 8D9 |
| 11        | CDR3              | VL | L3         |
| 12        | CDR1              | VH | 7C4        |
| 13        | CDR2              | VH | 5A1        |
| 14        | CDR2              | VH | 9G11       |
| 15        | CDR2              | VH | 9C12       |
| 16        | CDR3              | VH | 5A1        |
| 17        | CDR3              | VH | 9D7        |
| 18        | CDR3              | VH | 7A10 y 8D9 |
| 19        | Longitud completa | VL | m2E6       |
| 20        | Longitud completa | VH | m2E6       |
| 21        | Longitud completa | VL | ch2E6      |
| 22        | Longitud completa | VH | ch2E6      |
| 23        | Longitud completa | VL | 2E6-HLD1   |
| 24        | Longitud completa | VH | 2E6-HLD1   |
| 25        | Longitud completa | VL | 2E6-HLD2   |
| 26        | Longitud completa | VH | 2E6-HLD2   |
| 27        | Longitud completa | VL | 2E6-HLD3   |
| 28        | Longitud completa | VH | 2E6-HLD3   |
| 29        | Longitud completa | VL | 5A1        |
| 30        | Longitud completa | VH | 5A1        |
| 31        | Longitud completa | VL | 9D7        |
| 32        | Longitud completa | VH | 9D7        |
| 33        | Longitud completa | VL | 9G11       |
| 34        | Longitud completa | VH | 9G11       |
| 35        | Longitud completa | VL | 7C4        |
| 36        | Longitud completa | VH | 7C4        |
| 37        | Longitud completa | VL | L3         |
| 38        | Longitud completa | VH | L3         |
| 39        | Longitud completa | VL | 7A10       |
| 40        | Longitud completa | VH | 7A10       |
| 41        | Longitud completa | VL | 8D9        |
| 42        | Longitud completa | VH | 8D9        |
| 43        | Longitud completa | VL | 9C12       |
| 44        | Longitud completa | VH | 9C12       |
| 45        | Longitud completa | VL | 6B6        |
| 46        | Longitud completa | VH | 6B6        |
| 47        | Longitud completa | VH | 9E4        |

| SEQ ID NO | Descripción       |    |     |
|-----------|-------------------|----|-----|
| 48        | Longitud completa | VL | 9E4 |

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Descubrimiento de anticuerpos

#### A. Inmunización/Cribado de hibridomas

Los anticuerpos monoclonales contra la alfa-sinucleína se generaron inmunizando a ratones con diferentes agregados de sinucleína reticulados con, por ejemplo, aldehídos reactivos. El primer antígeno fue de alfa-sinucleína recombinante liofilizada de Rpeptide (4241 Mars Hill Road, Bogart, GA 30622, EE. UU.). Se elaboró disolviendo la proteína en PBS para obtener una solución 70 µM de alfa-sinucleína (1 mg/ml). La solución se incubó 18 horas a 37 grados C y se congeló en alícuotas de 100 µl. El segundo antígeno se elaboró de forma similar a partir de alfa-sinucleína recombinante (Rpeptide) disolviéndola a 70 microM en Tris 20 mM (pH=7,4), NaCl 0,15 M. Se añadió el aldehído reactivo UNO (4-oxo-2-Nonenal, N.º de cat. 10185 de Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) en una proporción molar de 20:1 para reticular covalentemente los oligómeros de alfa-sinucleína. La solución se incubó durante 18 horas a 37 °C (sin agitación). El que no reaccionó se eliminó mediante la columna de centrifugación Vivaspin500 (MWCO de 10 kDa) y las muestras se dializaron contra Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, y se congelaron en alícuotas. El tercer antígeno fue el fragmento de alfa-sinucleína recombinante de los aminoácidos 1-60 (Rpeptide) que se envió como polvo liofilizado (material original de Rpeptide). Brevemente, se inmunizó a tres ratones hembra (de 4 a 7 semanas de edad) y se les administró una dosis de refuerzo hasta tres veces. Se tomaron muestras de sangre de la cola y se analizaron en busca de anticuerpos antisinucleína mediante enzoinmunoanálisis (ELISA) contra el antígeno. El título se define por las diluciones de suero para alcanzar una lectura de DO de 3 veces la línea base en un ELISA. Los ratones que mostraron un título superior a 1:50.000 sobre el control fueron seleccionados para la fusión. Los esplenocitos recolectados se fusionaron con células de mieloma de ratón SP2/0, se diluyeron y se sembraron a partir de fusiones unicelulares. Se recogieron los sobrenadantes 14 días después de la fusión y se analizó la producción de anticuerpos. Utilizando el ELISA de sinucleína se recuperaron 50 clones positivos de ~1000 pocillos. Para el isotipado de inmunoglobulinas se utilizó un kit Clonotyping System/AP (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Se examinaron los 50 sobrenadantes anti-alfa-sinucleína para ver si reducían la acumulación de agregados de alfa-sinucleína atomarcados en el ensayo de células SKMEL5 como se describe en el ejemplo 6 (figura 7C). El anticuerpo comercial LB509 se incluyó como control positivo. Se observó que, de los 50 antisueros, solo 4 reducían la acumulación intracelular de alfa-sinucleína, y estos anticuerpos se utilizaron para la clonación. A continuación, estos cuatro anticuerpos se probaron en dosis-respuesta en el ensayo. El anticuerpo con mayor efecto, 2E6, fue seleccionado para una mayor caracterización en modelos relevantes de EP.

#### B. ELISA de sinucleína

Se analizó la unión de las fusiones positivas a anticuerpos mediante un ensayo ELISA de antígeno específico. Se recubrieron placas Corning de 96 pocillos de alta unión con 100 ng de sinucleína agregada. Los pocillos se bloquearon con leche al 5 % en PBS durante 1 hora (h) a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron 3 veces con PBS + Tween 20 al 1 %. Se añadieron 100 microlitros de sobrenadante de hibridoma a cada pocillo y las placas se incubaron a TA. Posteriormente, se añadió a cada pocillo un anticuerpo secundario IgG anti ratón de cabra conjugado con HRP (específico de la cadena H&L o específico de la cadena γ) para detectar la presencia del anticuerpo antisinucleína unido. Para la cuantificación se añadió sustrato, un componente TMB, y las placas se midieron a OD620.

#### C. Determinación de la secuencia de ADN de los dominios variables HC y LC de los anticuerpos

Se seleccionaron cuatro hibridomas positivos a la alfa-sinucleína y se extrajo el ARNm de los precipitados celulares. Se generaron ADNc de cada preparación de ARNm mediante transcriptasa inversa utilizando cebadores oligo(dT). Posteriormente, se realizaron reacciones de PCR utilizando cebadores de dominio variable para amplificar las regiones VH y VL de los genes HC y LC. El ADN amplificado se separó en un gel de agarosa y se aislaron los productos VH y VL, se purificaron del gel, se clonaron en pCR2.1 (Invitrogen) y se transformaron en células TOP10. Se seleccionaron un mínimo de 6 colonias positivas y se analizaron mediante secuenciación del ADN para determinar la secuencia de las regiones VH y VL.

### Ejemplo 2: Ingeniería de anticuerpos

#### Expresión de anticuerpos monoclonales

Se expandieron cultivos de clones de hibridoma y se purificaron anticuerpos monoclonales de ratón a partir de los sobrenadantes cultivados utilizando cromatografía de proteína G. Los anticuerpos recombinantes de ratón, humanos y quiméricos se produjeron mediante la cotransfección transitoria de los genes de las cadenas pesada y

ligera en células HEK293, la expansión de los cultivos, la recolección de los sobrenadantes y la purificación por cromatografía de proteínas. En los casos en que se necesitaron repetidamente cantidades de gramos de anticuerpos, se crearon líneas celulares estables en células CHO. Estas líneas celulares estables pudieron expandirse según las necesidades y la purificación de anticuerpos se realizó como antes.

### Clonación de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos monoclonales recombinantes se generaron por síntesis genética de los genes de las cadenas pesada y ligera (Geneart A/G). Los genes sintetizados se clonaron posteriormente en vectores de expresión estándar (por ejemplo, pcDNA3.1) para su expresión en cultivos celulares de mamíferos.

### Humanización

La humanización de m2E6 se llevó a cabo mediante el injerto de CDR basado en la estructura. Se examinaron las secuencias de aminoácidos de los dominios VL y VH de 2E6 en busca de homología con todas las secuencias de aminoácidos del marco VL y VH de anticuerpos humanos encontradas en las bases de datos PDB e IMGT. Se realizó un modelado estructural de la región Fv de m2E6 utilizando el anticuerpo 20SL de la base de datos PDB. Las secuencias de aminoácidos de 20SL son homólogas en un 82,7 % y un 83,2 % a los dominios VH y VL de 2E6, respectivamente. Cabe destacar que la estructura de 20SL se determinó con una resolución de 2,1 Å. La alineación estructural de la estructura humanizada 2E6 con 20SL permitió determinar restos importantes en las regiones de la estructura que podrían influir potencialmente en el plegamiento o la estructura local a través de impedimentos estéricos o fuerzas estéricas. Se empleó el modelado estructural teórico del anticuerpo humanizado para instruir sobre la importancia potencial de mantener restos específicos como el aminoácido original del ratón en la versión humanizada de 2E6 con el fin de mantener la especificidad y afinidad de unión. Se empleó el modelado estructural para optimizar la actividad de la 2E6 humanizada.

La humanización de la región VH de 2E6 se realizó injertando las CDR de VH en el marco del gen de la línea germinal humana, IGHV1-46\*01 (69 % de homología). Existen 23 diferencias de aminoácidos entre la 2E6 de ratón y las regiones marco humanas seleccionadas. El modelado estructural identificó 7 posiciones de aminoácidos en las que el cambio al residuo humano tenía el potencial de afectar negativamente a la actividad de 2E6. Estos restos fueron retro-mutados a los aminoácidos originales del ratón. Se produjeron tres versiones diferentes de la cadena pesada humanizada. HLD-1 humanizado contiene las 7 mutaciones posteriores, M37V, I48M, A68V, L70M, V72R, K74T, A79V, HLD-2 contiene I48M, A68V, L70M, V72R, K74T, A79V, y HLD-3 contiene M37V, I48M, L70M, V72R, K74T, A79V.

La humanización de la región VL de 2E6 se realizó injertando las CDR de VL en el marco del gen de la línea germinal humana, IGKV3-11\*01 (64 % de homología). Hay 26

diferencias de aminoácidos entre la 2E6 de ratón y las regiones marco humanas seleccionadas. El modelado estructural identificó 4 posiciones de aminoácidos, R45L, W46L, V57I, Y70F, donde el cambio al residuo humano tenía el potencial de impactar negativamente en la actividad de 2E6. En el caso de HLD-1, HLD-2 y HLD-3, los 4 restos se volvieron a mutar a los aminoácidos originales del ratón.

HLD-1, HLD-2 y HLD-3 se expresaron transitoriamente en células HEK293. Los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes cultivados y posteriormente se analizó su unión a la sinucleína mediante SPR (Biacore 3000) utilizando el formato de ligando de sinucleína (tabla 5).

**Tabla 5: Análisis cinético de la unión de diferentes clones 2E6 humanizados y 2E6 quiméricos**

|       | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KA (1/M) | KD (nM)  | Chi2 | Mejora de KD |
|-------|-----------|----------|----------|----------|------|--------------|
| Ch2E6 | 6,29E+04  | 2,65E-04 | 2,38E+08 | 4,21E-09 | 3,57 | 1            |
| HLD1  | 1,23E+05  | 2,12E-04 | 5,81E+08 | 1,72E-09 | 4,56 | 2            |
| HLD2  | 5,80E+04  | 2,85E-04 | 2,04E+08 | 4,91E-09 | 4,34 | 1            |
| HLD3  | 4,89E+04  | 2,60E-04 | 1,88E+08 | 5,32E-09 | 2,79 | 1            |

La maduración de la afinidad de HLD1 se realizó mediante mutaciones aleatorias en la CDR3 de la cadena ligera mediante cebadores PCR degenerados basados en codones, y mutaciones aleatorias similares en la CDR3 de la cadena pesada mediante cebadores PCR degenerados basados en codones y utilizando la evolución *in vitro* con PCR propensa a errores. Los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes cultivados y posteriormente se analizó su unión a la sinucleína mediante SPR (Biacore 3000) utilizando IgG capturadas mediante Ab IgG antihumano inmovilizado en el chip CM5 (Tabla 6).

**Tabla 6: Análisis cinético de la unión de diferentes versiones con la afinidad madurada del clon 2E6 humanizado HLD1 - tras la primera ronda de maduración de la afinidad**

|       | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KA (1/M) | KD (M)   | Chi2  | Mejora de KD |
|-------|-----------|----------|----------|----------|-------|--------------|
| Ch2E6 | 2,45E+04  | 1,39E-03 | 1,76E+07 | 5,67E-08 | 0,22  | 1            |
| HLD1  | 4,16E+04  | 9,44E-04 | 4,40E+07 | 2,27E-08 | 0,164 | 2,5          |
| L3-11 | 1,45E+05  | 3,16E-04 | 4,60E+08 | 2,18E-09 | 0,285 | 26           |
| 7A10  | 5,17E+04  | 2,85E-04 | 1,81E+08 | 5,52E-09 | 0,297 | 10,3         |
| 9C12  | 4,95E+04  | 2,78E-04 | 1,78E+08 | 5,62E-09 | 0,631 | 10           |
| 8D9   | 7,41E+04  | 4,83E-04 | 1,53E+08 | 6,52E-09 | 0,301 | 8,7          |
| 7C4   | 1,23E+05  | 9,97E-04 | 1,23E+08 | 8,12E-09 | 1,04  | 7            |

5 Tras la primera ronda de maduración de la afinidad, construimos 4 mutaciones (A, B, C, D): A) combinó las dos mutaciones en la CDR2 de la cadena pesada (mutó KYNVNFKT en KYNVNIKT) y la CDR3 de la cadena pesada (mutó LGHYGNLYAMDY en LGHYGNLYAKDY); B) incorporó la mutación CDR1 de la cadena ligera (mutó SASSSVSYMH en SASSSVSYIH) en la cadena ligera L3-11; C) incorporación de la mutación de la estructura de la cadena ligera (mutación de PRRWIY por PRRLIY, inmediatamente antes de la CDR2) en la cadena ligera L3-11; y D) incorporación de la mutación de la CDR1 de la cadena ligera (mutación de SASSSVSYMH por SASSSVSYIH) y de la mutación de la estructura de la cadena ligera (mutación de PRRWIY por PRRLIY) en la cadena ligera L3-11. Basándonos en los datos de Biacore y en la secuencia de anticuerpos, probamos la coexpresión de la cadena ligera y la cadena pesada con varias combinaciones:

- 15 1. L3-11 cadena ligera + 9C12 cadena pesada
2. L3-11 cadena ligera + 8D9 cadena pesada
3. 7A10 cadena ligera + 9C12 cadena pesada
- 20 4. L3-11 cadena ligera + A
5. 7A10 cadena ligera + A
- 25 9. B + 9C12 cadena pesada
10. C + 9C12 cadena pesada
11. D + 9C12 cadena pesada
- 30 12. B + 8D9 cadena pesada
13. C + 8D9 cadena pesada
- 35 14. D + 8D9 cadena pesada
15. B + cadena pesada
16. C + cadena pesada
- 40 17. D + cadena pesada

Los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes cultivados y posteriormente se analizó su unión a la sinucleína mediante SPR (Biacore 3000) utilizando IgG capturadas mediante Ab IgG antihumano inmovilizado en el chip CM5 (Tabla 7).

**Tabla 7: Análisis cinético de unión de diferentes versiones con la afinidad madurada del clon 2E6 humanizado HLD1 - tras la combinación de mutaciones.**

|       | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KA (1/M) | KD (M)   | Chi2  | Mejora de KD |
|-------|-----------|----------|----------|----------|-------|--------------|
| Ch2E6 | 2,45E+04  | 1,39E-03 | 1,76E+07 | 5,67E-08 | 0,22  | 1            |
| HLD1  | 4,16E+04  | 9,44E-04 | 4,40E+07 | 2,27E-08 | 0,164 | 2,5          |



|         | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KA (1/M) | KD (M)   | Chi2 | Mejora de KD |
|---------|-----------|----------|----------|----------|------|--------------|
| HLD1-14 | 1,35E+05  | 5,60E-05 | 2,42E+09 | 4,14E-10 | 0,03 | 137,0        |
| HLD1-12 | 2,47E+05  | 1,12E-04 | 2,21E+09 | 4,51E-10 | 0,12 | 125,7        |
| HLD1-13 | 1,46E+05  | 7,07E-05 | 2,07E+09 | 4,83E-10 | 0,11 | 117,4        |
| HLD1-15 | 2,58E+05  | 1,25E-04 | 2,06E+09 | 4,85E-10 | 0,09 | 116,9        |
| HLD1-9  | 2,60E+05  | 1,33E-04 | 1,94E+09 | 5,14E-10 | 0,06 | 110,3        |
| HLD1-16 | 1,53E+05  | 8,97E-05 | 1,71E+09 | 5,85E-10 | 0,14 | 96,9         |
| HLD1-2  | 2,38E+05  | 1,52E-04 | 1,57E+09 | 6,36E-10 | 0,06 | 89,2         |
| HLD1-3  | 9,99E+04  | 1,26E-04 | 7,94E+08 | 1,26E-09 | 0,06 | 45,0         |
| HLD1-5  | 9,29E+04  | 1,28E-04 | 7,27E+08 | 1,38E-09 | 0,03 | 41,1         |

### Ejemplo 3: Mapeo de epítomos

El mapeo de epítomos de los anticuerpos contra la alfa-sinucleína se realizó con matrices de péptidos lineales superpuestos en Pepscan (Pepscan Zuidersluisweg 2 8243 RC Lelystad Países Bajos). La unión del anticuerpo a cada uno de los péptidos con 20 unidades monoméricas sintetizados se probó en un ELISA basado en Pepscan. La matriz de péptidos lineales que cubría toda la secuencia codificante de la alfa-sinucleína, así como todos los péptidos con metioninas oxidadas o tirosinas nitrosiladas, se incubaron con la solución de anticuerpo primario (toda la noche a 4 °C). Después del lavado, las matrices de péptidos se incubaron con una dilución 1/1000 de un conjugado de anticuerpo y peroxidasa (SBA, n.º de cat. 2010-05) durante una hora a 25 °C. Después del lavado, se añadieron el sustrato de peroxidasa, sulfato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) y 2 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 por ciento. Al cabo de una hora, se midió el revelado del color. El revelado del color se cuantificó con un dispositivo de carga acoplada (CCD) - cámara y un sistema de procesamiento de imágenes. Para el procesamiento de datos se obtuvieron los valores del rango de la cámara CCD de 0 a 3000 mAU, similar al de un lector ELISA estándar de placas de 96 pocillos. Los resultados se cuantificaron y almacenaron en la base de datos Peplab. Ocasionalmente, un pocillo contiene una burbuja de aire que da lugar a un valor falso positivo; las tarjetas se inspeccionan manualmente y cualquier valor causado por una burbuja de aire se puntúa como 0.

Los resultados pueden verse en la figura 2 para m2E6.

### Ejemplo 4: Inmunoprecipitación de alfa-sinucleína a partir de homogeneizados cerebrales humanos de corteza cingulada de pacientes con demencia por cuerpos de Lewy y de controles sanos

*Niveles de alfa-sinucleína y alfa-sinucleína fosforilada (Ser129) en homogeneizados cerebrales de pacientes con demencia por cuerpos de Lewy (DCL) y controles sanos de edad coincidente (CTR).*

Se utilizaron muestras de corteza cingulada de cinco cerebros de pacientes con demencia por cuerpos de Lewy (DCL) y cinco muestras de cerebros de controles sanos de edad coincidente (CTR). Bloques de tejido de aprox. 50-100 mg se homogeneizaron en un tampón de lisis celular CellLytic™ M (Sigma) con un homogeneizador de tejidos Precellys CK-14 seguido de un centrifugado de 30 min a 3000 g, obteniéndose fracciones S1 y P1. La fracción de sobrenadante (S1) contiene la alfa-sinucleína total soluble en detergente, la fracción de sedimento (P1) contiene la alfa-sinucleína insoluble en detergente (cuerpos de Lewy). Una centrifugación adicional de la fracción S1 durante 30 min a 20.000g (P2) contiene formas agregadas de alfa-sinucleína solubles en detergente y un centrifugado a 186.000g (P3) contiene formas agregadas más pequeñas de alfa-sinucleína solubles en detergente y el sobrenadante restante (S2) contiene la alfa-sinucleína monomérica.

La figura 3 muestra la diferencia en el contenido de alfa-sinucleína en los cinco homogeneizados cerebrales de pacientes con demencia por cuerpos de Lewy (DCL) y cinco controles sanos de edad coincidente (CTR). (Cinco carriles en el recuadro "alfa-sin" y "P-Alfa-sin(S129)" representan a los cinco pacientes diferentes y a los cinco controles) en las fracciones S1, P1, P2, P3 y S2. El nivel de alfa-sinucleína soluble es similar en la DCL y la RTC (figura 3, panel izquierdo, "alfa-sin" en S1 y S2), mientras que hay una mayor cantidad de alfa-sinucleína insoluble en la DCL (fracción P1), detectada con un anticuerpo monoclonal de ratón anti alfa-sinucleína humana (4B12, Thermo Scientific). El nivel de alfa-sinucleína insoluble fosforilada en la serina 129 (figura 3, panel derecho "P-Alfa-sin(S129)" está aumentado en la DCL (fracción P1, P2 y P3) según se detecta con el anticuerpo monoclonal anti Ser-129-fosforilada (ab51253, abcam).

### Inmunoprecipitación de alfa-sinucleína a partir de fracciones enriquecidas en formas patológicas de alfa-sinucleína

La capacidad de los anticuerpos para unirse a la alfa-sinucleína y extraerla de las fracciones S1, P1 y P2 de las fracciones combinadas de la corteza cingulada del cerebro humano de los cinco pacientes con DCL, se analizó

mediante inmunización. Para la inmunoprecipitación, se inmovilizaron 2 µg de anticuerpo en Dynabeads magnéticas de proteína G, seguida de una inmunoprecipitación de 90 min a temperatura ambiente. El rendimiento de la inmunoprecipitación se visualizó mediante transferencia de Western con anticuerpo de detección monoclonal de ratón anti alfa-sinucleína humana (4B12, Thermo Scientific). La cantidad de alfa-sinucleína arrastrada difiere entre m2E6 de ratón, 2E6-HLD-1 humanizado y el anticuerpo 9E4 (SEQ ID NO: 47 y 48). Además, los patrones de las bandas que representan las diferentes formas de peso molecular de la alfa-sinucleína arrastrada difieren entre los anticuerpos 2E6 y el anticuerpo de comparación 9E4, figura 4.

La inmunoprecipitación de alfa-sinucleína de cerebros humanos demuestra que m2E6 y las variantes humanizadas 2E6-HLD1-3 son marcadamente diferentes de 9E4. 2E6 y las variantes humanizadas son capaces de inmunoprecipitar versiones de menor peso molecular, sometidas a corte y empalme alternativo o truncadas de alfa-sin, mientras que 9E4 no. Además, 2E6 y las variantes humanizadas reconocen las formas patológicas agregadas de alfa-sinucleína en las fracciones P1 y P2, mientras que 9E4 no lo hace (fig 4).

#### **Ejemplo 5: Inhibición *in vitro* de la agregación de alfa-sinucleína y disociación de fibrillas preformadas de alfa-sinucleína.**

##### ***Inhibición de la agregación de alfa-sinucleína in vitro***

La agregación de alfa-sinucleína en conjuntos fibrilares, cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy (LN), es una de las principales características de la enfermedad de Parkinson. La formación de fibrillas es un proceso de polimerización complejo, caracterizado por un perfil de crecimiento sigmoidal. El método de la tioflavina T (ThT) se utilizó para detectar la agregación de la alfa-sinucleína *in vitro* (Giehm y Otzen, 2010, Anal Biochem. 15;400(2):270-81.; Giehm et al. 2011, Methods;53(3):295-305). En este ensayo probamos el efecto de m2E6 para la reducción de la agregación de alfa-sinucleína cuando se co-incubó con monómeros de alfa-sinucleína en diferentes proporciones. Brevemente, se cargaron placas de 96 pocillos con la mezcla de alfa-sinucleína, ThT y anticuerpo, selladas con cinta selladora Crystal Clear (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, EE. UU.) para evitar la evaporación. Las placas se cargaron en un lector de placas de fluorescencia Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Suiza) o en un Genios Pro (Tecan) y se incubaron a 37 °C. Las muestras agitadas se agitaron con agitación orbital o lineal (300 rpm) durante un periodo aproximado de 50 min/h. La fluorescencia del ThT se midió con excitación a 450 nm y emisión a 485 nm. Para las muestras agitadas, la emisión de ThT se midió a intervalos de 10 minutos en una placa de 96 pocillos. La señal del tampón se restó de todos los datos. Los resultados mostraron que m2E6 inhibía la fibrilación de la alfa-sinucleína casi por completo a mayor proporción molar (anticuerpo:alfa-sinucleína) (figura 5).

##### ***Disociación de las fibrillas de alfa-sinucleína***

Las fibrillas preformadas de alfa-sinucleína de ratón (Mo-PFFs) se generaron a partir de alfa-sinucleína monomérica de ratón utilizando el protocolo de Virginia Lee/Kelvin Luk (Luk et al, Science, 2012, 16;338(6109):949-53). Estos Mo-PFF se han caracterizado por sus propiedades fisicoquímicas (mediante transferencia de Western y microscopía electrónica) y biológicas (por captación y toxicidad en células). Un paso importante en la preparación de las fibrillas preformadas (PFF) es el tratamiento con ultrasonidos poco antes de la inyección o el uso en, por ejemplo, células, para disociar los agregados más grandes de PFF que no pueden ser absorbidos por las células. Con el fin de decidir el protocolo óptimo de tratamiento con ultrasonidos (intensidad/fuerza y tiempo) se probaron diferentes paradigmas de tratamiento con ultrasonidos. Las fibrillas preformadas tratadas con ultrasonidos se incubaron con anticuerpo (ab) en diferentes proporciones molares a temperatura ambiente durante 24 horas. Todas las muestras se conservaron en hielo seco antes de analizarlas mediante tinción negativa y microscopía electrónica de transmisión. Mediante incubación de las PFF de α-sinucleína con concentraciones crecientes de m2E6 en proporciones molares de ab: sinucleína a 1:100, 1:20 y 1:10 las microfibrillas restantes eran pequeñas, lineales y singulares. Todas las concentraciones de ab probadas fueron capaces de impedir que las microfibrillas se reasociaran en grandes redes de fibrillas y posiblemente incluso de disociarlas aún más. Los resultados mostraron que concentraciones crecientes de m2E6 muestran efectos crecientes en el mantenimiento de las fibrillas como microfibrillas (figura 6).

#### **Ejemplo 6: Datos del modelo celular**

##### ***2E6 se une a las fibrillas de alfa-sinucleína en el medio e inhibe su acumulación en líneas celulares humanas de neuroblastoma y melanoma.***

##### ***Descripción de la preparación de fibrillas***

La alfa-sinucleína recombinante se encargó a rPeptide (n.º de catálogo S-1001-2) y se disolvió según las recomendaciones del fabricante en agua bidestilada, obteniéndose una solución de 1 mg/ml en Tris-HCL 20 mM/NaCl 100 mM, pH = 7,4. La alfa-sinucleína se marcó fluorescentemente con Atto488 utilizando Atto488 Protein Labeling Kit de Sigma (n.º 38371). Se hizo una mezcla de 30 % de alfa-sinucleína marcada con Atto488 y 70 % sin marcar, y esta mezcla se incubó a 37 °C con agitación (300 rpm) durante 2 días, luego una pausa de 3 días, luego 1 día de agitación, luego 1 día de pausa, luego 4 días de agitación. A continuación, se recogieron las

fibrillas y se conservaron a -20 °C hasta su utilización. Cuando se utilizaron fibrillas en ensayos celulares, siempre se trataron con ultrasonidos durante 5 minutos, ajustando un ciclo del 5,50 %, con un sonicador de sonda de cuerno, inmediatamente antes de la adición.

## 5 ***Inmunoprecipitación de fibrillas de alfa-sinucleína en medios***

La capacidad de los anticuerpos para unirse a, y extraer, fibrillas de alfa-sinucleína disueltas en medio DMEM (como el utilizado en los ensayos celulares) se analizó mediante inmunoprecipitación. Se inmovilizaron 2 µg de anticuerpo en Dynabeads magnéticas de proteína G seguido de inmunoprecipitación a los 90 min a temperatura ambiente. El rendimiento de la inmunoprecipitación se visualizó mediante transferencia de Western con detección ab anti alfa-sinucleína humana, Ab1904. Esto demostró que m2E6 era capaz de extraer fibrillas de alfa-sinucleína del medio, mientras que B12 (IgG humana no reactiva) y 5G4 (anti-alfa-sinucleína de Roboscreen) no, figura 7A.

## 15 ***Inhibición de la acumulación mediada por anticuerpos en células SHSY-5Y***

SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) se encargó a la ATCC y se cultivó según las directrices de la ATCC. Las células se sembraron en placas recubiertas de colágeno a una densidad de 40.000 células/pocillo. Tras un día de fijación, las células se trataron con fibrillas de alfa-sinucleína y anticuerpos (ambos a 10 µg/ml) añadidos directamente al medio. A continuación, las células se dejaron incubar durante 24 horas, tras lo cual se lavaron y lisaron. La transferencia de Western se realizó en la fracción citoplasmática con el anticuerpo 1904 de Abcam. Esto demostró que 2E6-HLD1 redujo la cantidad de fibrillas acumuladas en las células, mientras que un anticuerpo sin afinidad hacia la alfa-sinucleína B12 no lo hizo, fig. 7B.

## 25 ***Inhibición de la acumulación mediada por anticuerpos en células SK-mel5***

La línea celular de melanoma humano SK-mel5 (ATCC, HTB-70) se cultivó según las directrices de la ATCC. Las células se sembraron a una densidad de 3000 células por pocillo en placas Falcon BD de 96 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. Se añadieron a las células fibrillas de alfa-sinucleína marcadas con Atto488 (0,01 mg/ml) junto con el anticuerpo m2E6 (0,01 mg/ml) y los péptidos de alfa-sinucleína 113-125 o 126-140 (0,01 mg/ml). Tras 24 horas de incubación, las células se lavaron dos veces en PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 %. A continuación, las células se tiñeron con Hoechst y se leyeron en Cellomics ArrayScan. Los núcleos se detectaron en un canal y definieron el número de objetos válidos. Las fibrillas marcadas con Atto488 se detectaron en otro canal en una zona predefinida en forma de anillo que rodeaba el núcleo, representando así el citoplasma de las células. Se cuantificó el porcentaje de células que contenían puntos de alfa-sinucleína. El resultado muestra que en las células que no presentaban fibrillas, solo había un fondo muy bajo de células que contenían puntos (el fondo se debía probablemente a la autofluorescencia) fig 7C. En las células a las que solo se administraron fibrillas, el 75 % de las células habían acumulado puntos intracelulares. En las células coincubadas con fibrillas y el anticuerpo m2E6, solo había alrededor de un 30 % de células con puntos positivos. Cuando las células se coincubaron con fibrillas, m2E6 y el péptido 126-140, hubo alrededor de un 60 % de células positivas, por lo que el péptido inhibió significativamente el efecto de m2E6. La coincubación del péptido 113-120 con fibrillas y 2E6 no modificó el efecto de m2E6. La incubación de las fibrillas junto con cualquiera de los péptidos 113-120 o 126-140 no tuvo ningún efecto sobre la acumulación de fibrillas en las células. Por tanto, m2E6 se une a las fibrillas de alfa-sinucleína en solución e inhibe su acumulación en las células. Este efecto es específico, ya que pudo ser inhibido por el péptido 126-140, pero no por el 113-120 (figura 7C).

El tratamiento con dosis crecientes de 2E6-HLD1-7A10 mostró una reducción dependiente de la dosis del porcentaje de células con puntos. Las células tratadas con el anticuerpo de control irrelevante (B12) no mostraron ningún efecto (Figura 7D).

## 50 ***m2E6 se une a la alfa-sinucleína oligomerizada producida en mamíferos en medios e inhibe su acumulación en neuronas corticales primarias***

La capacidad de los anticuerpos para unirse a, y extraer, oligómeros de alfa-sinucleína disueltos en medio DMEM se analizó mediante inmunoprecipitación. Se inmovilizaron 2 µg de anticuerpo en Dynabeads magnéticas de proteína G seguido de inmunoprecipitación 90 min a temperatura ambiente. El rendimiento de la inmunoprecipitación se visualizó mediante transferencia de Western con anticuerpo de detección, anticuerpo monoclonal anti-alfa-sinucleína humana (4B12) (MA1-90346, Pierce). Esto demostró que todas las variantes 2E6 arrastraban los oligómeros de alfa-sinucleína del medio (figura 8A). Los comparadores m9E4 y h9E4 también extrajeron oligómeros, pero h9E4 parece menos eficaz (banda mucho más débil a 14 kDa). Otro anticuerpo comparador de la alfa-sinucleína (12F4 de Biogen) dio solo una banda débil que no era muy diferente del anticuerpo de control B12 (figura 8A).

Las neuronas corticales primarias de ratón se prepararon a partir de embriones E14 diseccionando la región cortical y homogeneizándolas en una solución de tripsina. A continuación, las células se lavaron y resuspendieron en medio DMEM, se contaron y se sembraron a razón de 60000 células por pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas previamente con polilisina. Después de 4 horas, el medio se cambió a Neurobasal con suplemento de B27. Tras

2 días de cultivo, se añadió citoarabinosida para inhibir el crecimiento de los astrocitos. En DIV7, las células se trataron con PFF de Sin-BAP (DIV = días de cultivo *in vitro* - PFF de asin-BAP = péptido aceptor de biotina de alfa-sinucleína marcado con fibrillas preformadas), 10 µg/ml junto con anticuerpos a 25 µg/ml y se incubó durante 24 horas. A continuación, se lavaron las células y se fijaron añadiendo 100 µl de paraformaldehído al 8 % directamente a los 100 µl de medio de los pocillos. La detección de agregados intracelulares de PFF de Sin-BAP se realizó mediante inmunocitoquímica con el anticuerpo 15G7 (Enzo) y un anticuerpo secundario anti-rata marcado con FITC en las células después de la permeabilización y bloqueo con BSA (1 %) o con estreptavidina-Atto488 (Sigma) añadida a las células permeabilizadas (Sin-BAP tiene un marcador de biotina y por lo tanto puede detectarse por la estreptavidina). Los núcleos se detectaron mediante tinción de Hoechst. La cuantificación de la tinción se realizó mediante Cellomics ArrayScan. Los núcleos se detectaron en un canal y definieron el número de objetos válidos. En otro canal se detectaron puntos verdes en una zona predefinida en forma de anillo que rodeaba el núcleo, representando así el citoplasma de las células. Se calculó el número medio de puntos por célula. En la fig. 8B se muestra un ejemplo de las células. Hubo algo de tinción de fondo con la detección basada en estreptavidina-Atto488 de los agregados de PFF de Sin-BAP (las células no tratadas mostraron tener una media de un punto por célula), pero todavía había una diferencia significativa con las células tratadas con PFF de Sin-BAP solas (tenían aproximadamente 1,8 puntos por célula), fig. 8C. La coincubación de los PFF de Sin-BAP con B12 no reactivo o con el anticuerpo 9E4 no modificó la acumulación de PFF Sin-BAP en las células, mientras que el tratamiento con m2E6 o 2E6-HLD1 redujo el nivel de acumulación al nivel de fondo (figura 8C). En el otro experimento, las células tratadas únicamente con PFF de Sin-BAP mostraron alrededor de 4,5 puntos por célula; de nuevo B12 o 9E4 no cambiaron esto significativamente. El tratamiento con m2E6, 2E6-HLD2 o 2E6-HLD3 redujo significativamente el nivel de acumulación (a unos 3 puntos por célula) (figura 8D).

#### ***Inhibición mediada por anticuerpos de la transferencia de fibrillas de alfa-sinucleína de célula a célula en una línea celular de melanoma humano***

Para investigar si nuestros anticuerpos también tienen un efecto sobre la transferencia de fibrillas de alfa-sinucleína de célula a célula, hemos desarrollado un ensayo como el siguiente: La línea celular de melanoma humano SK-mel5 (ATCC, HTB-70) se cultivó según las directrices de la ATCC. Las células se sembraron a una densidad de 3000 células por pocillo en placas Falcon BD de 96 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. En una placa (denominada "placa alimentadora"), las células recibieron fibrillas de alfa-sinucleína marcadas con Atto488 tratadas con ultrasonidos a una concentración final de 0,01 mg/ml durante 24 horas. A continuación, las células se lavaron dos veces con medio fresco y luego se añadieron anticuerpos a las células en el medio. Tras 24 horas de incubación, los medios de los pocillos individuales se transfirieron directamente a una nueva placa de células SK-mel5 (la "placa receptora"). La "placa alimentadora" se fijó inmediatamente añadiendo paraformaldehído al 4 %, mientras que la "placa receptora" se dejó otras 24 horas antes de la fijación (añadiendo paraformaldehído al 8 % directamente en el medio). Ambas placas se mantuvieron en la oscuridad y se tiñeron con Hoechst y luego se leyeron en Cellomics ArrayScan. Los núcleos se detectaron en un canal y definieron el número de objetos válidos. Las fibrillas marcadas con Atto488 se detectaron en otro canal en una zona predefinida en forma de anillo que rodeaba el núcleo, representando así el citoplasma de las células. Se cuantificó el porcentaje de células que contenían agregados de alfa-sinucleína (puntos) en la zona anular que definía las células.

La idea es que las fibrillas de alfa-sinucleína internalizadas hasta cierto punto por las células de la placa "alimentadora" se omitan de nuevo y se transfieran así a través de los medios acondicionados a las células de la placa "receptora". Así, podemos medir el efecto de los anticuerpos sobre el proceso de eliminación en las células "alimentadoras" (un efecto intracelular) y sobre la inhibición de la transferencia a las células de la placa "receptora". Podemos demostrar que una cantidad significativa de fibrillas de alfa-sinucleína se transfiere realmente de las células de la placa "alimentadora" a las células de la placa "receptora" (60 % de células positivas en la "alimentadora" - 37 % positivas en la "receptora").

Se demostró que m2E6, en comparación con las fibrillas, reduce significativamente el número de células con manchas de alfa-sinucleína tanto en la placa "alimentadora" como en la "receptora" (figura 9). El anticuerpo de comparación 1H7 (documento WO2007021255) no tuvo efecto en ninguna de las placas. Un anticuerpo de control (B12) tampoco tuvo efecto. El anticuerpo comercial LB509 (Abcam) fue capaz de reducir los niveles intracelulares de alfa-sinucleína en la placa "alimentadora", pero no redujo significativamente la cantidad de alfa-sinucleína transferida. Figura 9.

#### ***Inhibición de la siembra de alfa-sinucleína mediada por anticuerpos***

Para mostrar el efecto de la inhibición de la siembra de alfa sinucleína intracelular mediada por anticuerpos, se preparó un ensayo de siembra basado en células HEK293. En este ensayo, el día 1, las células HEK293 se transfectan con un plásmido de control (pcADN) o de expresión de ADNc de alfa-sinucleína (TS, con marcador de HA) y se colocan en placas de 6 pocillos. El día 2, las fibrillas de alfa-sinucleína (semillas) se mezclan con diferentes concentraciones de anticuerpos y se transfectan en las células utilizando lipofectamina. El día 3, se tripsinizan las células, se dividen y se vuelven a colocar en 6 pocillos. El día 4, se recogen las células y se lisan en tampón Triton. Los lisados celulares se ultracentrifugan y el sobrenadante se guarda como Triton o fracción soluble. Los gránulos se resuspenden en tampón SDS, se ultracentrifugan y el sobrenadante se etiqueta como fracción soluble o

insoluble en SDS. Ambas fracciones, soluble e insoluble, se corren en gel SDS y se detectan la alfa-sinucleína total y la alfa-sinucleína fosforilada (S129P) mediante el anticuerpo 4B12/1904 (sinucleína humana total) y el anticuerpo S129P-asyn (abcam 51253), respectivamente. La proporción de alfa-sinucleína fosforilada/beta-actina en la fracción soluble en SDS se utiliza para calcular los niveles de alfa-sinucleína agregada insoluble que se forma en respuesta a la adición de semillas más menos 2E6-HLD1.

La transfección con el plásmido de la alfa-sinucleína seguida de la transfección de las fibrillas de alfa-sinucleína promueve la agregación y la fosforilación de la alfa-sinucleína, lo que se indica por la presencia de agregados de alfa-sinucleína de mayor peso molecular en la fracción insoluble en la transferencia de Western. Debido a la presencia de la etiqueta HA, la alfa sinucleína transfectada corre más alto y se diferencia de la alfa sinucleína endógena o de las fibrillas transfectadas que corren alrededor de 17 kD.

La mezcla de la versión humanizada de m2E6, 2E6-HLD1, con las fibrillas de alfa sinucleína disminuye la agregación y la fosforilación de alfa sinucleína en comparación con el anticuerpo de control del isotipo B12. (Fig.10A). Existe una inhibición dependiente de la dosis con HLD1 en la fosforilación de la alfa sinucleína (fig. 10B).

### **Ejemplo 7: Datos agudos *in vivo* en ratones transgénicos F28-snca**

#### ***Efectos electrofisiológicos agudos de los anticuerpos contra $\alpha$ -sinucleína *in vivo*.***

El hipocampo de los ratones transgénicos F28-snca presenta altos niveles de expresión de  $\alpha$ -sinucleína humana. La evaluación electrofisiológica *in vivo* de la transmisión sináptica y la plasticidad en el área CA1 del hipocampo en ratones transgénicos F28snca macho de 4 a 6 meses de edad y ratones de control de edad coincidente mostró que i) la transmisión sináptica basal está significativamente deteriorada en los transgénicos F28 snca en comparación con los ratones de control de edad coincidente, y ii) la facilitación de impulsos emparejados está significativamente aumentada en los transgénicos F28 snca en comparación con los ratones de control de edad coincidente (figura 11).

Todos los experimentos se llevaron a cabo según la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/CEE) para el cuidado y la utilización de animales de laboratorio y la legislación danesa que regula los experimentos con animales.

En los presentes estudios se utilizaron ratones transgénicos F28-snca y ratones macho de control de edad coincidente (Taconic Europe A/S) de entre 4 y 6 meses de edad. Los ratones se alojaron en una sola nave a temperatura controlada ( $22 \pm 1,5$  °C) y en condiciones de humedad (55-65 %) y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas (luces encendidas a las 06:00 h). La comida y el agua estaban libremente disponibles.

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal (i.p.) de uretano (1,2 g/kg). A continuación, se montaron los ratones en un marco estereotáxico, se ajustó su temperatura a 37,5 °C mediante una almohadilla térmica y se expuso el cráneo. Se colocó un alambre de platino en el hueso frontal para que sirviera de referencia, y se perforó un orificio adicional para la inserción de los electrodos de registro y estimulación en el hipocampo, en las siguientes coordenadas según el atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos y Franklin, 2001): registro, 1,5-1,7 mm posterior a Bregma, 1,0-1,2 mm lateral a la línea media, 1,4-1,7 mm por debajo de la superficie del cerebro; estimulación, 1,8-2,0 mm posterior a Bregma, 1,5-1,7 mm lateral a la línea media, 1,5-1,7 mm por debajo de la superficie del cerebro. Se dejó a los animales en el marco estereotáxico durante toda la duración de las grabaciones y se comprobó periódicamente su nivel de anestesia.

Se evocaron potenciales de campo (fEPSP) en la CA1 mediante estimulación eléctrica del colateral de Schaffer cada 30 segundos (s), y se ajustó la profundidad del electrodo de registro hasta que se registró un fEPSP negativo en respuesta a un pulso cuadrado unipolar. La pendiente de la fEPSP evocada se midió entre el 30 y el 70 % de la amplitud máxima de la fEPSP.

Una vez inducida una fEPSP óptima, se evaluó la transmisión sináptica basal mediante la relación entre la intensidad de estimulación y la pendiente de la fEPSP evocada (relación entrada-salida). Las diferentes intensidades de estimulación fueron 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 y 500  $\mu$ A, y se aplicaron sucesivamente en orden creciente, con 2 a 3 repeticiones para cada intensidad. Se observó que la transmisión sináptica basal estaba significativamente alterada en los ratones transgénicos F28 snca en comparación con los ratones de control de edad coincidente (véase la figura 11a).

La facilitación del pulso emparejado, una plasticidad sináptica a corto plazo que se cree que depende de mecanismos presinápticos, se midió además en ratones transgénicos F28snca y ratones de control de edad coincidente. Brevemente, se aplicó al colateral de Schaffer un par de estímulos con un intervalo entre estímulos (ISI) que variaba de 25 a 1000 ms, y se comparó la pendiente de la segunda fEPSP con la pendiente de la primera fEPSP. Se observó facilitación en todos los ISI, con una facilitación máxima en los ISI de 50 y 75 ms. Curiosamente, se observó una PPF significativamente más fuerte en los ratones transgénicos snca F28 en ISIs de 25, 50 y 75 ms en comparación con los ratones de control de edad coincidente (figura 11b). Dado que las colaterales de Schaffer

muestran característicamente una facilitación debida al  $\text{Ca}^{2+}$  residual en el terminal, se ha sugerido que las manipulaciones que inhiben la liberación de glutamato pueden conducir a un aumento de la FPP. Por lo tanto, nuestros hallazgos en ratones transgénicos F28 sugieren que el deterioro de la transmisión sináptica basal se debe probablemente al deterioro de la liberación vesicular como resultado de la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína.

Las alteraciones identificadas en la transmisión sináptica basal y en la facilitación de impulsos pareados en ratones transgénicos F28 snca se utilizaron además como lectura para probar la eficacia de los anticuerpos contra la alfa-sinucleína. Los registros se realizaron en todos los experimentos entre 3 y 6 h después de la administración de una dosis única de anticuerpo (i.p.). La transmisión sináptica basal y la facilitación de pulsos emparejados se registraron en ambos hipocampos de cada animal cuando fue posible, y se utilizaron posteriormente como experimentos individuales.

El tratamiento agudo con h9E4 (15 mg/kg i.p.) indujo una reversión significativa del deterioro de la transmisión sináptica basal en ratones transgénicos F28-snca (Tg-snca + h9E4 vs. Tg-snca + PBS,  $p = 0,002$ , figura 12). Sin embargo, la reversión por h9E4 fue solo parcial, como indica una transmisión sináptica basal significativamente menor en comparación con los compañeros de camada tratados con PBS ( $p = 0,007$ ).

Se confirmó un aumento significativo de la PPF en Tg-snca tratados con PBS en comparación con sus compañeros de camada tratados con PBS ( $p = 0,044$ , figura 13). El tratamiento con h9E4 no tuvo ningún efecto significativo sobre la PPF en comparación con los ratones transgénicos tratados con PBS (figura 13).

La transmisión sináptica basal en ratones transgénicos F28-snca tratados con una IgG de ratón de control (5C9) fue significativamente menor que en ratones de edad coincidente tratados con la IgG de ratón de control (5C9) ( $p < 0,001$ , figura 10). El tratamiento agudo con m2E6 a una dosis de 15 mg/kg indujo una reversión significativa del deterioro de la transmisión sináptica basal en ratones transgénicos F28-snca (Tg-snca + m2E6 vs. Tg-snca + IgG de control,  $p = 0,004$ , figura 14). La transmisión sináptica basal en ratones transgénicos tratados con m2E6 no fue significativamente diferente de la transmisión sináptica basal en ratones de control tratados con mIgG de edad coincidente, lo que indica una reversión completa del deterioro. El tratamiento con m2E6 no tuvo ningún efecto sobre la transmisión sináptica basal en ratones no transgénicos de edad coincidente.

Se confirmó un deterioro significativo de la PPF en ratones transgénicos F28-snca tratados con IgG de ratón de control en comparación con ratones de la misma edad tratados con IgG de ratón de control ( $p = 0,023$ ). El tratamiento con m2E6 no tuvo ningún efecto significativo sobre el deterioro de la PPF en los ratones transgénicos F28-snca en comparación con los ratones transgénicos tratados con IgG de ratón de control (figura 15).

Dado que 15 mg/kg de m2E6 indujeron la reversión completa de la alteración de la transmisión sináptica basal en ratones transgénicos F28-snca, se probaron dosis inferiores para establecer una relación dosis-respuesta. El deterioro de la transmisión sináptica basal en los ratones transgénicos F28-snca se revirtió significativamente con m2E6 a una dosis de 5 mg/kg i.p. a un nivel no significativamente diferente al de los ratones de control de edad coincidente (figura 16). Por el contrario, m2E6 a una dosis de 2,5 mg/kg i.p. no revirtió significativamente el deterioro de la transmisión sináptica basal, aunque se observó una fuerte tendencia a intensidades de estimulación altas ( $p = 0,066$ , 0,010 y 0,050 a 300, 400 y 500  $\mu\text{A}$ , respectivamente) (figura 17).

El anticuerpo quimérico 2E6, ch2E6, se probó a una dosis de 2,5 mg/kg i.p., y revirtió parcialmente el deterioro de la transmisión sináptica basal en ratones transgénicos F28-snca en comparación con el tratamiento con PBS ( $p = 0,042$ , figura 18). Este efecto no fue significativamente diferente de la reversión obtenida con m2E6 a la dosis de 2,5 mg/kg en la presente serie de experimentos (no mostrado). Al igual que se observó con m2E6, 2E6 quimérico no tuvo ningún efecto significativo sobre la PPF alterada en ratones transgénicos F28-snca (figura 19).

La versión humanizada y madurada por afinidad de 2E6, el anticuerpo 2E6-HDL1, fue significativamente más eficaz que el 2E6 quimérico para revertir el deterioro de la transmisión sináptica basal en ratones transgénicos F28-snca, e indujo una reversión completa a un nivel no significativamente diferente de los compañeros de camada tratados con PBS (figura 18). No se observó una reversión significativa de la alteración de la PPF en los ratones transgénicos F28-snca con 2E6-HDL1 (figura 19).

#### **Ejemplo 8: Microdiálisis para evaluar la alfa-sinucleína humana en el cerebro de animales despiertos y en movimiento libre**

Se utilizó microdiálisis push-pull para evaluar la  $\alpha$ -sinucleína humana en líquido intersticial (ISF) cerebral de ratones transgénicos F28snca despiertos y en movimiento libre. Los ratones se alojaron en una sola nave a temperatura controlada ( $22 \pm 1,5$  °C) y en condiciones de humedad (55-65 %) y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas (luces encendidas a las 06:00 h). La comida y el agua estaban libremente disponibles. Para permitir la microdiálisis en el hipocampo, se anestesió a los ratones con isoflurano y se implantó estereotópicamente en el cerebro una cánula guía intracerebral, colocando la sonda de microdiálisis en el hipocampo (coordenadas de la punta de la sonda: 3,1 mm posterior y 2,8 mm lateral del bregma, y 1,3 mm relativo a la duramadre) según el atlas de Paxinos y Franklin 2001. Se utilizaron tornillos de anclaje y cemento acrílico para la fijación de las cánulas guía.

Tras la implantación de la cánula, se dejó que los ratones se recuperaran de la cirugía durante 2-3 días antes de la diálisis. Se conectó una sonda a una bomba peristáltica de microdiálisis con dos canales (MAB20; Microbiotech), que funcionó en modo push-pull. El tubo de entrada de la sonda de microdiálisis se conectó a una bomba peristáltica que perfundía la sonda con LCR artificial. La bomba peristáltica también se conectó al tubo de salida para evitar la pérdida de líquido de perfusión de la sonda, tirando del líquido a través del tubo. El caudal real de la bomba se determinó sin tener la sonda conectada. Los tubos de muestra se pesaron antes y después del muestreo durante un periodo de tiempo determinado y se calculó el caudal. Se utilizaron métodos ligeramente diferentes para investigar el efecto de la 2E6 de ratón y la 9E4 humana sobre los niveles extracelulares de  $\alpha$ -sinucleína humana.

a. 2E6 de ratón: Realizado en el hipocampo de ratones transgénicos F28snca (aproximadamente 30 semanas de edad). El día del experimento, se introdujo una sonda brainlink de 2 mm y 3000 kDa de corte a través de la cánula guía. Como tampón de perfusión, se diluyó al 2 % albúmina sérica bovina al 25 % (Sigma) con LCR artificial (aCSF; en mM: NaCl 147, KCl 2,7,  $\text{CaCl}_2$  1,2,  $\text{MgCl}_2$  0,85) el día de su uso y se filtró a través de una membrana de 0,1  $\mu\text{m}$ . La bomba debía tener un caudal constante de 0,5  $\mu\text{l/min}$ . Se utilizó un régimen de muestreo de 60 minutos durante todo el periodo del experimento. Para evitar daños tisulares, la ventana experimental se fijó entre 14 y 48 h después de la implantación de la sonda. 14-16 h después del inicio de los experimentos, se recogieron 2 muestras de referencia y, a continuación, se inyectó 2E6 de ratón o 5C9 de control de isotipo por vía i.p. a 15 mg/kg, y se recogieron otras 6 muestras (6 h de recogida). Los dializados se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta la determinación de la alfa-sinucleína humana mediante ELISA (kit ELISA de Covance). La media de los dos valores basales (2 h) antes del tratamiento con anticuerpos se tomó como línea de base y se fijó en el 100 % para cada animal. Las diferencias se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) bilateral con medidas repetidas. Los niveles basales de alfa-sinucleína humana en el hipocampo fueron de  $11,9 \pm 2,4$  ng/ml (media  $\pm$  EEM,  $n = 11$ , no corregidos para la recuperación de la sonda de diálisis *in vitro*). En los animales tratados con el anticuerpo-5C9 de control, el nivel de alfa-sinucleína humana en el hipocampo no cambió significativamente con el tiempo (figura 20). La administración de m2E6 (15 mg/kg, i.p.) provocó una reducción significativa de la alfa-sinucleína humana en el hipocampo (figura 20).

b. 9E4 humano: Realizado en el hipocampo de ratones transgénicos F28snca (aproximadamente 50 semanas de edad). El día del experimento, se introdujo una sonda de CMA de 2 mm y 1000 kDa de corte a través de la cánula guía. Como tampón de perfusión, se diluyó al 0,2 % albúmina bovina fracción V (Sigma) al 25 % con LCR artificial (aCSF; en mM: NaCl 147, KCl 2,7,  $\text{CaCl}_2$  1,2,  $\text{MgCl}_2$  0,85) el día de su uso y se filtró a través de una membrana de 0,1  $\mu\text{m}$ . La bomba se ajustó para tener un flujo constante de 1  $\mu\text{l/min}$ . Se utilizó un régimen de muestreo de 120 minutos durante todo el periodo del experimento. Para evitar daños tisulares, la ventana experimental se fijó entre 14 y 48 h después de la implantación de la sonda. 14-16 h después del inicio de los experimentos, se recogieron 2-3 muestras de referencia y, a continuación, se inyectaron i.p. 9E4 humano o control de isotipo anti-hel a 15 mg/kg, y se recogieron otras 6 muestras (12 h de recogida). Los dializados se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta la determinación de la  $\alpha$ -sinucleína humana mediante ELISA (kit ELISA de Covance). La media de los dos-tres valores basales (4 h-6 h) previos al tratamiento con anticuerpos se tomó como línea de base y se fijó en el 100 % para cada animal. No se observaron diferencias entre el efecto del anti-hel 9E4 humano o del isotipo de control sobre los niveles extracelulares de  $\alpha$ -sinucleína humana (figura 21). Las diferencias se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) bilateral con medidas repetidas. Los niveles basales de  $\alpha$ -sinucleína humana en el hipocampo fueron de  $7,8 \pm 1,2$  ng/ml (media  $\pm$  EEM,  $n = 16$ , no corregidos para la recuperación de la sonda de diálisis *in vitro*).

## Ejemplo 9

### Efectos crónicos de los anticuerpos contra la $\alpha$ -sinucleína *in vivo*.

*Efectos de m2E6 en un modelo de rata de sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína humana dirigida a neuronas dopaminérgicas y en un modelo de ratón transgénico de sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína humana.*

La sobreexpresión dirigida de  $\alpha$ -sinucleína humana en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo de rata puede lograrse utilizando un vector viral adenoasociado recombinante (rAAV) y se asocia a una pérdida progresiva de células dopaminérgicas en la sustancia negra y a alteraciones motoras. En este modelo de sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína basado en AAV en ratas, se demostró que la actividad de disparo neuronal de los ganglios basales estaba alterada de manera similar a lo que se ha descrito en pacientes con enfermedad de Parkinson, a saber, una mayor irregularidad de disparo tanto en el núcleo subtalámico como en la sustancia negra reticulada.

Todos los experimentos se llevaron a cabo según la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/CEE) para el cuidado y la utilización de animales de laboratorio y la legislación danesa que regula los experimentos con animales.

Se utilizaron ratas hembra Sprague-Dawley adultas (225-250 g). El tratamiento con anticuerpos se inició entre 2 y 4 días antes de las inyecciones virales, y continuó hasta el final del estudio. La administración de PBS al mismo volumen (5 ml/kg) se utilizó como control. Los anticuerpos se dosificaron por vía intraperitoneal dos veces por semana a una dosis de 15 mg/kg (figura 22). Se inyectaron unilateralmente en la sustancia negra (SN) virus (rAAV2/5) que contenían  $\alpha$ -sin ts humana o GFP. Los animales se anestesiaron con una combinación de Hypnorm® y Dormicum® a 2,0 ml/kg s.c. y se colocaron en un marco estereotáxico. Se les ajustó la temperatura a 37,5 °C mediante una almohadilla térmica y se les expuso el cráneo. Se perforó un orificio por encima del SN derecho en las siguientes coordenadas, según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1998): 5,5 mm posterior y 2,0 mm lateral de Bregma. Se realizó una única inyección de 3  $\mu$ l de rAAV2/5- $\alpha$ -sin o rAAV2/5-GFP a una profundidad de 7,2 mm por debajo de la duramadre, y a un caudal de 0,2  $\mu$ l/min utilizando una jeringa Hamilton conectada a un inyector estereotáxico. La aguja se dejó colocada 5 minutos más para permitir la difusión del vector en la SN. Tras la operación, los animales fueron devueltos a su jaula y colocados en un ambiente caldeado donde se les permitió recuperarse de la anestesia.

Ocho a 10 semanas después de las inyecciones de AAV, se realizaron registros extracelulares de una sola unidad en el núcleo subtalámico (NST) bajo anestesia de uretano. Todos los registros se realizaron entre 2 y 4 días después de la última inyección de anticuerpos. Se introdujo un electrodo de vidrio en el NST ( $3,8 \pm 0,2$  mm posterior y  $+2,4 \pm 0,2$  mm lateral de Bregma) utilizando un micromanipulador motorizado. Los potenciales de acción extracelulares se amplificaron, discriminaron y monitorizaron en un osciloscopio y un audiomonitor. Las neuronas se registraron y analizaron utilizando el software Spike 2. En el NST, las presuntas neuronas glutamatérgicas se encontraban entre 7,0 y 7,6 mm por debajo de la superficie cortical. Normalmente presentaban una frecuencia de disparo que oscilaba entre 0,5 y 40 picos/s, y un potencial de acción estrecho. Para el análisis se utilizaron al menos 200 picos consecutivos. Se calcularon para cada neurona la frecuencia de disparo media y el coeficiente de variación del intervalo entre espigas (CV ISI), definido como el cociente entre la desviación estándar del ISI y el ISI medio  $\times 100$ . Se construyeron histogramas de densidad de picos y autocorrelogramas para cada neurona y se utilizaron para clasificar cualitativamente el patrón de disparo en regular, irregular o en ráfagas, como se ha descrito previamente (Kaneoke y Vitek, 1996; Tepper et al., 1995).

Las ratas AAV- $\alpha$ -sinucleína mostraron un patrón de disparo alterado de las neuronas NST en comparación con las ratas AAV-GFP, como lo indica un aumento significativo en el coeficiente de variación del intervalo entre espigas (CV ISI) (fig. 23) y el cambio significativo en la proporción de células que disparan en un patrón regular, irregular y en ráfagas (fig. 24). Curiosamente, el tratamiento con m2E6 indujo una normalización significativa de la proporción de neuronas que mostraban los 3 patrones de disparo distintos (fig. 24), así como una tendencia no significativa a la disminución de su CV ISI (fig. 23).

*Efectos de m2E6 tras el tratamiento crónico en un modelo de ratón transgénico de sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína humana.*

Las alteraciones identificadas en la facilitación de impulsos emparejados en ratones transgénicos F28 snca se utilizaron además como lectura para comprobar la eficacia de los anticuerpos tras el tratamiento crónico.

Se administraron a los animales dos dosis a la semana de m2E6 o una mlgG1 de control a una dosis de 15 mg/kg por vía i.p. durante 16-18 semanas. Todos los registros se realizaron de forma similar a los del ejemplo 7, pero ahora los registros se realizaron entre 2 y 4 días después de la administración de la última dosis de anticuerpo en lugar de entre 3 y 6 horas, como se hizo para el experimento agudo. La facilitación de pulsos emparejados se registró en ambos hipocampos de cada animal cuando fue posible, y se utilizó posteriormente en experimentos individuales.

La facilitación del pulso emparejado no fue significativamente diferente en los ratones de control de edad coincidente tratados con 2E6 en comparación con los ratones tratados con 5C9. Como se informó anteriormente, se observó una mejora de la PPF en los ratones F28 snca Tg tratados con 5C9 en comparación con los ratones de control de edad coincidente tratados con 5C9. Curiosamente, el tratamiento con 2E6 a una dosis de 15 mg/kg i.p. normalizó la PPF en ratones F28 snca Tg (fig. 25).

Dado que las colaterales de Schaffer muestran característicamente una facilitación debida al  $\text{Ca}^{2+}$  residual en el terminal, se ha sugerido que las manipulaciones que inhiben la liberación de glutamato pueden conducir a un aumento de la PPF. Por lo tanto, nuestros hallazgos en ratones transgénicos F28 sugieren que el deterioro de la transmisión sináptica basal se debe probablemente al deterioro de la liberación vesicular como resultado de la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína. Dado que solo el tratamiento crónico con el anticuerpo 2E6 es capaz de revertir el déficit en PPF, sugiere que el tratamiento a largo plazo con anticuerpos puede reducir el efecto de la sobreexpresión de alfa-sinucleína en la liberación vesicular alterada. Este efecto puede traducirse en una mejora de la transmisión sináptica en pacientes humanos con EP tratados con terapia de anticuerpos.



## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Lundbeck A/S

5 <120> Agentes, usos y métodos

&lt;130&gt; 1074-WO-PCT

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

$\langle 210 \rangle$  1

15                      <211> 140

<212> PRT

<213> Alfa-sinucleína humana

<400> 1

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val

1                      5                      10                      15

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

20                      25                      30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val

35                      40                      45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr

50                      55                      60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys

65                      70                      75                      80

# ES 3 008 133 T3

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

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

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

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

<210> 2

5 <211> 15

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Epítopo 126-140

15 <400> 2

Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala  
1 5 10 15

20 <210> 3

<211> 10

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

30 <223> CDR1 de VL

<400> 3

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His  
1 5 10

35 <210> 4

<211> 7

<212> PRT

40 <213> artificial

<220>

45 <223> CDR2 de VL

<400> 4  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
 1 5  
 5  
 <210> 5  
 <211> 9  
 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 15  
 <223> CDR3 de VL  
 <400> 5  
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr  
 1 5  
 20  
 <210> 6  
 <211> 5  
 25  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 30  
 <220>  
 <223> CDR1 de VH  
 <400> 6  
 35  
 Ser Tyr Trp Met His  
 1 5  
 <210> 7  
 40  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 45  
 <220>  
 <223> CDR2 de VH  
 50  
 <400> 7  
 Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Thr  
 55  
 <210> 8  
 <211> 12

<212> PRT  
 <213> artificial  
 5 <220>  
 <223> CDR3 de VH  
 <400> 8  
 10 Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 9  
 15 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> CDR1 de VL de 7C4  
 25 <400> 9  
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met His  
 1 5 10  
 <210> 10  
 30 <211> 10  
 <212> PRT  
 35 <213> artificial  
 <220>  
 <223> CDR1 de VL de 7A10/8D9  
 40 <400> 10  
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His  
 1 5 10  
 45 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 50 <213> artificial  
 <220>  
 55 <223> CDR3 de VL de L3  
 <400> 11  
 Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Phe  
 1 5  
 60 <210> 12

5 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 10 <223> CDR1 de VH de 7C4  
 <400> 12  
 Arg Tyr Trp Met His  
 1 5  
 15 <210> 13  
 <211> 17  
 20 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 25 <223> CDR2 de VH de 5A1  
 <400> 13  
 Arg Val Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe Lys  
 1 5 10 15  
 30 Thr  
 <210> 14  
 <211> 17  
 35 <212> PRT  
 <213> artificial  
 40 <220>  
 <223> CDR2 de VH de 9G11  
 <400> 14  
 45 Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val His Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Thr  
 <210> 15  
 50 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> CDR2 de VH de 9C12  
 <400> 15  
 Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Ile Lys  
 1 5 10 15  
 Thr  
 10 <210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 15 <213> artificial  
 <220>  
 20 <223> CDR3 de VH de 5A1  
 <400> 16  
 Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Asn Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10  
 25 <210> 17  
 <211> 12  
 30 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> CDR3 de VH de 9D7  
 <400> 17  
 Leu Gly His Tyr Ser Lys Val Leu Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10  
 40 <210> 18  
 <211> 12  
 45 <212> PRT  
 <213> artificial  
 50 <220>  
 <223> CDR3 de VH de 7A10/8D9  
 <400> 18  
 55 Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Lys Asp Tyr  
 1 5 10

# ES 3 008 133 T3

<210> 19  
 <211> 106  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial  
 10 <220>  
 <223> m2E6 de VL  
 <400> 19  
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Asp Thr Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr  
 15 85 90 95  
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105  
 20 <210> 20  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 25 <213> artificial  
 <220>  
 <223> m2E6 de VH  
 30 <400> 20

# ES 3 008 133 T3

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr  
115

5 <210> 21

<211> 106

10 <212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> ch2E6 de VL

<400> 21



# ES 3 008 133 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Asp Thr Glu  
65 70 75 80

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

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

5 <210> 22  
<211> 118  
<212> PRT  
10 <213> artificial  
<220>  
15 <223> ch2E6 de VH  
<400> 22

# ES 3 008 133 T3

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr  
115

5 <210> 23

<211> 107

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> 2E6-HLD1 de VL

<400> 23

# ES 3 008 133 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

5 <210> 24

<211> 118

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> 2E6-HLD1 de VH

<400> 24

# ES 3 008 133 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

5 <210> 25

<211> 107

10 <212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> 2E6-HLD2 de VL

<400> 25

# ES 3 008 133 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

5 <210> 26

<211> 118

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

15 <223> 2E6-HLD2 de VH

<400> 26

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

20

# ES 3 008 133 T3

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

<210> 27

5 <211> 107

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> VL de 2E6-HLD 3

15 <400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

# ES 3 008 133 T3

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

<210> 28

5 <211> 118

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> VH de 2E6-HLD 3

15 <400> 28

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

# ES 3 008 133 T3

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

<210> 29

5 <211> 106

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> 5A1 de VL

15 <400> 29

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



# ES 3 008 133 T3

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

<210> 30

5 <211> 118

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> 5A1 de VH

15 <400> 30

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

# ES 3 008 133 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Val Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Thr Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

<210> 31

5 <211> 106

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> 9D7 de VL

15 <400> 31

# ES 3 008 133 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

<210> 32

5 <211> 118

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> 9D7 de VH

15 <400> 32

# ES 3 008 133 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Ser Lys Val Leu Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

<210> 33

5 <211> 106

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> 9G11 de VL

15 <400> 33

# ES 3 008 133 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

<210> 34

5 <211> 118

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> 9G11 de VH

15 <400> 34

# ES 3 008 133 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val His Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

<210> 35

5 <211> 106

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> 7C4 de VL

15 <400> 35

# ES 3 008 133 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

<210> 36

5 <211> 118

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> 7C4 de VH

15 <400> 36

# ES 3 008 133 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr

115

5 <210> 37

<211> 106

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> L3 de VL

<400> 37



# ES 3 008 133 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

5 <210> 38

<211> 118

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> L3 de VH

<400> 38

# ES 3 008 133 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

5 <210> 39

<211> 106

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> 7A10 de VL

<400> 39

# ES 3 008 133 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

- 5 <210> 40
- <211> 118
- <212> PRT
- 10 <213> artificial
- <220>
- 15 <223> 7A10 de VH
- <400> 40

# ES 3 008 133 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Lys Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

5 <210> 41

<211> 106

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> 8D9 de VL

<400> 41

# ES 3 008 133 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

5 <210> 42

<211> 118

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> 8D9 de VH

<400> 42

# ES 3 008 133 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Lys Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

5 <210> 43

<211> 106

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> 9C12 de VL

<400> 43

# ES 3 008 133 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

5 <210> 44

<211> 118

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> 9C12 de VH

<400> 44

# ES 3 008 133 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Ile  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

5 <210> 45

<211> 106

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> 6B6 de VL

<400> 45



# ES 3 008 133 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

5 <210> 46

<211> 118

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

15 <223> 6B6 de VH

<400> 46

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Trp Met His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

20

# ES 3 008 133 T3

35

40

45

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Val Asn Phe  
50 55 60

Lys Thr Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Gly His Tyr Gly Asn Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr  
115

<210> 47

5 <211> 446

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> LC de 9E4

15 <400> 47

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

# ES 3 008 133 T3

|   |     |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|   | 20  |     | 25  |     | 30  |
| Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |     |     |     |     |     |
|   | 35  |     | 40  |     | 45  |
| Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val |     |     |     |     |     |
|   | 50  |     | 55  |     | 60  |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr |     |     |     |     |     |
|   | 65  |     | 70  |     | 75  |
|   |     |     |     |     | 80  |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |     |     |     |     |
|   |     | 85  |     | 90  | 95  |
| Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val |     |     |     |     |     |
|   | 100 |     | 105 |     | 110 |
| Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala |     |     |     |     |     |
|   | 115 |     | 120 |     | 125 |
| Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu |     |     |     |     |     |
|   | 130 |     | 135 |     | 140 |
| Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly |     |     |     |     |     |
|   | 145 |     | 150 |     | 155 |
|   |     |     |     |     | 160 |
| Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser |     |     |     |     |     |
|   |     | 165 |     | 170 | 175 |

# ES 3 008 133 T3

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

# ES 3 008 133 T3

325

330

335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 48

5 <211> 220

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> HC de 9E4

15 <400> 48

# ES 3 008 133 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
130 135 140

# ES 3 008 133 T3

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215 220

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 126-140 de la alfa-sinucleína (SEQ ID NO: 2), en donde dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:
  - a) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5; y una región variable de cadena pesada que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8; o
  - b) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 9, 4 y 5; y una región variable de cadena pesada que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 12, 7 y 8; o
  - c) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 10, 4 y 5; y una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 6, 7 y 18; o
  - d) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 3, 4 y 11; y una región variable de cadena pesada que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8; o
  - e) una región variable de cadena ligera que comprenda las CDR de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5; y una región variable de cadena pesada que comprenda las CDR de las SEQ ID NO: 6, 13 y 16; o
  - f) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5; y una región variable de cadena pesada que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 6, 14 y 8; o
  - g) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5; y una región variable de cadena pesada que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 6, 15 y 8; o
  - h) una región variable de cadena ligera que comprenda las CDR de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5; y una región variable de cadena pesada que comprende las siguientes CDR de las SEQ ID NO: 6, 7 y 17; o
2. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, que comprende:
  - a) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; o
  - b) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; o
  - c) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; o
  - d) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; o
  - e) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; o
  - f) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; o
  - g) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; o
  - h) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; o
  - i) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36; o
  - j) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; o
  - k) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40; o
  - l) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; o
  - m) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44; o
  - n) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.



3. El anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que comprende o consiste en un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fv, fragmentos similares a Fab y anticuerpos de dominio.
- 5 4. El anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de subtipo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- 10 5. El anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo es humano o humanizado.
6. Una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de las reivindicaciones 1-5 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 7. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento o diagnóstico *in vivo* o formación de imágenes *in vivo* de sinucleinopatías, en donde dichas sinucleinopatías se seleccionan de la lista que consiste en: la enfermedad de Parkinson (incluida la enfermedad de Parkinson idiopática), la enfermedad difusa por cuerpos de Lewy (DLBD), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV), la enfermedad combinada de Alzheimer y Parkinson, la insuficiencia autonómica pura y la atrofia multisistémica, así como las personas con riesgo de desarrollar EP en función de su perfil genético y/o síntomas básicos no relacionados con la EP que les hagan propensos a desarrollar EP en el futuro.
- 20 8. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento o diagnóstico *in vivo* o formación de imágenes *in vivo* de sinucleinopatías.
- 25 9. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la enfermedad difusa por cuerpos de Lewy, la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad combinada de Alzheimer y Parkinson, la insuficiencia autonómica pura y la atrofia multisistémica.
- 30 10. Uso del anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el diagnóstico o formación de imágenes *in vitro* de sinucleinopatías, en donde dichas sinucleinopatías se seleccionan de la lista que consiste en: la enfermedad de Parkinson (incluida la enfermedad de Parkinson idiopática), la enfermedad difusa por cuerpos de Lewy (DLBD), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBV), la enfermedad combinada de Alzheimer y Parkinson, la insuficiencia autonómica pura y la atrofia multisistémica, así como las personas con riesgo de desarrollar EP en función de su perfil genético y/o síntomas básicos no relacionados con la EP que les hagan propensos a desarrollar EP en el futuro.
- 35 11. Uso del anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el diagnóstico o formación de imágenes *in vitro* de sinucleinopatías.
- 40

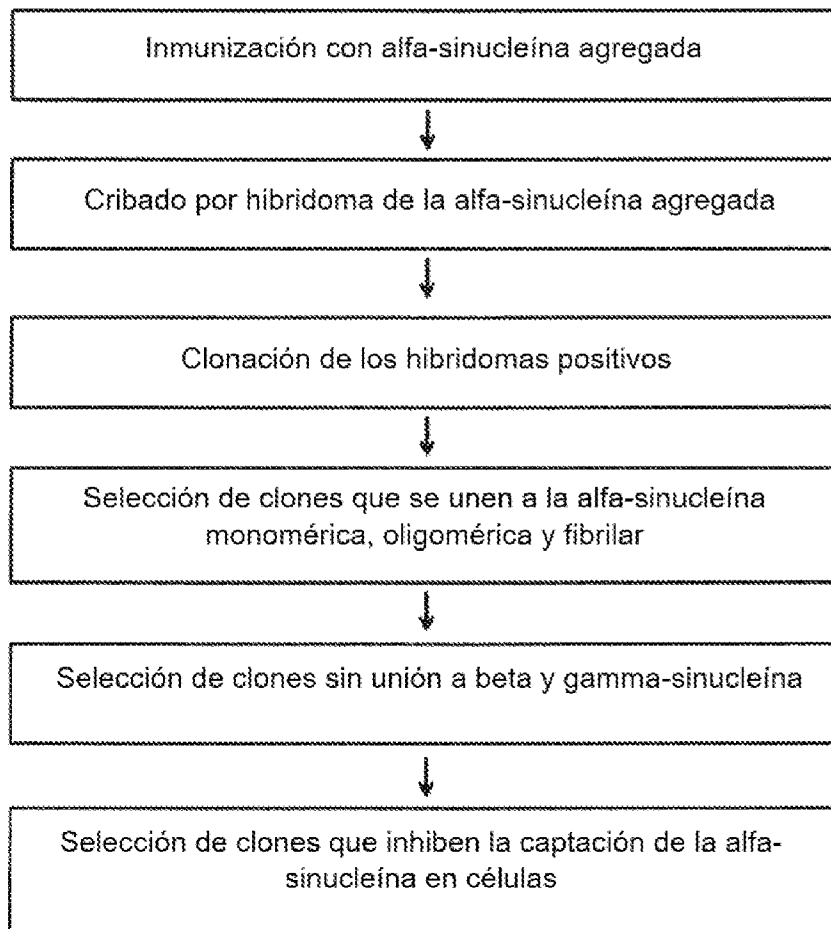


Fig. 1

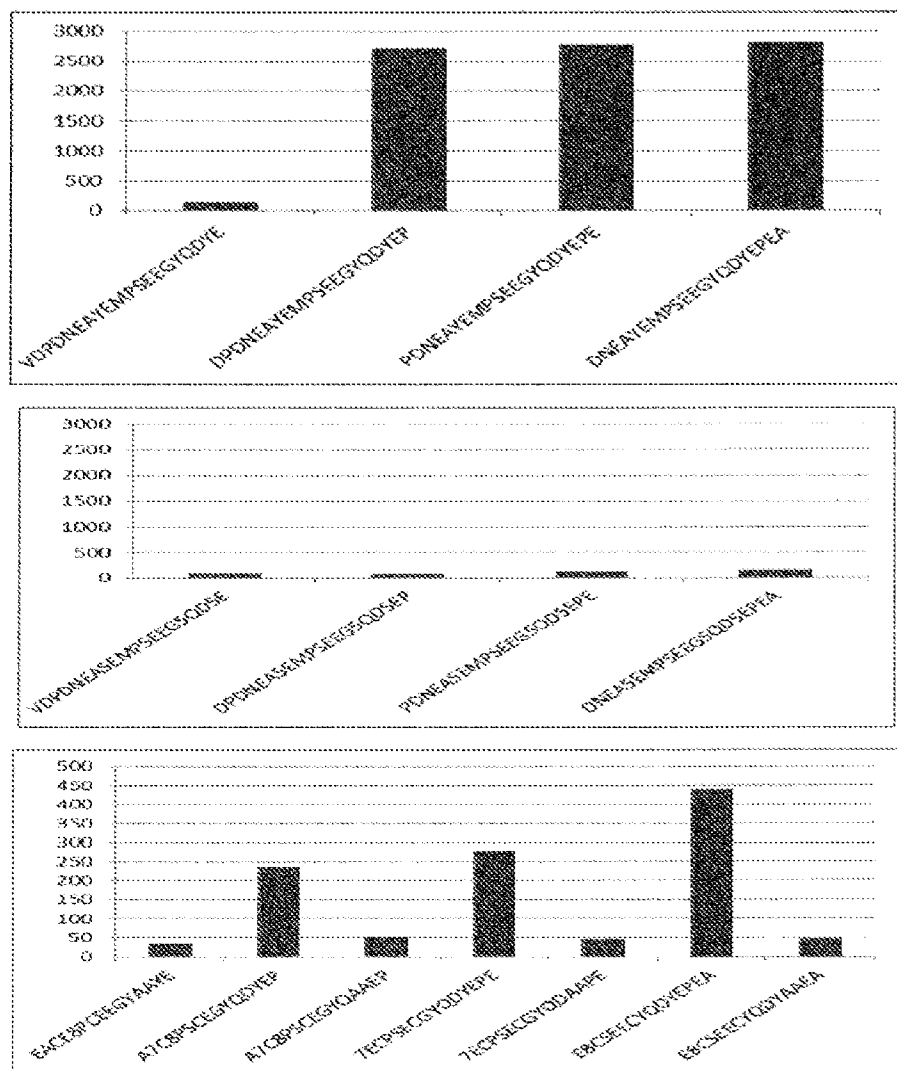


Fig. 2

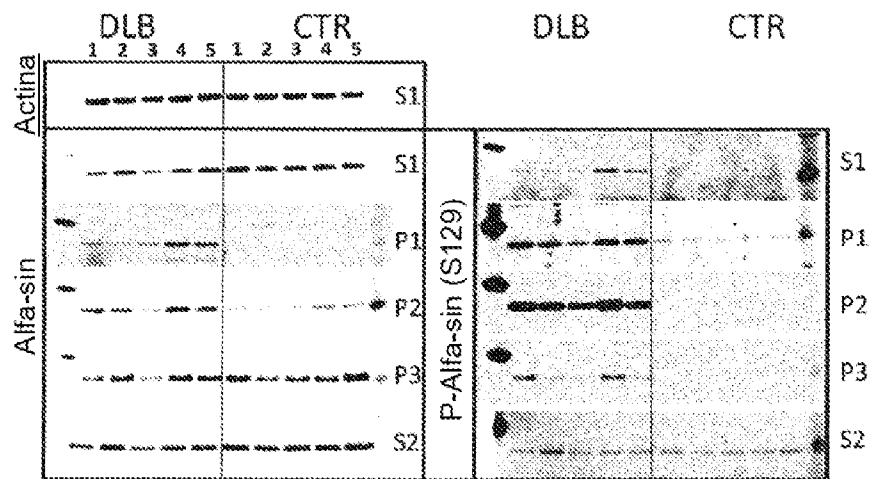


Fig. 3

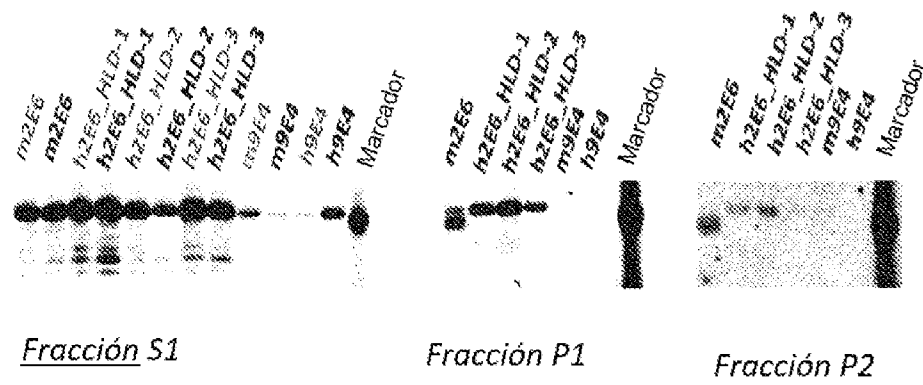


Fig. 4

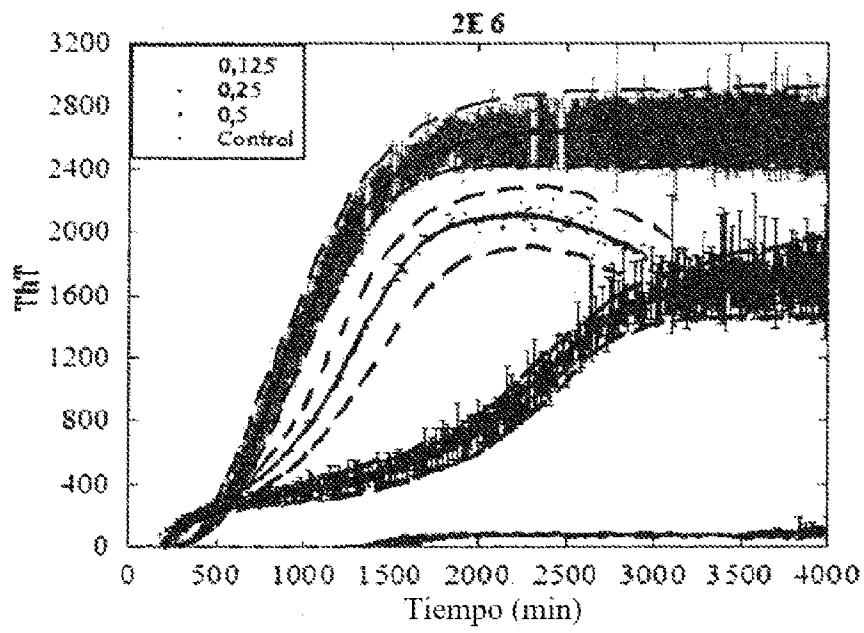


Fig. 5

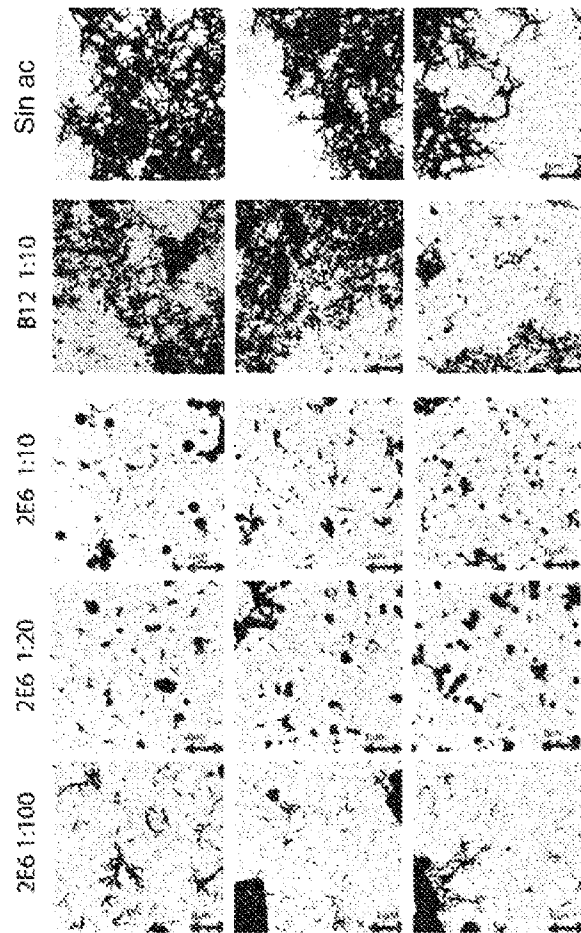


Fig. 6

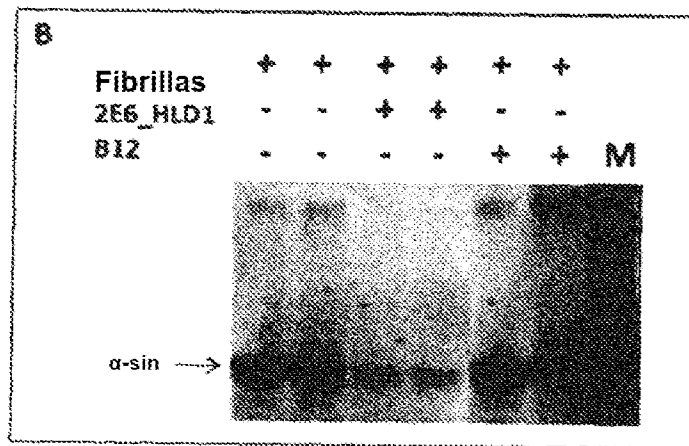
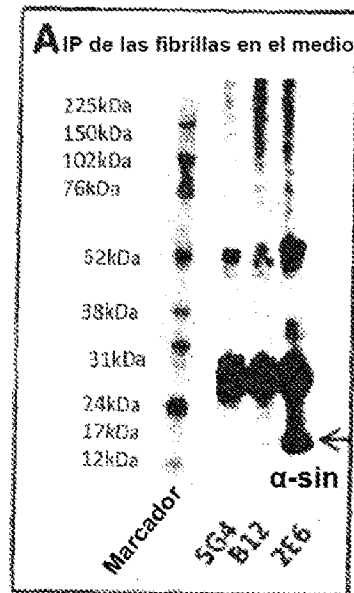
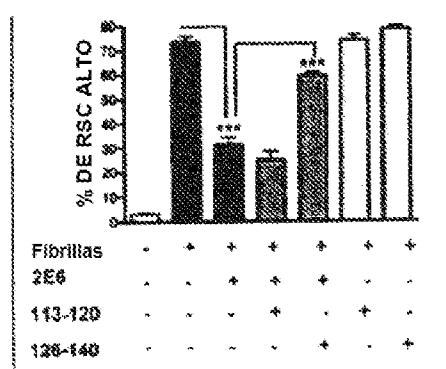


Fig. 7



C Acumulación de fibrillas, SK-mel5



D Acumulación de fibrillas, SK-mel5

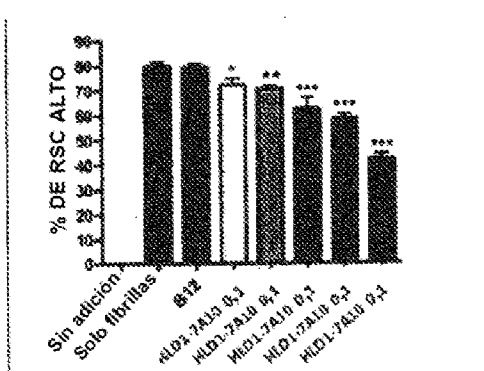


Fig. 7 continuación

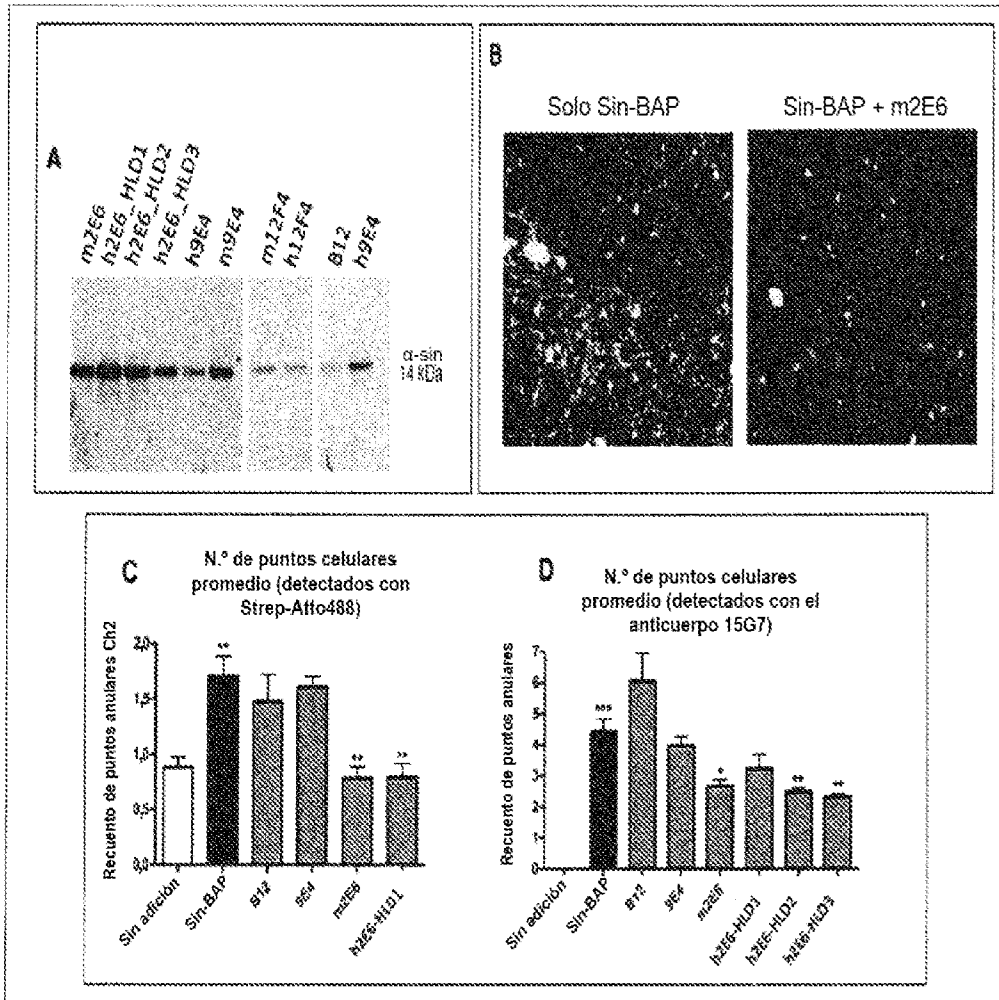


Fig. 8

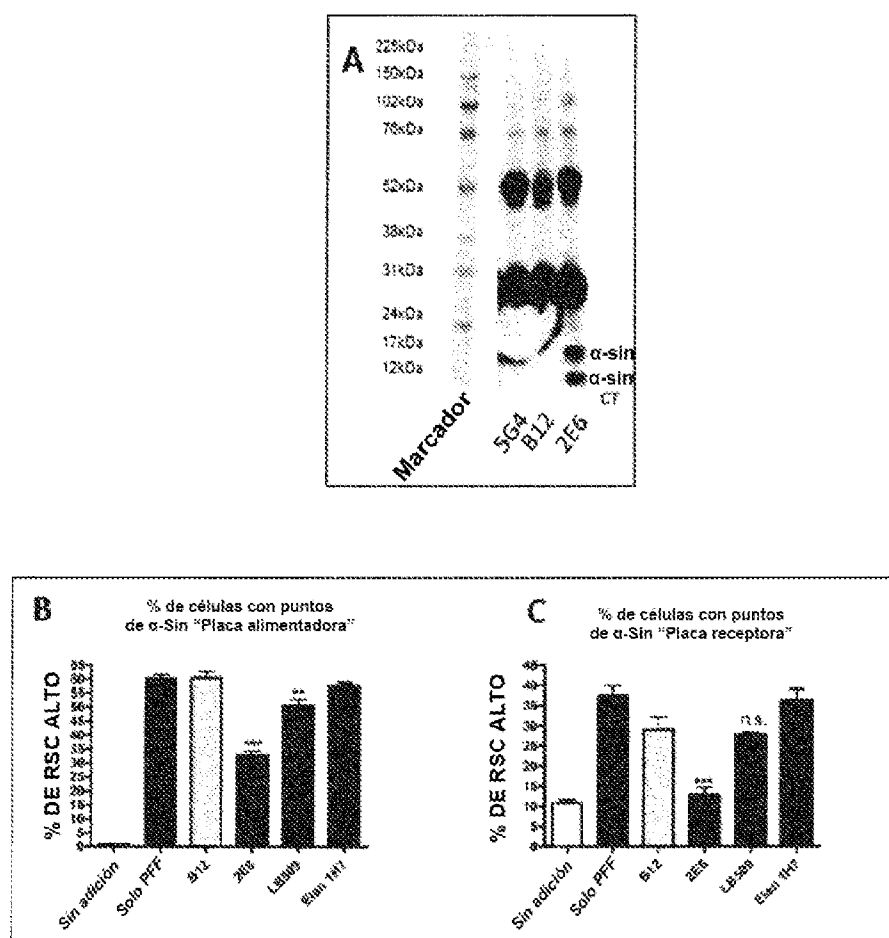


Fig. 9

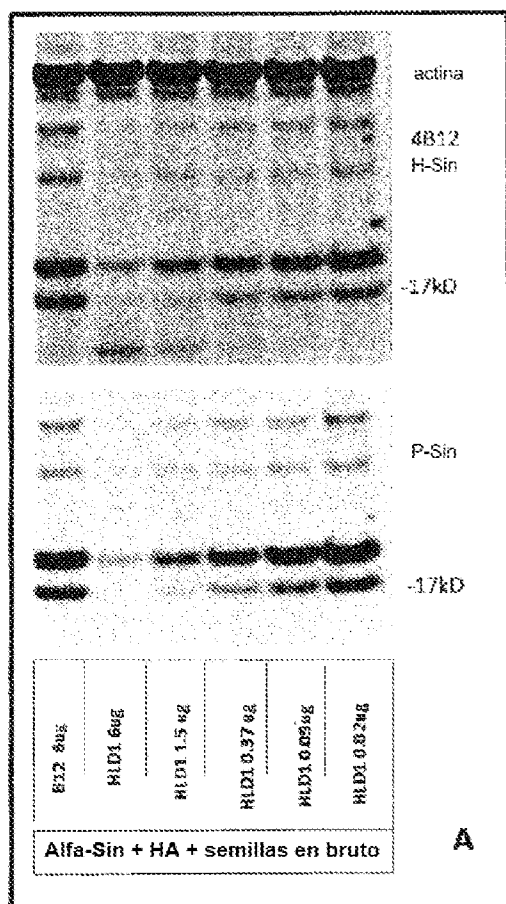


Fig. 10

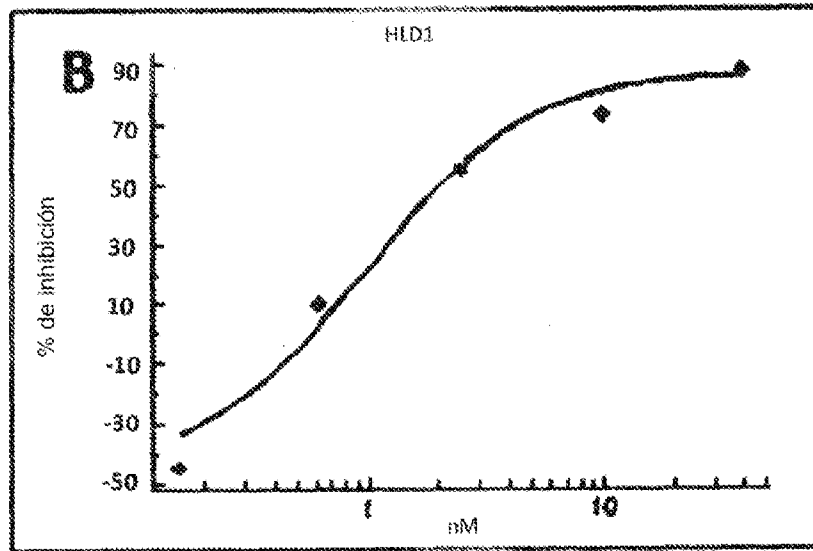
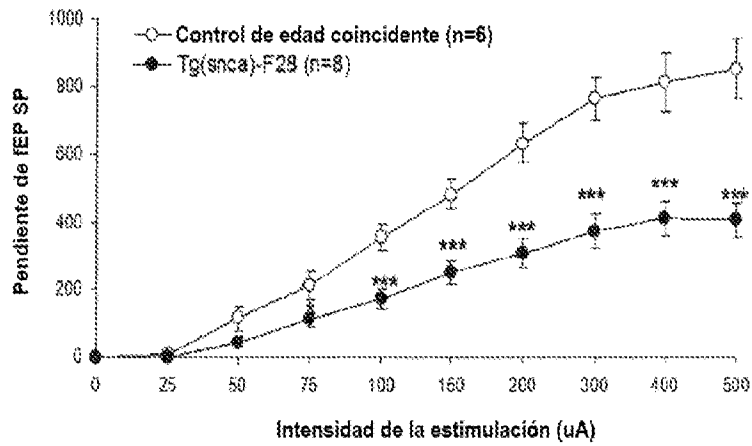


Fig. 10 continuación

a



b

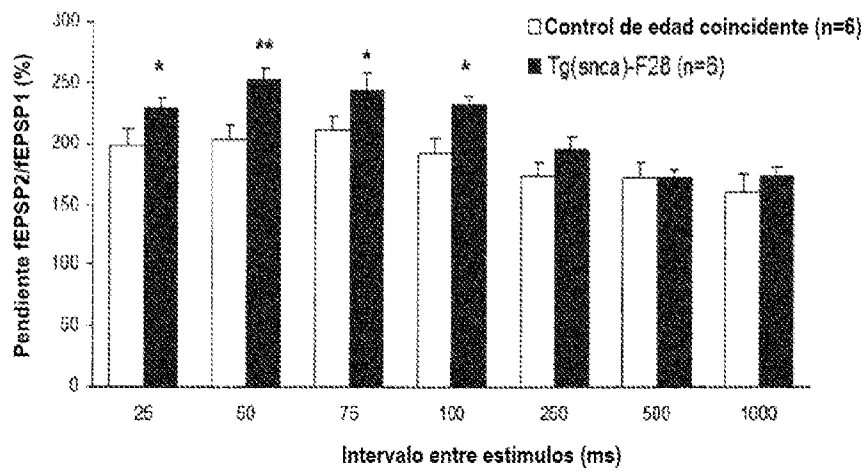


Fig 11.

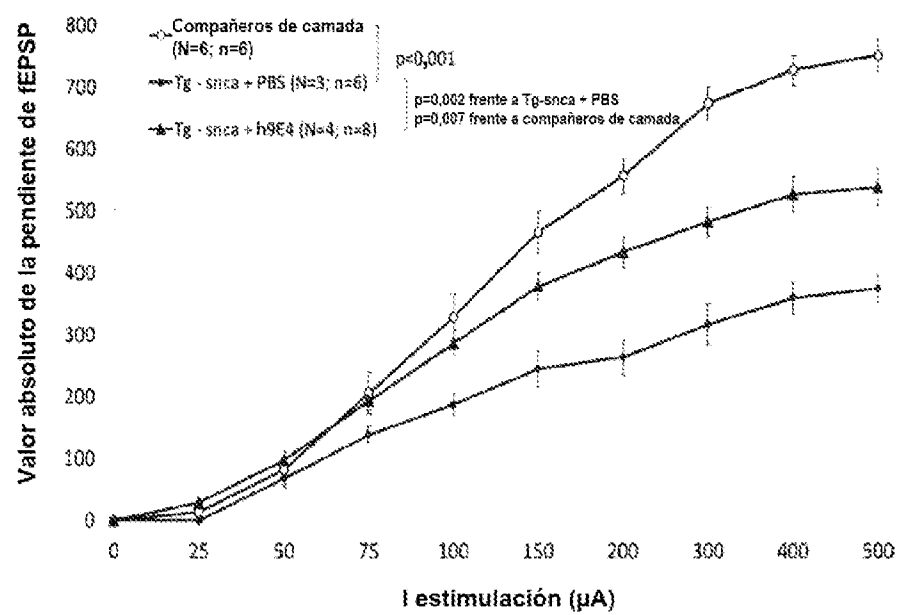


Fig 12.

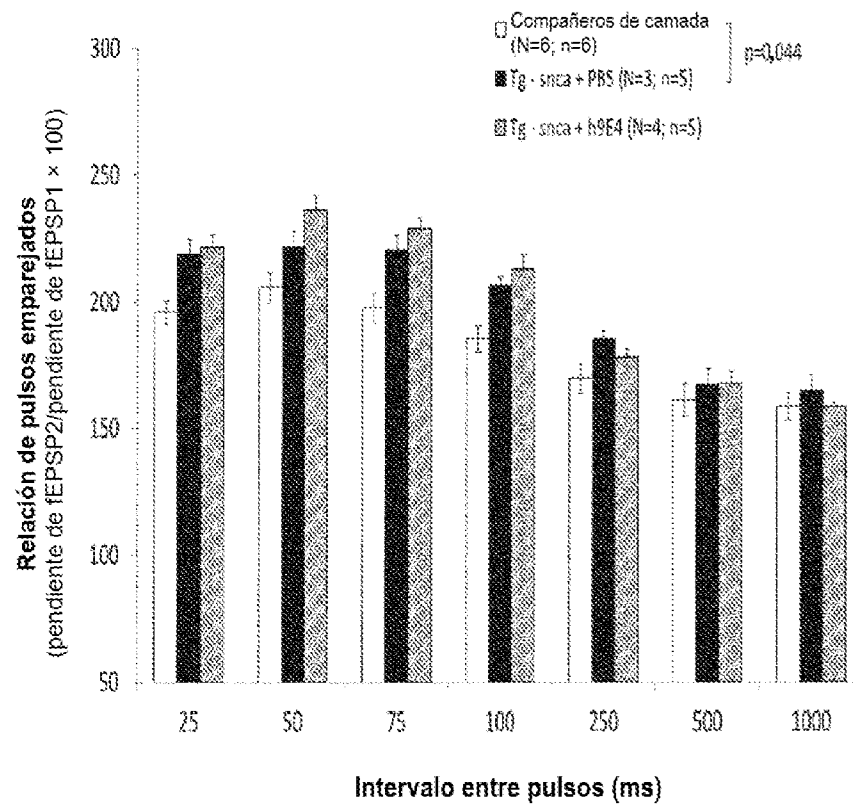


Fig. 13



a

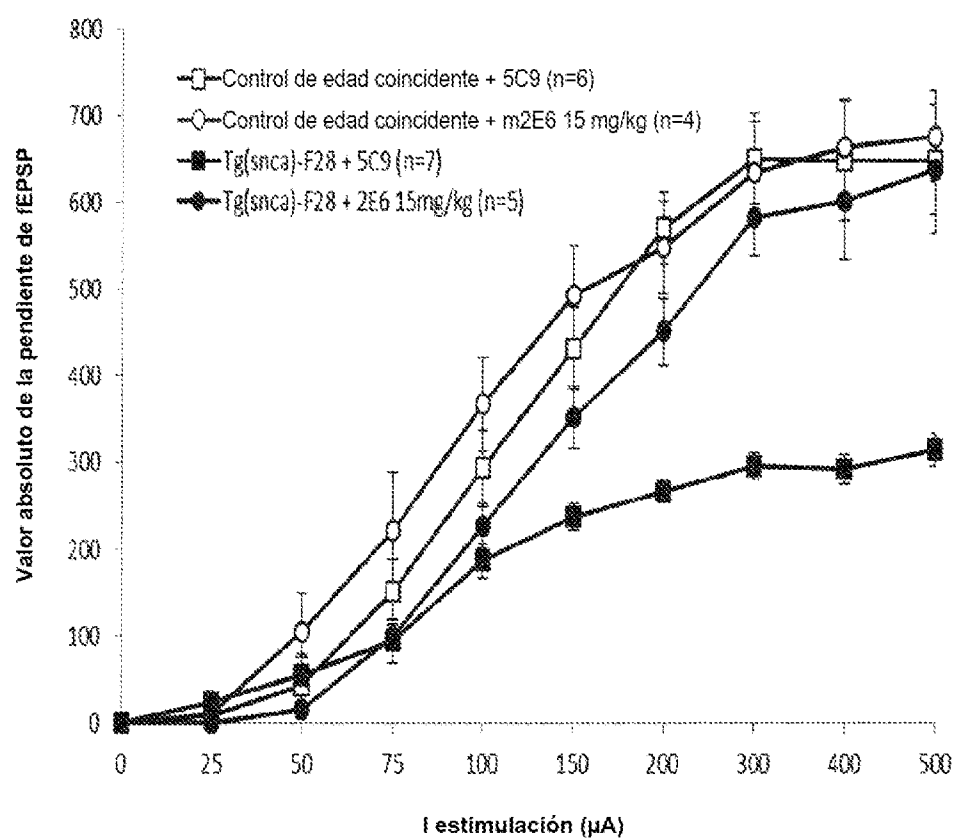


Fig. 14

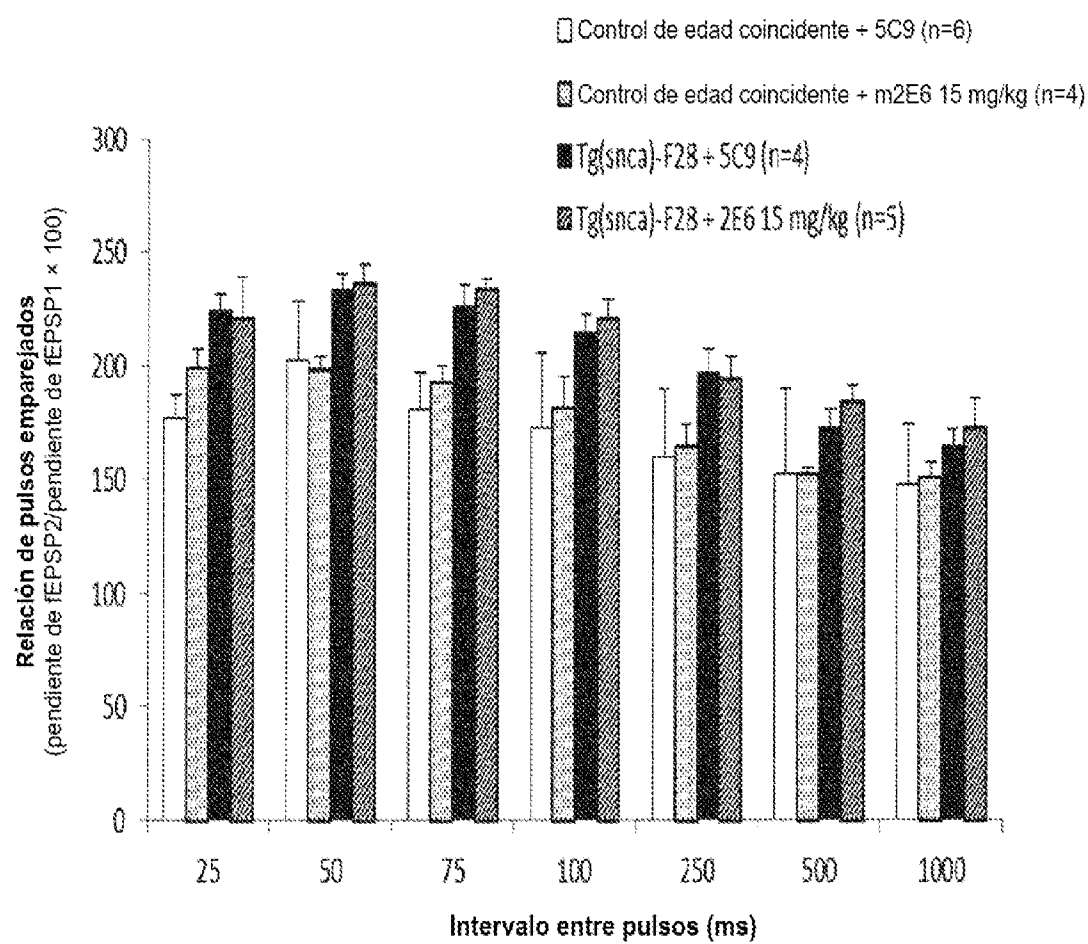


Fig. 15

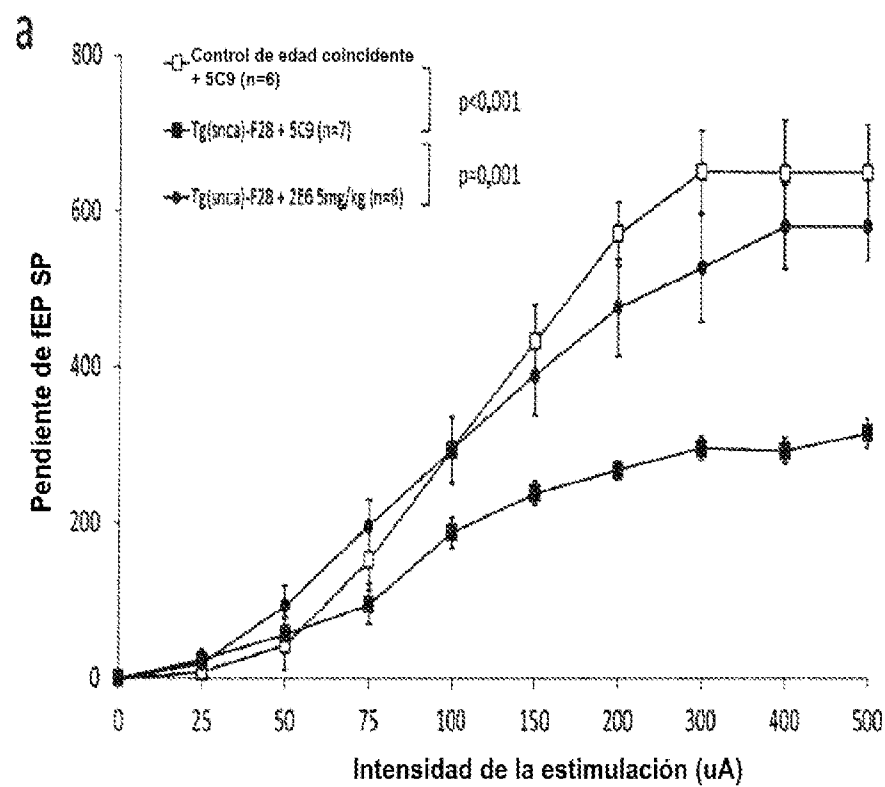


Fig. 16

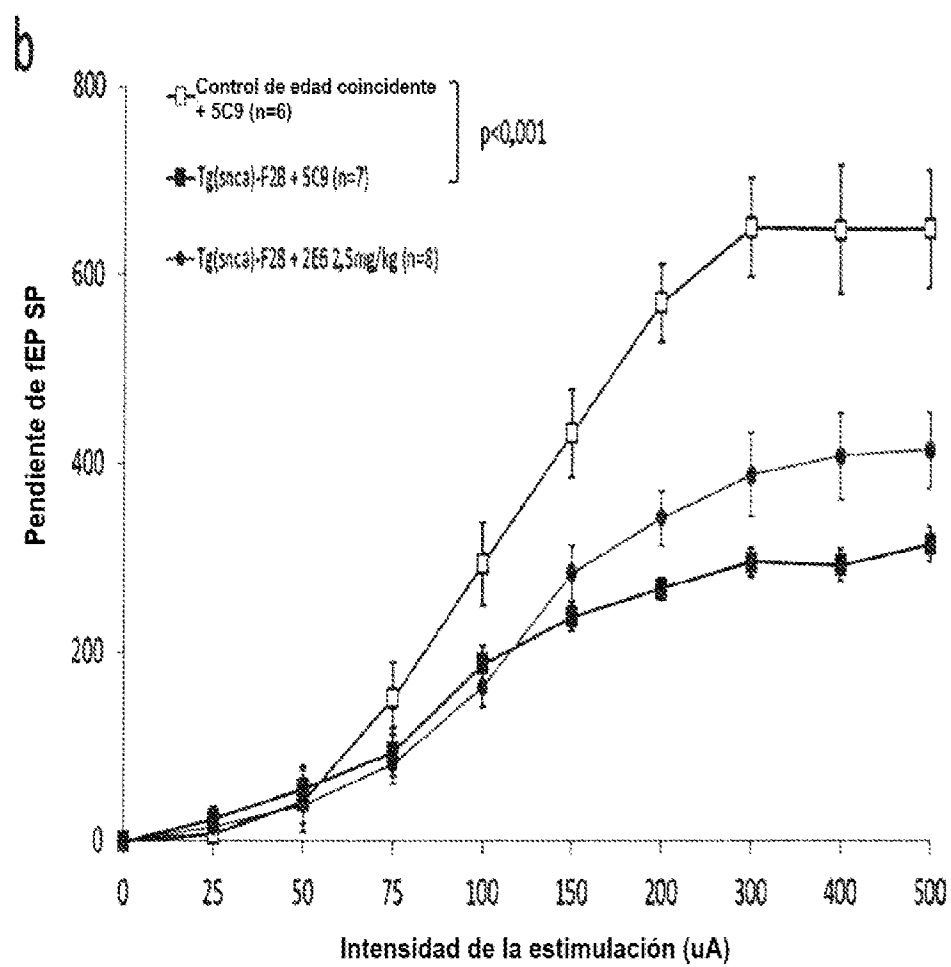


Fig. 17

a

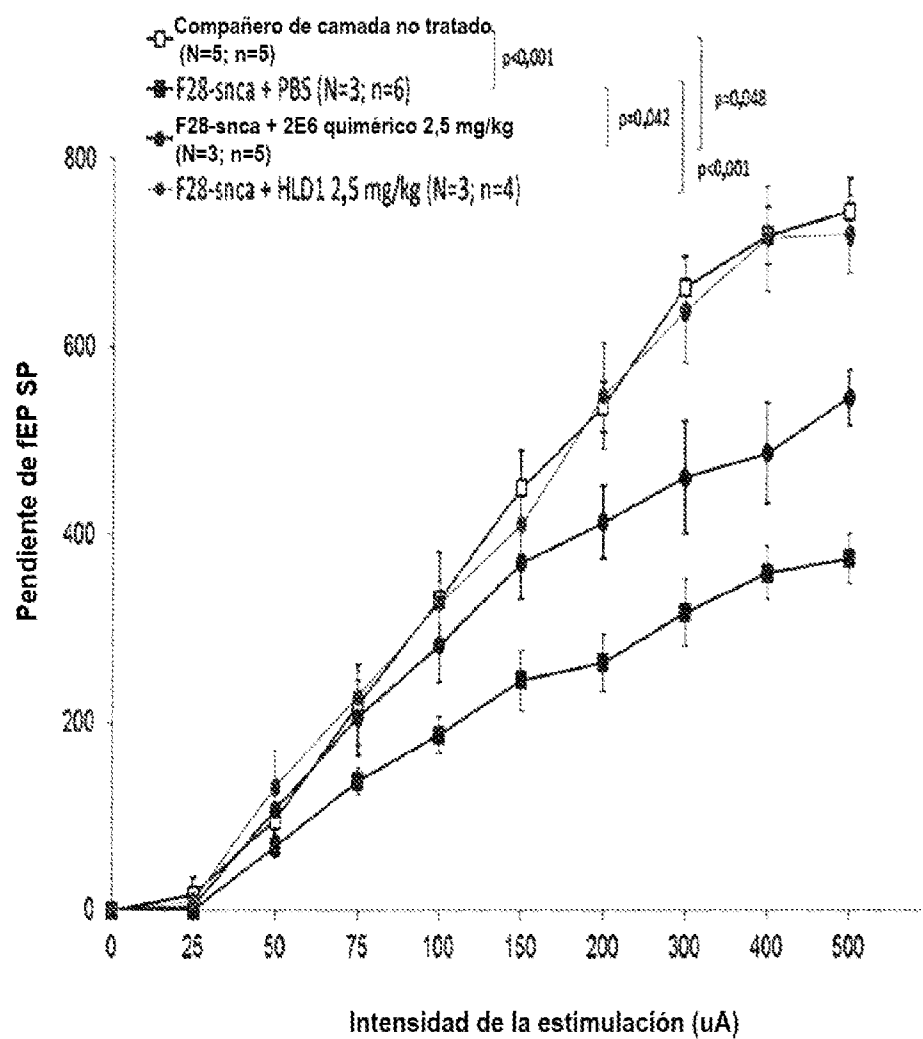


Fig. 18

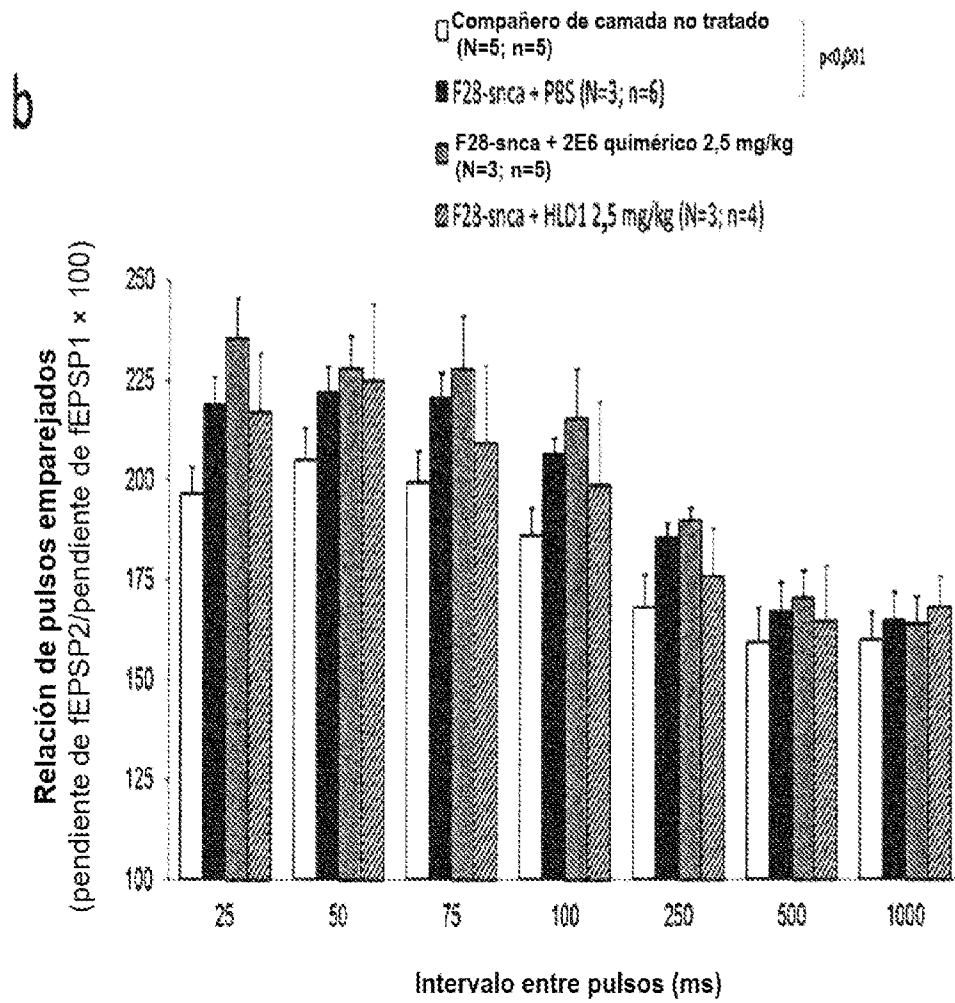


Fig. 19

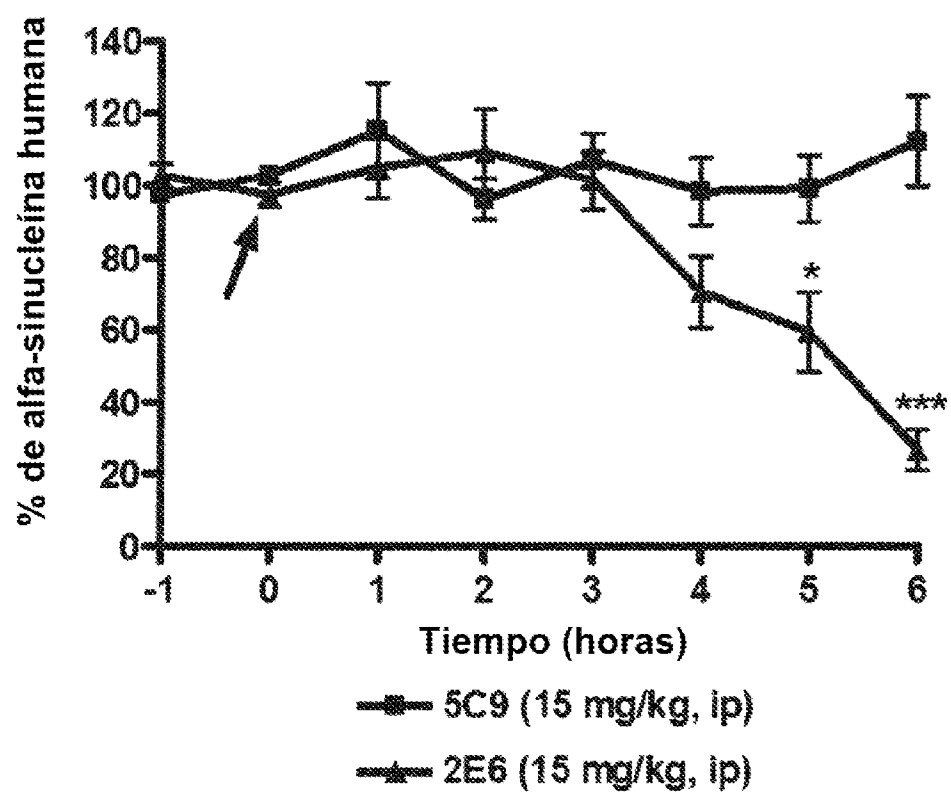


Fig. 20

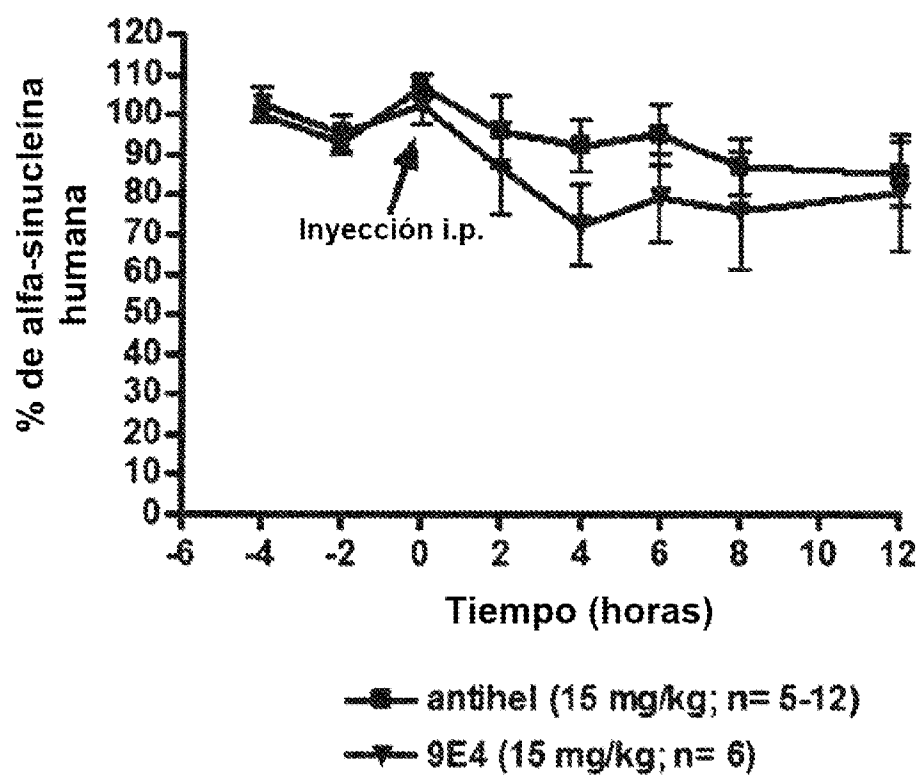


Fig. 21



Administración del anticuerpo a 15 mg/mg i.p. dos veces a la semana

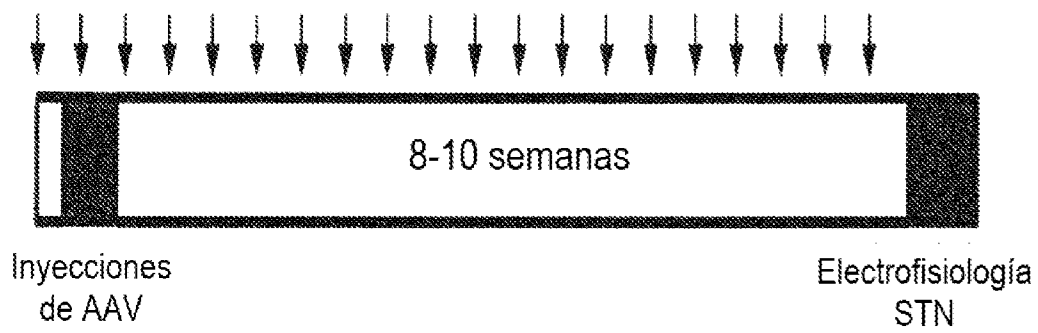


Fig. 22

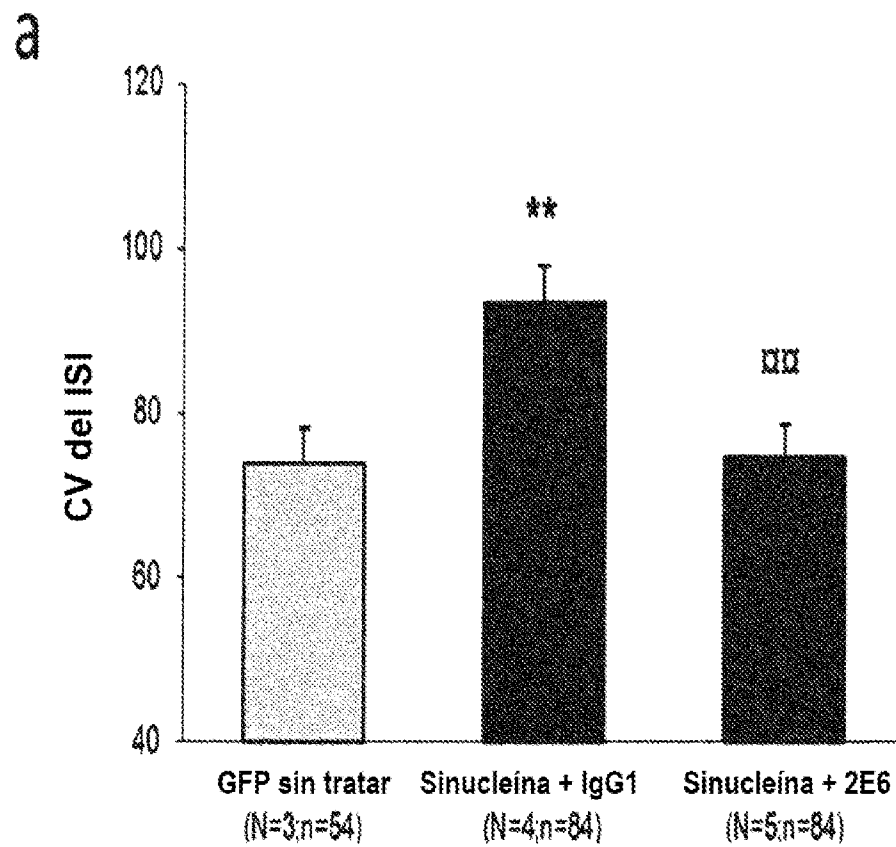


Fig. 23

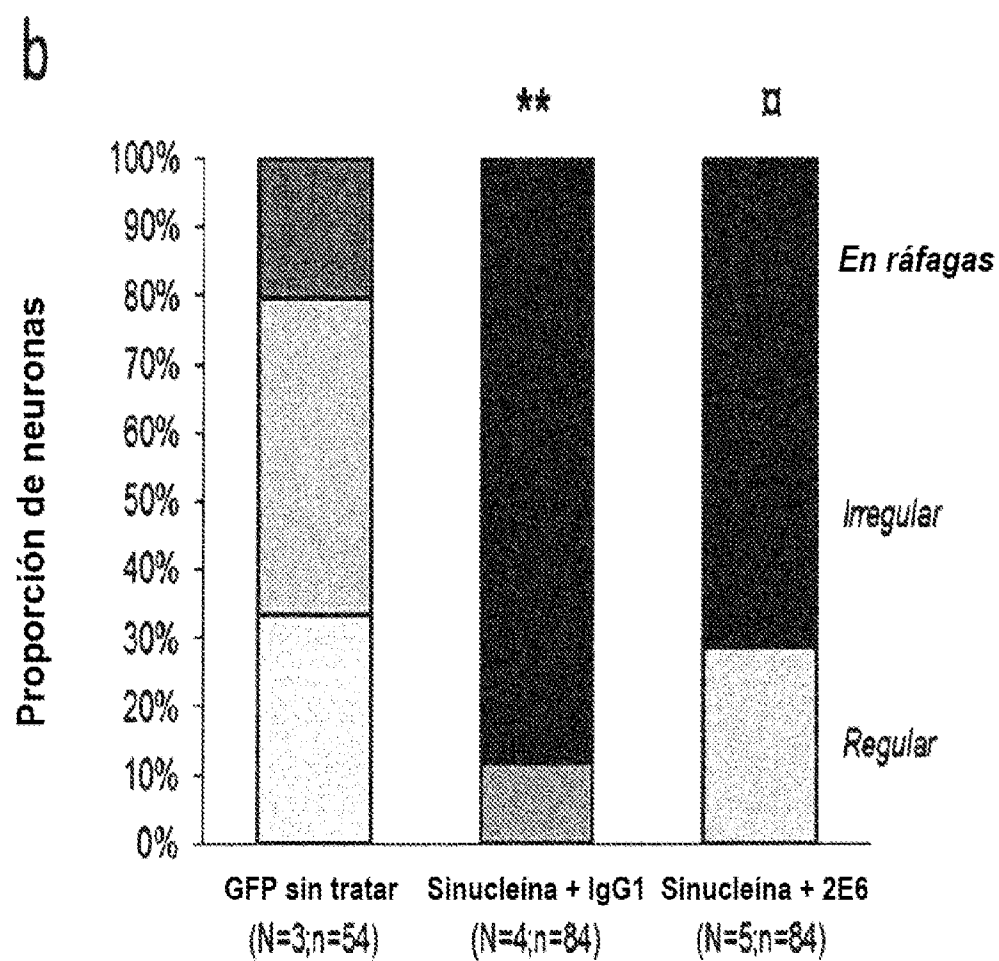


Fig. 24

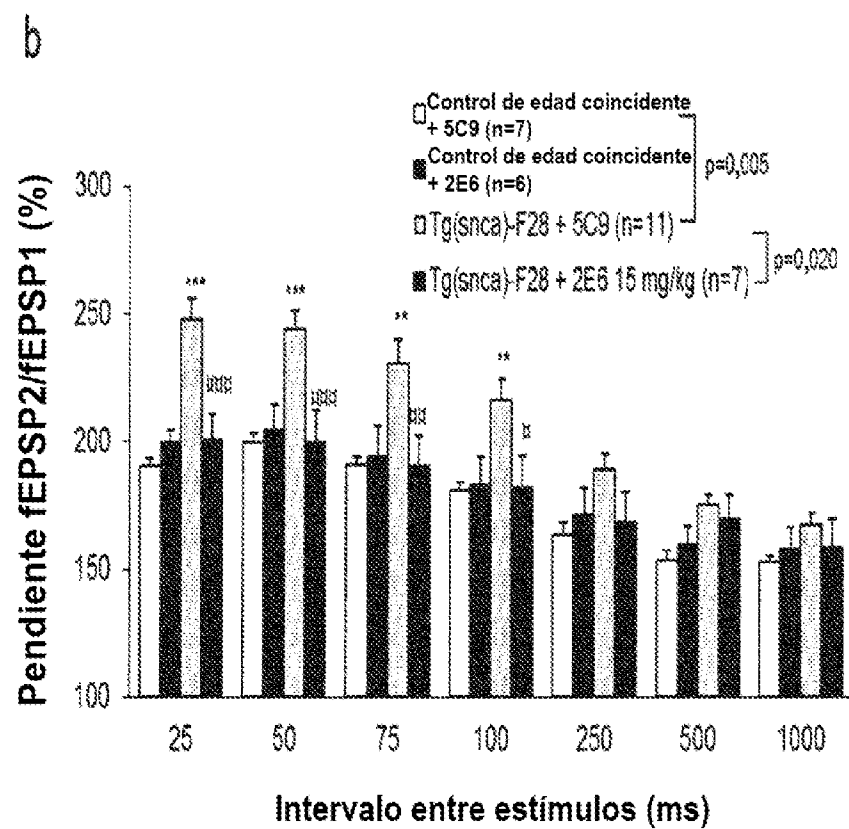


Fig. 25