

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 937 409**

51 Int. Cl.:

A61P 25/16 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2012** **E 18155441 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023** **EP 3378535**

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

30 Prioridad:

28.10.2011 US 201161553131 P

08.10.2012 US 201261711208 P

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

28.03.2023

73 Titular/es:

PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)

77 Sir John Rogerson's Quay, Block C Grand

Canal Docklands

Dublin 2, D02 VK60, IE

72 Inventor/es:

SALDANHA, JOSE y

NIJJAR, TARLOCHAN

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

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

ES 2 937 409 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados que reconocen la alfa-sinucleína

5 Antecedentes

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

La alfa-sinucleína es parte de una gran familia de proteínas, que incluye la beta-sinucleína y gamma-sinucleína y la sinoretina. La alfa-sinucleína se expresa en el estado normal asociada con las sinapsis y se cree que desempeña un papel en la plasticidad neural, en el aprendizaje y en la memoria. Varios estudios han implicado la alfa-sinucleína con un papel central en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. La proteína se puede agregar para formar fibrillas insolubles en condiciones patológicas. Por ejemplo, la sinucleína se acumula en los cuerpos de Lewy (Spillantini et al., *Nature* (1997) 388:839-40; Takeda et al., *J. Pathol.* (1998) 152:367-72; Wakabayashi et al., *Neurosci. Lett.* (1997) 239:45-8). Las mutaciones en el gen de alfa-sinucleína se aíslan junto con formas familiares raras de parkinsonismo (Kruger et al., *Nature Gen.* (1998) 18:106-8; Polymeropoulos, et al., *Science* (1997) 276:2045-7). La sobreexpresión de alfa sinucleína en ratones transgénicos (Masliah et al., *Science* (2000) 287:1265-9) y en la *Drosophila* (Feany et al., *Nature* (2000) 404:394-8) imita varios aspectos patológicos de una enfermedad con cuerpos de Lewy. Además, se ha sugerido que los oligómeros solubles de sinucleína pueden ser neurotóxicos (Conway KA, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) 97:571-576; VollesMJ, Lansbury PT, Jr *Biochemistry* (2003) 42:7871-7878). La acumulación de alfa-sinucleína con alteraciones morfológicas y neurológicas similares en especies y modelos animales tan diversos como los seres humanos, los ratones y las moscas, sugiere que esta molécula contribuye al desarrollo de la enfermedad con cuerpos de Lewy. El documento WO-A-2008/103472 describe agentes y métodos para el tratamiento de enfermedades asociadas con enfermedades sinucleinopáticas, que incluyen cuerpos de Lewy de alfa-sinucleína en el cerebro del paciente. Se describe el anticuerpo 9E4 monoclonal murino (número de acceso en ATCC PTA-8221). Masliah et al *PLoS One* 2011 Abr 29;6(4):e19338 describe que la inmunización pasiva con el anticuerpo 9E4 reduce las deficiencias de comportamiento y neuropatológicas en un modelo transgénico de alfa-sinucleína de la enfermedad con cuerpos de Lewy. El documento WO-A-2007/011907 describe anticuerpos humanos específicos para la alfa-sinucleína, para diagnóstico, monitorización o tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson'.

Resumen

La invención proporciona un anticuerpo que comprende una cadena pesada humanizada que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:8 y una cadena ligera humanizada que comprende una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO:5. El anticuerpo se une a la alfa-sinucleína con una afinidad igual o mayor que la del anticuerpo producido por el hibridoma depositado como ATCC PTA-8221. La región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada humana y la región constante de cadena ligera.

La región constante de cadena pesada puede ser de isotipo IgG1 humano. En algunos anticuerpos el alotipo es G1m3. En algunos anticuerpos, el alotipo es G1m1.

La invención proporciona además un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras humanizadas mencionadas anteriormente, que comprenden la región variable de cadena pesada mencionada anteriormente y la región variable de cadena ligera madura mencionada anteriormente, p. ej., SEQ ID NO: 17, 18 o 20.

La invención proporciona además una célula huésped que comprende un vector que comprende el ácido nucleico o ácidos nucleicos descritos anteriormente.

La divulgación describe además un método para tratar a un paciente que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad con cuerpos de Lewy, que comprende administrar al paciente un régimen eficaz de cualquiera de los

anticuerpos mencionados anteriormente. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, se inhibe el declive de la función cognitiva en el paciente. En algunos métodos, se reducen los agregados de alfa sinucleína neuríticos y/o axonales. En algunos métodos, se reduce la distrofia neurítica del paciente. En algunos métodos, se preserva la densidad sináptica y/o dendrítica. En algunos métodos, el método preserva la sinaptofisina y/o MAP2 del paciente.

La invención proporciona además el anticuerpo de la invención para uso en un método para tratar a un paciente que tiene o está en riesgo de sinucleinopatía, el método comprende administrar al paciente un régimen eficaz del anticuerpo de la invención mencionado anteriormente. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la enfermedad es trastorno del comportamiento del sueño REM (RBD). En algunos métodos, la enfermedad es demencia con cuerpos de Lewy (DLB) o atrofia multisistémica (MSA). En algunos métodos, se inhibe el declive de la función cognitiva en el paciente. En algunos métodos, se reducen los agregados de alfa sinucleína neuríticos y/o axonales. En algunos métodos, se reduce la distrofia neurítica del paciente. En algunos métodos, se preserva la densidad sináptica y/o dendrítica. En algunos métodos, el método preserva la sinaptofisina y/o MAP2 del paciente.

La invención proporciona además el anticuerpo de la invención para uso en un método para detectar los cuerpos de Lewy en un paciente que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad con cuerpos de Lewy, el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del anticuerpo de la invención mencionado anteriormente, en donde el anticuerpo se une a los cuerpos de Lewy y se detecta el anticuerpo unido. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la enfermedad es demencia con cuerpos de Lewy (DLB) o atrofia multisistémica (MSA). En algunos métodos, el anticuerpo está marcado.

La divulgación describe además un método para reducir la formación de cuerpos de Lewy en un paciente que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad con cuerpos de Lewy, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la enfermedad es demencia con cuerpos de Lewy (DLB) o atrofia multisistémica (MSA). En algunos métodos, se inhibe el declive de la función cognitiva en el paciente. En algunos métodos, se reducen los agregados de alfa sinucleína neuríticos y/o axonales. En algunos métodos, la distrofia neurítica del paciente se reduce. En algunos métodos, se preserva la densidad sináptica y/o dendrítica. En algunos métodos, el método preserva la sinaptofisina y/o MAP2 del paciente.

La divulgación describe además un método para inhibir la agregación de sinucleína o eliminar los cuerpos de Lewy o agregados de sinucleína en un paciente que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad con cuerpos de Lewy, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. En algunos métodos, la enfermedad es enfermedad de Parkinson. En algunos métodos, la enfermedad es demencia con cuerpos de Lewy (DLB) o atrofia multisistémica (MSA). En algunos métodos, se inhibe el declive de la función cognitiva en el paciente. En algunos métodos, se reducen los agregados de alfa sinucleína neuríticos y/o axonales. En algunos métodos, la distrofia neurítica del paciente se reduce. En algunos métodos, se preserva la densidad sináptica y/o dendrítica. En algunos métodos, el método preserva la sinaptofisina y/o MAP2 en el paciente.

La divulgación describe además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo mencionado antes.

La divulgación describe además un método para producir un anticuerpo, que comprende cultivar células transformadas con los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, de manera que la célula secrete el anticuerpo; y purificar el anticuerpo del medio de cultivo celular; en donde el anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Cualquier referencia a un método de tratamiento o diagnóstico ejercido en el cuerpo humano o animal debe interpretarse como la sustancia o composición para uso en tales métodos.

Breve descripción de las Figuras

La FIG. 1 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos del mAb murino parental (denominado m9E4) con la región variable madura de cadena pesada del 9E4 humanizado. 1791009Hu9E4VHFr (SEQ ID NO:7) es la secuencia V_H aceptora humana. Las regiones CDR según la definición de Kabat están subrayadas y en negrita.

La FIG. 2 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos del mAb murino parental (denominado m9E4) con la región variable madura de cadena ligera del 9E4 humanizado. 63102889Hu9E4VLFr (SEQ ID NO:2) es la secuencia V_L aceptora humana. Las regiones CDR según la definición de Kabat están subrayadas y en negrita.

La FIG. 3 muestra los resultados de la inmunoterapia pasiva con 9E4 sobre el funcionamiento de la memoria en una porción de sonda de la prueba del laberinto acuático de Morris.

La FIG. 4 muestra los resultados de la inmunoterapia pasiva con 9E4 sobre la velocidad y errores en la prueba de la barra redondeada.

La FIG. 5 muestra la inmunoprecipitación de varias versiones de anticuerpos 9E4 humanizados para su antígeno tomado del tejido enfermo. Ch9E4: 9E4 quimérico; H1L3: Hu9E4VHv1- Hu9E4VLv3; H3L2: Hu9E4VHv3- Hu9E4VLv2; H3L3: Hu9E4VHv3- Hu9E4VLv3; N.S.=no específico.

La FIG. 6 muestra la transferencia de Western de sinucleína humana recombinante con anticuerpos 9E4 de ratón, quiméricos y humanizados.

Breve descripción de las secuencias

- SEQ ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos de la región variable m9E4VL.
 10 SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la región variable 63102889Hu9E4VLFr.
 SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VLv1.
 SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VLv2.
 SEQ ID NO:5 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VLv3.
 SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de la región variable m9E4VH.
 15 SEQ ID NO:7 es la secuencia de aminoácidos de la región variable 1791009Hu9E4VHFr.
 SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VHv1.
 SEQ ID NO:9 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VHv2.
 SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VHv3.
 SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de la región variable Hu9E4VHv4.
 20 SEQ ID NO:12 es la secuencia de aminoácidos de alfa-sinucleína de referencia humana natural.
 SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera de 9E4 humanizado, con arginina en el N-terminal.
 SEQ ID NO:14 es la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de 9E4 humanizado.
 SEQ ID NO:15 es la secuencia de nucleótidos de la región variable Hu9E4VLv1.
 25 SEQ ID NO:16 es la secuencia de nucleótidos de la región variable Hu9E4VLv2.
 SEQ ID NO: 17 es la secuencia de nucleótidos de la región variable Hu9E4VLv3.
 SEQ ID NO:18 es la secuencia de nucleótidos de la región variable Hu9E4VHv1.
 SEQ ID NO:19 es la secuencia de nucleótidos de la región variable Hu9E4VHv2.
 SEQ ID NO:20 es la secuencia de nucleótidos de la región variable Hu9E4VHv3.
 30 SEQ ID NO:21 es la secuencia de nucleótidos de la región variable Hu9E4VHv4.
 SEQ ID NO:22 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal Hu9E4VL.
 SEQ ID NO:23 es la secuencia de nucleótidos del péptido señal Hu9E4VL.
 SEQ ID NO:24 es la secuencia de aminoácidos del péptido señal Hu9E4VH.
 SEQ ID NO:25 es la secuencia de nucleótidos del péptido señal Hu9E4VH.
 35 SEQ ID NO:26 es la secuencia de aminoácidos de consenso de Hu9E4VL.
 SEQ ID NO:27 es la secuencia de aminoácidos de consenso de Hu9E4VH.
 SEQ ID NO:28 es la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera de 9E4 humanizado, sin la arginina en el N-terminal.
 SEQ ID NO:29 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 9E4 humanizado versión 3 que comprende
 40 (a) una región variable y (b) una región constante con arginina en el N-terminal.
 SEQ ID NO:30 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 9E4 humanizado versión 3 que comprende (a) una región variable y (b) una región constante sin la arginina en el N-terminal.
 SEQ ID NO:31 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 9E4 humanizado versión 3 que comprende una región variable y una región constante.
 45 SEQ ID NO:32 es la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de alotipo G1m3 de 9E4 humanizado versión BIP.

Definiciones

- 50 Los anticuerpos monoclonales se proporcionan típicamente en forma aislada. Esto significa que un anticuerpo está normalmente al menos en un 50 % p/p limpio de proteínas y otras macromoléculas que surgen de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal se combine con un exceso de excipiente o excipientes farmacéuticos aceptables u otro vehículo destinado a facilitar su uso. Algunas veces los anticuerpos monoclonales están al menos en un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 o 99 % p/p libres de proteínas y otras
 55 macromoléculas procedentes de la producción o purificación.

- La unión específica de un anticuerpo monoclonal a su antígeno objetivo significa una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} M⁻¹. La unión específica es detectablemente más alta en magnitud y distinguible de la unión no específica que tiene lugar con al menos un objetivo no relacionado. La unión específica puede ser el resultado de la
 60 formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o fijación espacial particular (p.ej., tipo cerradura y llave) mientras que la unión no específica es normalmente el resultado de fuerzas de van der Waals. La unión específica sin embargo no implica necesariamente que un anticuerpo monoclonal se una a un objetivo y solamente a uno.

- La unidad estructural básica de un anticuerpo es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares
 65 idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye la región variable de

aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. Esta región variable está inicialmente expresada enlazada con un péptido señal escindible. La región variable sin el péptido señal se denomina a veces una región variable madura. Así, por ejemplo, una región variable madura de cadena ligera significa una región variable de cadena ligera sin el péptido señal de la cadena ligera. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

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

Las regiones variables maduras de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Así, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Las cadenas presentan todas la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, denominadas también regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, haciendo posible la unión a un epítipo específico. Desde N-terminal a C-terminal, ambas cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), o Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989). Kabat también proporciona una convención de numeración ampliamente usada (numeración de Kabat) en la cual a los residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se les asigna el mismo número (p.ej., H83 significa la posición 83 por numeración de Kabat en la región variable de la cadena pesada madura; así mismo la posición L36 significa la posición 36 por numeración de Kabat en la región variable de la cadena ligera madura).

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto a partir del cual se derivan para la unión específica con el objetivo incluyendo por separado cadenas pesadas, cadenas ligeras de Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)c, diacuerpos, Dabs, nanocuerpos, y Fv. Los fragmentos se pueden producir por técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" incluye también un anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo artificial híbrido que tiene dos pares diferentes de cadenas pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes (véase, p.ej., Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-53 (1992)). En algunos anticuerpos biespecíficos, los dos pares diferentes de cadenas pesada/ligera incluyen un par de cadena pesada/cadena ligera de 9E4 humanizado y un par de cadena pesada/cadena ligera específico para un epítipo sobre alfa sinucleína diferente del que se une a 9E4. Los anticuerpos humanizados se describen en general más adelante en la Sección IV B.

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

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

La competición entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el cual el anticuerpo de ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común (véase, p.ej., Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Un anticuerpo de ensayo compete con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo de ensayo (p.ej., al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe la unión del anticuerpo de referencia en al menos un 50 % pero preferiblemente 75 %, 90 % o 99 % medido en un ensayo competitivo de unión. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competición (anticuerpos competitivos) incluyen los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y los anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido al anticuerpo de referencia para que tenga lugar el impedimento estérico.

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

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

El porcentaje de identidad de secuencia se determina con secuencias de anticuerpo alineadas al máximo mediante la práctica de numeración de Kabat. Después de alineamiento, si una región de anticuerpo del sujeto (p.ej., la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones del anticuerpo del sujeto y el de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región del anticuerpo del sujeto como en la región del anticuerpo de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contar los huecos, multiplicado por 100 para convertirlo a porcentaje.

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

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

A menos que sea de otra manera por el contexto, el término "aproximadamente" engloba los valores dentro del SEM de un valor declarado.

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

El término "síntoma" se refiere a una manifestación subjetiva de una enfermedad, tal como alteración en la forma de andar, tal como es percibida por el paciente. Un "signo" se refiere a una manifestación objetiva de una enfermedad tal como es observada por el médico.

Significancia estadística quiere decir $p \leq 0,05$.

"Función cognitiva" se refiere a procesos mentales tales como cualquiera o todos los de atención, memoria, producción y entendimiento del lenguaje, resolución de problemas, y prestación de interés al entorno y cuidado personal.

"Aumento de la función cognitiva" o "mejora de la función cognitiva" se refiere a una mejora con respecto a una línea base, por ejemplo, diagnóstico o iniciación del tratamiento. "Declive de la función cognitiva" se refiere a una disminución de la función con respecto a dicha línea base.

En sistemas de modelos animales tales como rata o ratón, la función cognitiva se puede medir por métodos que utilizan un laberinto en el cual los sujetos utilizan información espacial (p.ej., el laberinto acuático de Morris, el laberinto circular de Barnes, el laberinto del brazo radial elevado, laberinto en T y otros), condicionamiento del miedo, evitación activa, campo abierto iluminado, medidor de actividad en oscuridad, laberinto en cruz elevado, prueba exploratoria de dos compartimentos o prueba de natación forzada.

En los seres humanos, la función cognitiva se puede medir por una o más de varias pruebas normalizadas. Han sido descritos ejemplos de una prueba o ensayo de la función cognitiva (Ruoppila, 1. and Suutama, T. Scand. J. Soc. Med. Suppl. 53,44-65, 1997) e incluyen pruebas psicométricas normalizadas (p. ej., escala de memoria de Wechsler, la escala de inteligencia adulta de Wechsler, matrices progresivas estándar de Raven, prueba de habilidades mentales en el adulto de Schaie-Thurstone), pruebas neuropsicológicas (p. ej. Luria-Nebraska), autoevaluaciones metacognitivas (p. ej. Cuestionario de metamemoria), pruebas de cribado visual-espacial (p. ej. figuras de Poppelreuter, reconocimiento del reloj, dibujo de panales y cancelación), pruebas de cribado cognitivo (p. ej. miniprueba del estado mental de Folstein) y pruebas del tiempo de reacción. Otras pruebas estándar del funcionamiento cognitivo incluyen la escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer-subescala cognitiva (ADAS-cog); la impresión clínica global de la escala de cambio (CIBIC-escala plus); el estudio cooperativo de la enfermedad de Alzheimer - escala de actividades de la vida diaria (ADCS-ADL); el miniexamen del estado mental (MMSE); el inventario neuropsiquiátrico (NPI); la escala del índice de demencia clínica (CDR); la batería automatizada de pruebas neuropsicológicas de Cambridge (CANTAB) o la evaluación geriátrica clínica de Sandoz

(SCAG), prueba de Stroop, prueba del trazo, prueba de secuencia de números de Wechsler, y la prueba cognitiva computarizada CogState. En adición, la función cognitiva se puede medir utilizando técnicas de imagen tales como tomografía de emisión de positrones (PET), imagen por resonancia magnética funcional (fMRI), tomografía computarizada de emisión de fotones individuales (SPECT), o cualquier otra técnica de imagen que permita medir la función cerebral.

Descripción detallada

I. General

La invención proporciona el anticuerpo humanizado 9E4 como se indica en las reivindicaciones. El anticuerpo es útil para el tratamiento y el diagnóstico de una enfermedad con cuerpos de Lewy.

II. Moléculas objetivas

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

```
MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV
GSKTKEGVVH GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK
TVEGAGSIAA ATGFVKKQDL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE
EGYQDYEPEA (SEQ ID NO:12)
```

(Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:11282-6); número de acceso de GenBank: P37840). La proteína tiene tres dominios reconocidos, un dominio de repetición KTK que cubre los aminoácidos 1-61, un dominio NAC (componente no amiloide) que cubre aproximadamente los aminoácidos 60-95, y un dominio ácido en C-terminal que va desde aproximadamente el aminoácido 98 al 140.

A menos que sea de otra manera por el contexto, la referencia a la alfa-sinucleína o sus fragmentos incluye la secuencia de aminoácidos de referencia humana natural indicada antes, y sus variantes alélicas humanas, particularmente las asociadas con una enfermedad con cuerpos de Lewy (p.ej., E46K, A30P y A53T, indicando la primera letra el aminoácido de la SEQ ID NO:12, el número es la posición del codón en la SEQ ID NO:12, y la segunda letra es el aminoácido en la variante alélica). Tales variantes pueden estar opcionalmente presentes individualmente o en cualquier combinación en cualquiera de los aspectos de la invención descritos más adelante. Las mutaciones inducidas E83Q, A90V, A76T, que aumentan la agregación de la alfa sinucleína, también pueden estar presentes individualmente o en combinación una con otra y/o las variantes alélicas humanas E46K, A30P y A53T.

III. Enfermedades con cuerpos de Lewy

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

IV. Anticuerpos

A. Especificidad de unión y propiedades funcionales

El anticuerpo humanizado de la invención se une específicamente a la alfa sinucleína humana. La afinidad de algunos anticuerpos humanizados divulgados (es decir, Ka) está preferiblemente dentro de un factor de cinco o de dos con respecto a la del anticuerpo 9E4 de ratón. El anticuerpo humanizado de la invención tiene una afinidad que

es igual (dentro del error experimental) o mayor que la del anticuerpo 9E4 de ratón. Los anticuerpos humanizados se unen al mismo epítipo y/o compiten con el anticuerpo 9E4 de ratón por la unión a la alfa sinucleína humana.

En algunos anticuerpos, el 9E4 humanizado forma un brazo de un anticuerpo biespecífico, cuyo otro brazo es un anticuerpo que se une a un receptor expresado en la barrera hematoencefálica, tal como un receptor de insulina, un receptor del factor de crecimiento tipo insulina (IGF), un receptor de leptina, o un receptor de lipoproteína, o preferiblemente un receptor de transferrina (Friden et al., PNAS 88:4771-4775, 1991; Friden et al., Science 259:373-377, 1993). Tal anticuerpo biespecífico puede ser transferido a través de la barrera hematoencefálica por transcitos mediado por el receptor. La absorción por el cerebro del anticuerpo biespecífico se puede aumentar además mediante modificación del anticuerpo biespecífico para reducir su afinidad por el receptor de la barrera hematoencefálica. La reducción de la afinidad por el receptor dio como resultado una distribución más amplia en el cerebro (véase, p.ej., Atwal. et al. Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu et al. Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011).

Los anticuerpos biespecíficos divulgados pueden ser también (1) un anticuerpo de dominio variable dual (DVD-Ig), donde cada cadena ligera y cada cadena pesada contienen dos dominios variables en tándem a través de una corta conexión peptídica (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) un Tandab, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena sencilla que produce un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos objetivo; (3) un flexicuerpo, que es una combinación de scFvs con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (4) una molécula llamada "dock lock", basada en la "dimerización y el dominio de anclaje" en la proteína cinasa A, la cual, cuando se aplica a los Fabs, puede dar una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos ligados a un fragmento Fab diferente; (5) una molécula llamada Scorpion, que comprende, p.ej., dos scFvs fusionados a ambos terminales de una región Fc humana. Los ejemplos de plataformas útiles para preparar anticuerpos biespecíficos incluyen, pero no se limitan a BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab y Mab2 (F-star), IgG1 con Fc diseñado (Xencor) o DuoBody (basado en intercambio de brazos de Fab, Genmab).

B. Anticuerpos humanizados

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo creado por ingeniería genética en el cual las CDR de un anticuerpo "donador" no humano son injertadas en las secuencias de un anticuerpo "aceptor" humano (véase, p.ej., Queen et al., US5,530,101 y 5,585,089; Winter et al., US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557). Las secuencias del anticuerpo acepto pueden ser, por ejemplo, una secuencia de la región variable de un anticuerpo humano maduro, un combinado de estas secuencias, una secuencia de consenso de las secuencias de anticuerpo humano (p.ej., secuencias de consenso de la región variable de cadena ligera y pesada de Kabat, 1991, *supra*), o una secuencia de la región variable de la línea germinal. Una secuencia aceptora preferida para la cadena pesada es la región variable de cadena pesada madura humana con código de acceso del NCBI, AAC50998 (GI: 1791009) u otra región variable de cadena pesada madura derivada de la línea germinal IGHV3-7'01 o IGHV3-7'02 (nombre de los clones V3-7 o VH3-11) (Glas et al., Clin Exp Immunol. 107:372-80, 1997) o una secuencia de una región variable de cadena pesada madura que incorpora una de estas secuencias de la línea germinal. Para la cadena ligera, una secuencia aceptora preferida es la región variable de cadena ligera madura con código de acceso del NCBI AAY33350 (GI:63102889) u otra secuencia de cadena ligera madura derivada de la línea germinal IGKV1D-39 o IGKV1-39 (nombre del clon O2 o 012) (Kramer et al., Eur J Immunol. 35:2131-45, 2005) o una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que incorpora una de estas secuencias de la línea germinal. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado de la divulgación es un anticuerpo que tiene tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada definidas según Kabat procedentes del anticuerpo 9E4 donador y las secuencias marco de la región variable madura y las regiones constantes, si están presentes, totalmente o sustancialmente procedentes de las secuencias de anticuerpo humano. Asimismo, una cadena pesada humanizada es una cadena pesada que tiene tres CDR de cadena pesada definidas según Kabat procedentes de la cadena pesada del anticuerpo 9E4, y una secuencia variable de cadena pesada madura y una secuencia de la región constante de cadena pesada, si está presente, totalmente o sustancialmente procedentes de la secuencia de cadena pesada del anticuerpo humano. Asimismo, una cadena ligera humanizada es una cadena ligera que tiene tres CDR de cadena ligera definidas según Kabat procedentes de la cadena ligera del anticuerpo 9E4, y una secuencia variable de cadena ligera madura y una secuencia de la región constante de cadena ligera, si está presente, totalmente o sustancialmente procedentes de la secuencia de cadena ligera del anticuerpo humano. Las secuencias marco de la región variable madura de una cadena de anticuerpo o la secuencia de la región constante de una cadena de anticuerpo proceden sustancialmente de una secuencia marco de la región variable humana madura o de una secuencia de la región constante humana respectivamente cuando al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de los correspondientes residuos definidos por Kabat son idénticos.

Se pueden seleccionar ciertos aminoácidos de los residuos marco de la región variable madura humana para sustitución en base a su posible influencia sobre la conformación de CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de tales posibles influencias se hace por modelación, examen de las características de los aminoácidos en particular sus localizaciones, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

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

- (1) se una directamente al antígeno de modo no covalente,
- (2) sea adyacente a una región CDR,
- (3) interactúe de otra manera con una región CDR (p.ej. que esté a menos de aproximadamente 6 Å de una región CDR)
- (4) medie en la interacción entre las cadenas pesadas y ligeras.

La divulgación proporciona formas humanizadas del anticuerpo 9E4 de ratón que incluyen tres ejemplos de regiones variables maduras humanizadas de cadena ligera (Hu9E4VLv1-v3; SEQ ID NOS:3-5) y cuatro ejemplos de regiones variables maduras humanizadas de cadena pesada (Hu9E4VHv1-v4; SEQ ID NOS:8-11). La SEQ ID NO:4 incluye las tres CDR de Kabat de la cadena ligera de 9E4 de ratón y los marcos de AAY33350 de la región variable madura. Las SEQ ID NOS. 3 y 5 incluyen las retromutaciones que se muestran en la Tabla 2. La SEQ ID NO. 11 incluye las tres CDR de Kabat de 9E4 de ratón y los marcos de AAC50998 de la región variable madura. Las SEQ ID Nos: 8 -10 incluyen las retromutaciones que se muestran en la Tabla 3.

La divulgación proporciona variantes del anticuerpo 9E4 humanizado en las cuales la región variable madura de cadena pesada humanizada muestra al menos el 90 %, 95 % o 99 % de identidad con las SEQ ID NOs:8-11 y la región variable madura de cadena ligera humanizada muestra al menos el 90, 95 o 99 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs:3-5, pero en las cuales cualquier variación con la SEQ ID NO. designada tiene lugar en el marco de la región variable madura en lugar de en una CDR de Kabat. En algunos de tales anticuerpos, la posición L36 está ocupada por Y o F, y/o la posición L83 está ocupada por F o L, y/o la posición H73 está ocupada por N o D y/o la posición H93 está ocupada por A o S (todas las posiciones aquí, como en otro sitio, en esta solicitud siguen la numeración de Kabat). En algunos de tales anticuerpos, se mantienen algunas o todas las retromutaciones de Hu9E4VLv1-v3 y Hu9E4VHv1-v4. En otras palabras, una o ambas posiciones H73 y H93 de la cadena pesada están ocupadas por D y A respectivamente. Asimismo, en algunos anticuerpos una o ambas posiciones L36 y L83 de la cadena ligera están ocupadas por F y L respectivamente. En algunos anticuerpos, 1, 2, 3 o las cuatro posiciones H73, H93, L36 y L83 están ocupadas por D, A, F y L respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones 0, 1, o 2 están cambiadas en el marco de la región variable madura de cadena pesada con respecto a la SEQ ID NO:11, y las posiciones 0, 1, o 2 están cambiadas en el marco de la región variable madura de cadena ligera con respecto a la SEQ ID NO:4.

[illegible]

(numeración de Kabat) está ocupada por D, y la posición H93 (numeración de Kabat) está ocupada por S. En algunos de tales anticuerpos, la posición L83 (numeración de Kabat) está ocupada por L, la posición H73 (numeración de Kabat) está ocupada por D, y la posición H93 (numeración de Kabat) está ocupada por A. En algunos de tales anticuerpos, la posición H73 (numeración de Kabat) está ocupada por D. En algunos de tales anticuerpos, la posición H73 (numeración de Kabat) está ocupada por D y la posición H93 (numeración de Kabat) está ocupada por S. En algunos de tales anticuerpos, la posición H73 (numeración de Kabat) está ocupada por D y la posición H93 (numeración de Kabat) está ocupada por A. En algunos de tales anticuerpos, la posición H93 (numeración de Kabat) está ocupada por S. En algunos de tales anticuerpos, la posición H93 (numeración de Kabat) está ocupada por A. En algunos de tales anticuerpos, la posición L36 está ocupada por Y, la posición L83 está ocupada por F, la posición H73 está ocupada por N y la posición H93 está ocupada por S. Algunos ejemplos de anticuerpos con residuos deseables en las posiciones L36, L83, H73, y H93 y combinaciones de los mismos se enumeran en la Tabla 1 que sigue:

Tabla 1: Ejemplos de anticuerpos con residuos deseables en las posiciones L36, L83, H73, y H93 (numeración de Kabat).

Ejemplo de anticuerpo	L36	L83	H73	H93
1	F	F	N	A
2	F	L	N	A
3	F	F	D	A
4	F	F	N	S
5 (versión 3)	F	L	D	A
6	F	L	N	S
7 (versión 1)	F	F	D	S
8	F	L	D	S
9	Y	L	N	A
10	Y	L	D	A
11	Y	L	N	S
12	Y	L	D	S
13	Y	F	D	A
14	Y	F	D	S
15 (versión 2)	Y	F	N	S

En el anticuerpo de la invención, la región variable madura de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO:8, y la región variable madura de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO:5.

C. Selección de la región constante

Las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo humanizado de la invención se enlazan con una región constante humana.

La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea o no la citotoxicidad mediada por las células dependiente del anticuerpo, la fagocitosis celular dependiente del anticuerpo y/o la citotoxicidad dependiente del complemento. Por ejemplo, los isótopos humanos IgG1 y IgG3 tienen citotoxicidad dependiente del complemento y los isótopos humanos IgG2 e IgG4 no la tienen. Los IgG1 e IgG3 humanos inducen también funciones efectoras mediadas por las células más fuertes que los IgG2 e IgG4 humanos. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Una región constante kappa de cadena ligera humana de ejemplo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. Algunas de tales regiones constantes kappa de cadena ligera pueden ser codificadas por una secuencia de ácido nucleico. La arginina N-terminal de SEQ ID NO:13 se puede omitir, en cuyo caso la región constante de cadena ligera kappa tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28. Algunas de tales regiones constantes de cadena ligera kappa pueden estar codificadas por una secuencia de ácido nucleico. Una región constante IgG1 humana de cadena pesada de ejemplo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14 (con o sin la lisina de C-terminal). Algunas de tales regiones constantes de cadena pesada pueden ser codificadas por una secuencia de ácido nucleico. Los anticuerpos pueden ser expresados como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos de cadena sencilla en los cuales los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras maduras se unen a través de un espaciador.

Las regiones constantes humanas presentan variación alotípica y variación isoalotípica entre diferentes individuos, esto es, las regiones constantes pueden diferir en diferentes individuos en una o más posiciones polimórficas. Los isoalotipos se diferencian de los alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se unen a una región no polimórfica de uno o más de otros isotipos. Así, por ejemplo, otra región constante de cadena pesada que es del alotipo Gm3 de IgG1 y tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32. Aún otra región constante de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32 excepto que carece de la lisina de C-terminal.

Uno o varios aminoácidos en el extremo amino o carboxi terminal de la cadena ligera y/o pesada, tal como la lisina C-terminal de la cadena pesada puede omitirse o derivatizarse en una proporción o la totalidad de las moléculas. Se pueden hacer sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora tal como la citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC (véase, p. ej., Winter et al., patente de Estados Unidos No. 5,624,821 ; Tso et al., patente de Estados Unidos No. 5,834,597 ; y Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), o para prolongar la vida media en seres humanos (véase, p. ej., Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Las sustituciones de ejemplo incluyen una Gln en la posición 250 y/o una Leu en la posición 428 (en este párrafo se usa la numeración EU para la región constante) para aumentar la vida media de un anticuerpo. La sustitución en cualquiera o la totalidad de las posiciones 234, 235, 236 y/o 237 reduce la afinidad por receptores de Fcγ, particularmente el receptor FcγRI (véase, p. ej., el documento US 6,624,821). Algunos anticuerpos tienen sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de IgG1 humana para reducir las funciones efectoras. Opcionalmente, las posiciones 234, 236 y/o 237 en IgG2 humana se sustituyen con alanina y la posición 235 con glutamina (véase, p. ej., el documento US 5,624,821).

D. Expresión de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos pueden ser producidos por expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos pueden ser de codones optimizados para la expresión en el tipo de células deseado (p.ej., CHO o Sp2/0). Las construcciones de ácido nucleico recombinante incluyen típicamente una secuencia de control de la expresión enlazada operablemente a las secuencias codificadoras de las cadenas del anticuerpo, incluyendo las regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas. Las secuencias de control de la expresión pueden ser sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o de transfectar células hospedantes eucariotas. Una vez que ha sido incorporado el vector en el hospedante apropiado, se mantiene el hospedante en condiciones adecuadas para la expresión a alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recogida y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada. El vector o vectores que codifican las cadenas de anticuerpo pueden contener también un gen seleccionable, tal como dihidrofolato reductasa, para permitir la amplificación del número de copias de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas de anticuerpo.

E. coli es un hospedante procariota particularmente útil para expresar anticuerpos, particularmente fragmentos de anticuerpo. Los microbios, tales como las levaduras son también útiles para la expresión. Un hospedante preferido entre las levaduras es *saccharomyces*, con los vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, un origen de la replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato cinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores de levaduras inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Se pueden utilizar células de mamífero para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). Se han desarrollado en la técnica una serie de líneas celulares de hospedante adecuado capaces de segregar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas de células CHO, varias líneas de células COS, células HeLa, células HEK293, células L, y mielomas que no producen anticuerpos incluyendo Sp2/0 y NS0. Puede ser ventajoso utilizar células no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), y los sitios necesarios de información del proceso, tales como los sitios de unión al ribosoma, sitios de empalme de RNA, sitios de poliadenilación, y secuencias de terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión adecuadas son promotoras derivadas de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, papilomavirus bovino, y similares. Véase Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Una vez introducido el vector o vectores que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo en el cultivo celular, los conjuntos de células pueden ser cribados para determinar la productividad del crecimiento y la calidad del producto en medios libres de suero. Los conjuntos de células principales productores se pueden someter entonces a la clonación de células individuales basada en FACS para generar líneas monoclonales. Las productividades específicas por encima de 50 pg o 100 pg por célula al día, que corresponden a títulos de producto superiores a 7,5 g/L de cultivo, pueden ser ventajosas. Los anticuerpos producidos por clones de células individuales pueden ser analizados también en cuanto a turbidez, propiedades de filtración, PAGE, IEF, barrido UV, HP-SEC, mapa de carbohidratopolisacáridos, espectrometría de masas, y ensayo de selección, tal como ELISA o Biacore. Un clon seleccionado puede ser depositado entonces en múltiples viales y conservado congelado para uso posterior.

Una vez expresados, los anticuerpos pueden ser purificados según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo captura de la proteína A, cromatografía en columna (p.ej., interacción hidrófoba o intercambio iónico), reducción del pH para inactivación viral y similares (véase en general, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Metodología para la producción comercial de anticuerpos que incluye la optimización de codones, selección de promotores, elementos de transcripción, y terminadores, clonación de células individuales libre de suero, depósito de células, uso de marcadores de selección para la amplificación del número de copias, terminador CHO, clonación de

células individuales libre de suero, mejora de los títulos de proteínas (véase, p.ej., los documentos US 5,786,464, US 6,114,148, US 6,063,598, US 7,569,339, WO2004/050884, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2005/019442, WO2008/107388, y WO2009/027471, y US 5,888,809).

5 V. Ácidos nucleicos

La invención proporciona además ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras descritas anteriormente. Típicamente, los ácidos nucleicos codifican también un péptido señal fusionado con las cadenas pesadas y ligeras maduras (p.ej., los péptidos señales que tienen secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 22 y 24 que pueden ser codificadas por las SEQ ID NOS: 23 y 25). Las secuencias codificadoras en los ácidos nucleicos pueden estar en conexión operable con las secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias codificadoras, tales como un sitio promotor, potenciador, de unión a ribosoma, señal de terminación de la transcripción y similares. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras se pueden presentar en forma aislada o pueden ser clonados en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos pueden ser sintetizados por ejemplo por, síntesis en estado sólido o PCR de oligonucleótidos de solapamiento. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras se pueden enlazar como un ácido nucleico contiguo, p.ej., dentro de un vector de expresión, o pueden estar separados, p.ej., cada uno clonado en su propio vector de expresión.

20 VI. Aplicaciones terapéuticas

La divulgación describe un anticuerpo para uso en varios métodos para tratar o para efectuar la profilaxis de la enfermedad con cuerpos de Lewy en pacientes que sufren o están en riesgo de sufrir tal enfermedad. Los pacientes que pueden recibir tratamiento incluyen los individuos en riesgo de una enfermedad con cuerpos de Lewy pero que no presentan síntomas, así como los pacientes que actualmente presentan síntomas o los signos tempranos de aviso de las sinucleinopatías, por ejemplo, enlentecimiento del EEG, manifestaciones neuropsiquiátricas (depresión, demencia, alucinaciones, ansiedad, apatía, anhedonia), cambios autonómicos (hipotensión ortostática, trastornos de la vejiga, estreñimiento, incontinencia fecal, sialorrea, disfagia, disfunción sexual, cambios en el flujo sanguíneo cerebral), cambios sensoriales (olfativos, dolor, sensaciones anormales de discriminación de colores), trastornos del sueño (trastorno de comportamiento del sueño REM (RBD), síndrome de las piernas inquietas/movimientos periódicos de las extremidades, hipersomnia, insomnio) y otros signos y síntomas misceláneos (fatiga, diplopía, visión borrosa, seborrea, pérdida/ganancia de peso). Por lo tanto, los presentes métodos se pueden administrar profilácticamente a individuos que tienen un riesgo genético conocido de una enfermedad con cuerpos de Lewy. Tales individuos incluyen los que tienen familiares que han sufrido esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo frente a la enfermedad de Parkinson incluyen mutaciones en la alfa-sinucleína o genes Parkin, UCHL1, y CYP2D6; particularmente mutaciones en las posiciones 30 y 53 del gen de alfa-sinucleína. Los individuos que sufren actualmente la enfermedad de Parkinson pueden ser reconocidos por sus manifestaciones clínicas incluyendo temblor de reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural.

En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (p.ej., 10, 20, 30). Normalmente, sin embargo, no es necesario empezar el tratamiento hasta que un paciente llega a los 40, 50, 60 o 70 años. El tratamiento típicamente implica múltiples dosis durante un período de tiempo. El tratamiento se puede monitorizar valorando las respuestas de anticuerpos, o células T o células B activadas para un agente terapéutico (p.ej., una forma truncada del péptido alfa-sinucleína) a lo largo del tiempo. Si la respuesta falla, está indicada una dosis de refuerzo.

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

El deterioro cognitivo, declive progresivo en la función cognitiva, cambios en la morfología del cerebro, y cambios en la función cerebrovascular se observan comúnmente en los pacientes que sufren o tienen riesgo de sufrir una enfermedad con cuerpos de Lewy. La administración de los presentes anticuerpos puede inhibir o retrasar el declive de la función cognitiva en tales pacientes.

La divulgación proporciona también métodos de conservar o aumentar la densidad sináptica y/o la densidad dendrítica. Se puede medir un índice de cambios en la densidad sináptica o en la densidad dendrítica mediante marcadores de la formación de sinapsis (sinaptofisina) y/o dendritas (MAP2). En algunos métodos, la densidad sináptica o dendrítica se puede restaurar al nivel de la densidad sináptica o dendrítica de un sujeto sano. En algunos métodos, el nivel medio de la densidad sináptica o dendrítica en pacientes tratados puede estar elevado en un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % o más en comparación con una población de pacientes control no tratados.

VII. Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

En aplicaciones profilácticas, un anticuerpo o una composición farmacéutica igual se administran a un paciente sensible a una enfermedad, o de otra manera en riesgo de una enfermedad en un régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) eficaz para reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retrasar el inicio de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. En algunas aplicaciones profilácticas, el régimen es eficaz para inhibir o retrasar la acumulación de alfa sinucleína y fragmentos truncados en el cerebro, y/o para inhibir o retrasar sus efectos tóxicos y/o para inhibir o retrasar el desarrollo de déficits de comportamiento. En aplicaciones terapéuticas, se administra un anticuerpo o agente que induce un anticuerpo, a un paciente sospechoso de sufrir, o que sufre ya una enfermedad con cuerpos de Lewy en un régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) eficaz para mejorar o al menos inhibir un deterioro posterior de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. En algunas aplicaciones terapéuticas, el régimen es eficaz para reducir o al menos inhibir el aumento posterior de los niveles de alfa sinucleína y fragmentos truncados, toxicidades asociadas y/o déficits de comportamiento.

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

Las dosis eficaces varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio objetivo, estado fisiológico del paciente incluyendo el tipo de enfermedad con cuerpos de Lewy, si el paciente es o no un portador de ApoE, si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas, y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

Un ejemplo de intervalo de dosis para los anticuerpos es de aproximadamente $0,01$ a 5 mg/kg, y más usualmente de $0,1$ a 3 mg/kg o $0,15$ - 2 mg/kg o $0,15$ - $1,5$ mg/kg, de peso corporal del paciente. El anticuerpo se puede administrar en dosis tales como diarias, en días alternos, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, trimestralmente, o según cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un ejemplo de tratamiento incluye la administración en dosis múltiples durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Ejemplos adicionales de regímenes de tratamiento incluyen la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

Los anticuerpos se pueden administrar por una vía periférica (esto es, una en la que un anticuerpo administrado o inducido cruza la barrera hematoencefálica para alcanzar un sitio seleccionado en el cerebro. Las vías de administración incluyen la vía tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. Algunas vías para administración de anticuerpos son intravenosa y subcutánea. Este tipo de inyección se realiza lo más típicamente en los músculos de brazo o pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal.

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

Los presentes regímenes se pueden administrar en combinación con otro agente eficaz en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad a tratar. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Parkinson, se pueden usar en combinación con los presentes regímenes inmunoterapia frente a la alfa sinucleína, documento WO/2008/103472, levodopa, agonistas de la dopamina, inhibidores de COMT, inhibidores de MAO-B, amantadina, o agentes anticolinérgicos.

VIII. Otras aplicaciones

El anticuerpo descrito antes se puede utilizar para detectar la alfa-sinucleína en el contexto de diagnóstico o tratamiento clínico o en investigación. Los anticuerpos se pueden vender también como reactivos para investigación de laboratorio para detectar las células que llevan alfa-sinucleína y sus respuestas a diferentes estímulos. En tales usos, los anticuerpos monoclonales se pueden marcar con moléculas fluorescentes, moléculas marcadas con espín, enzimas o radioisotopos, y se pueden proporcionar en la forma de un kit con todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo de alfa-sinucleína. Los anticuerpos se pueden utilizar también para purificar la alfa-sinucleína, p.ej., por cromatografía de afinidad.

El anticuerpo se puede utilizar para detectar los cuerpos de Lewy en un paciente. Tales métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson, u otra enfermedad asociada con la presencia de cuerpos de Lewy en el cerebro, o la sensibilidad para ellas. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar en un paciente que presente síntomas de demencia. Si el paciente tiene cuerpos de Lewy, entonces probablemente el paciente está sufriendo una enfermedad con cuerpos de Lewy, tal como la enfermedad de Parkinson. Los métodos se pueden utilizar también en pacientes asintomáticos. La presencia de cuerpos de Lewy u otros depósitos anormales de alfa-sinucleína indica sensibilidad para la futura enfermedad sintomática. Los métodos son útiles también para monitorizar la evolución de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes que han sido previamente diagnosticados de una enfermedad con cuerpos de Lewy.

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

Para diagnóstico (p.ej., imagen *in vivo*), los anticuerpos se pueden administrar por inyección intravenosa al cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro por inyección intracraneal o realizando una perforación a través del cráneo. La dosis de reactivo debería estar dentro de los mismos intervalos que para los métodos de tratamiento. Típicamente, el anticuerpo está marcado, aunque en algunos métodos, el anticuerpo está sin marcar y se utiliza un agente marcador secundario para unirse al anticuerpo. La elección de la marca depende de los medios de detección. Por ejemplo, para detección óptica es adecuada una marca fluorescente. El uso de marcas paramagnéticas es adecuado para detección tomográfica sin intervención quirúrgica. También se pueden detectar marcas radiactivas utilizando PET o SPECT.

El diagnóstico se realiza comparando el número, tamaño y/o intensidad de los *loci* marcados con los correspondientes valores de la línea base. Los valores de la línea base pueden representar los niveles medios de una población de individuos no enfermos. Los valores de la línea base pueden representar también los niveles determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de la línea base se pueden determinar en un paciente antes de empezar el tratamiento, y los valores medidos se comparan después con los valores de la línea base. Una reducción en los valores con respecto a la línea base señala una respuesta positiva al tratamiento.

Los anticuerpos se pueden usar para generar anticuerpos antiidiotipos. (véase, p.ej., Greenspan & Bona, FASEB J. 7(5) :437-444, 1989; y Nissinoff, J. Immunol. 147:2429-2438, 1991). Tales anticuerpos antiidiotipos se pueden utilizar en estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos, de biodistribución, así como en estudios de respuestas clínicas de anticuerpos humanos-anti-humanos (HAHA) en individuos tratados con los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos antiidiotipos se unen específicamente a la región variable de los anticuerpos 9E4 humanizados y por lo tanto se pueden utilizar para detectar anticuerpos 9E4 humanizados en estudios farmacocinéticos y ayudar a cuantificar las respuestas de anticuerpo humano-anti-humano (HAHA) en los individuos tratados.

Si diferentes versiones de una secuencia se asocian con un número de acceso a diferentes tiempos, es importante la versión asociada con el número de acceso en la fecha efectiva de presentación de esta solicitud. La fecha efectiva de presentación significa la más temprana entre la fecha de presentación real o la fecha de presentación de una solicitud de prioridad que se refiere al número de acceso si es aplicable. Asimismo, si se publican diferentes versiones de una publicación, website o similares a diferentes tiempos, la versión publicada más recientemente a la fecha efectiva de presentación de esta solicitud es importante a menos que se indique otra cosa. Cualquier característica, etapa, elemento, realización, o aspecto de la invención se puede usar en combinación con cualquier otra a menos que se indique específicamente otra cosa.

Ejemplos

Ejemplo I. Diseño de anticuerpos 9E4 humanizados

El punto de partida o anticuerpo donador para humanización es el anticuerpo 9E4 de ratón producido por el hibridoma que tiene el número de acceso de la ATCC PTA-8221 y está descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 11/710,248 (número de publicación US2009/0208487). La variable kappa (Vk) de 9E4 pertenece al subgrupo 1 de Kabat de ratón que corresponde al subgrupo 1 de Kabat humano. La variable pesada (Vh) de 9E4 pertenece al subgrupo 3º de Kabat de ratón que corresponde al subgrupo 3 de Kabat humano (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 1991). A lo largo de este ejemplo se utiliza la numeración de Kabat.

La CDR-L1 del residuo 17 pertenece a la clase canónica 3, la CDR-L2 del residuo 7 pertenece a la clase 1, y la CDR-L3 del residuo 9 pertenece a la clase 1 en Vk (Martin & Thornton, J Mol Biol. 263:800-15, 1996). La CDR-H1 del residuo 5 pertenece a la clase 1, y la CDR-H2 del residuo 17 pertenece a la clase 2 (Martin & Thornton, J Mol Biol. 263:800-15, 1996). La CDR-H3 no tiene clases canónicas, pero el bucle del residuo 7 probablemente tiene una base retorcida según las reglas de Shirai et al. (FEBS Lett. 455:188-97, 1999).

Se hizo una investigación sobre las secuencias de proteínas en la base de datos PDB (Deshpande et al., Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005) para encontrar estructuras que pudieran proporcionar un modelo estructural aproximado de 9E4. Se escogió la estructura cristalina del anticuerpo dimérico X836 (código pdb 3MBX) (Teplyakov et al, Mol Immunol., 47(14):2422-6, 2010) para la estructura Vk porque tenía una buena resolución (1,6Å) y similitud global de secuencia con Vk de 9E4, manteniendo las mismas estructuras canónicas para los bucles. Se utilizó 1H3P (Pizarro et al., FEBS Lett. 509:463-8, 2001) para la estructura Vh. Tenía una buena similitud global de secuencia y una resolución razonable (2.6Å), pero también tenía la misma longitud de CDR-H3 con una base retorcida. En adición, las CDR H1 y H2 tenían las mismas estructuras canónicas que Vh de 9E4. Se utilizó el modelador de estructuras DeepView/Swiss-PdvViewer 3.7 (SP5) (Guex and Peitsch, Electrophoresis 18: 2714-2723, 1997).

Una investigación de la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes de NCBI permitió la selección de marcos humanos adecuados en los que injertar las CDR murinas. Para Vk, se escogió una cadena ligera kappa humana con código de acceso de NCBI AAY33350 (GI:63102889) (Kramer et al., Eur J Immunol. 35:2131-45, 2005). Tiene las mismas clases canónicas para las CDR L2 y L3 que 9E4, y pertenece a la línea germinal humana IGKV1D-39 o IGKV1-39 (nombre de clon O2 o 012) según la convención de IMGT. Es un miembro del subgrupo 1 kappa humano de Kabat. Para Vh, se escogió la cadena pesada de Ig humana con código de acceso de NCBI AAC50998 (GI: 1791009) (Glas et al., Clin Exp Immunol. 107:372-80, 1997), de nuevo con las mismas bases canónicas que 9E4 y que pertenece a la línea germinal humana IGHV3-7'01 o IGHV3-7'02 (nombre de clones V3-7 o VH3-11). Es un miembro del subgrupo 3 pesado humano de Kabat.

Se identificaron las siguientes posiciones que difieren entre los marcos de la región variable del aceptor humano y del donador de ratón como candidatos para retromutación. H73 está en el borde del sitio de unión del antígeno e interactúa con CDR-H2. H93 es un residuo interfaz que cae por debajo de los bucles CDR-H1 y H3. L36 es un residuo interfaz Vk/Vh. L83 está en estrecha proximidad con el dominio constante. En 9E4, L83 es una leucina, mientras que, en el marco humano, L83 es un aminoácido más grande fenilalanina.

Se preparan tres cadenas pesadas humanizadas y tres cadenas ligeras humanizadas incorporando retromutaciones en diferentes permutaciones de estas posiciones (Figuras 1A, B, alineación de secuencia, y Tablas 2-3).

Tabla 2 Retromutaciones de V_H

Variante de V _H	Secuencia aceptora de exón V _H	residuos del marco donador
Hu9E4VHv1	Código de acceso del NCBI, AAC50998	H73, H93
Hu9E4VHv2	Código de acceso del NCBI, AAC50998	H93
Hu9E4VHv3	Código de acceso del NCBI, AAC50998	H73

Tabla 3 Retromutaciones de V_L

Variante V _L	Secuencia aceptora del exón V _L	residuos del marco donador
Hu9E4VLv1	Código de acceso del NCBI, AAY33350	L36
Hu9E4VLv2	Código de acceso del NCBI, AAY33350	Ninguno
Hu9E4VLv3	Código de acceso del NCBI, AAY33350	L36, L83

>9E4Vk Versión 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSIQTLTYSSNQKNYLAWFQQKPGKAPKLL
IYWASIRKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSYPLTFGGG
TKLEIK (SEQ ID NO: 3)

>9E4Vk Versión 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSIQTLTYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLL
IYWASIRKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSYPLTFGGG
TKLEIK (SEQ ID NO: 4)

>9E4Vk Versión 3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSIQTLTYSSNQKNYLAWFQQKPGKAPKLL
IYWASIRKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDLATYYCQQYYSYPLTFGGG
TKLEIK (SEQ ID NO: 5)

>9E4vh Versión 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASIS
 SGGGSTYYPDNVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGAGID
 YWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 8)

>9E4vh Versión 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASIS
 SGGGSTYYPDNVKGRFTISRDN~~A~~AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC~~S~~RRGGAGID
 YWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 9)

>9E4vh Versión 3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASIS
 SGGGSTYYPDNVKGRFTISR~~D~~AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGAGI
 DYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 10)

La numeración de Kabat para la cadena ligera AAY33350 y para la cadena pesada AAC50998 se lista a continuación:

Numeración de Kabat para cadena ligera AAY33350:

L1 D	L2 I	L3 Q	L4 M	L5 T	L6 Q	L7 S	L8 P	L9 S
L10 S	L11 L	L12 S	L13 A	L14 S	L15 V	L16 G	L17 D	L18 R
L19 V	L20 T	L21 I	L22 T	L23 C	L24 R	L25 A	L26 S	L27 Q
L28 S	L29 I	L30 S	L31 S	L32 Y	L33 L	L34 N	L35 W	L36 Y
L37 Q	L38 Q	L39 K	L40 P	L41 G	L42 K	L43 A	L44 P	L45 K
L46 L	L47 L	L48 I	L49 Y	L50 A	L51 A	L52 S	L53 S	L54 L
L55 Q	L56 S	L57 G	L58 V	L59 P	L60 S	L61 R	L62 F	L63 S
L64 G	L65 S	L66 G	L67 S	L68 G	L69 T	L70 D	L71 F	L72 T
L73 L	L74 T	L75 I	L76 S	L77 S	L78 L	L79 Q	L80 P	L81 E
L82 D	L83 F	L84 A	L85 T	L86 Y	L87 Y	L88 C	L89 Q	L90 Q
L91 S	L92 Y	L93 S	L94 T	L95 P	L96 L	L97 T	L98 F	L99 G
L100 G	L101	G L102 T	L103 K	L104 L	L105 E	L106 I	L107 K	L108 -
L109 -	L110 -	L111 -						

Numeración de Kabat para cadena pesada AAC50998:

H1 E	H2 V	H3 Q	H4 L	H5 V	H6 E	H7 S	H8 G	H9 G
H10 G	H11 L	H12 V	H13 Q	H14 P	H15 G	H16 G	H17 S	H18 L
H19 R	H20 L	H21 S	H22 C	H23 A	H24 A	H25 S	H26 G	H27 F
H28 T	H29 F	H30 S	H31 S	H32 Y	H33 W	H34 M	H35 S	H36 W
H37 V	H38 R	H39 Q	H40 A	H41 P	H42 G	H43 K	H44 G	H45 L
H46 E	H47 W	H48 V	H49 A	H50 N	H51 I	H52 K	H52A Q	H53 D
H54 G	H55 S	H56 E	H57 K	H58 Y	H59 Y	H60 V	H61 D	H62 S
H63 V	H64 K	H65 G	H66 R	H67 F	H68 T	H69 I	H70 S	H71 R
H72 D	H73 N	H74 A	H75 K	H76 N	H77 S	H78 L	H79 Y	H80 L
H81 Q	H82 M	H82A N	H82B S	H82C L	H83 R	H84 A	H85 E	H86 D
H87 T	H88 A	H89 V	H90 Y	H91 Y	H92 C	H93 A	H94 R	H95 G
H96 S	H97 S	H98 D	H99 M	H100-	H101 D	H102 Y	H103 W	H104 G
H105 Q	H106	GH107 T	H108 L	H109 V	H110 T	H111 V	H112 S	H113 S
H114 -								

El número de Kabat de otras regiones variables de cadena pesada y ligera se puede determinar por alineamiento con los correspondientes residuos que tienen asignado el mismo número o utilizando software comercialmente disponible.

Tabla 4. Numeración de Kabat de residuos marco preferidos para retromutación en anticuerpos 9E4 humanizados

	AAY3335 0 cadena ligera	AAC50998 cadena pesada	9E4 de ratón	v1 de 9E4 humanizado	v2 de 9E4 humanizado	v3 de 9E4 humanizado	v4 (cadena pesada) de 9E4 humanizado
L36	Y	-	F	F	Y	F	-
L83	F	-	L	F	F	L	-
H73		N	D	D	N	D	N
H93		A	S	S	S	A	A

Ejemplo II. Inmunización pasiva con anticuerpos de α -sinucleína

El objetivo de este experimento es determinar la eficacia de anticuerpos de α -sinucleína en estudios *in vitro* e *in vivo*, así como ensayos de comportamiento. Se utilizó α -sinucleína transgénica (Línea 61), ratones hembra privados de α -sinucleína y ratones hembra naturales, de 3-4 meses de edad al inicio y n=14/grupo. Los anticuerpos ensayados incluyeron 9E4 (IgG1, epítipo: aminoácidos 118-126 de alfa sinucleína), 5C1 (IgG1, epítipo: aminoácidos 118-126 de alfa sinucleína, conector c), 5D12, IgG2 (SN118-126), 1H7, IgG1 (SN 91-99) y un anticuerpo IgG1 de control 27-1. Los ratones recibieron una dosis de 10 mg/kg durante un período de 5 meses, para un total de 21 inyecciones. En adición, se inyectaron los animales con lentivirus (LV) que expresa la α -sinucleína humana (peso) mediante introducción unilateral de α -sinucleína (peso) humana en el hipocampo.

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

Criterios de valoración: Se midieron los títulos de anticuerpo durante la fase de vida. Los ensayos de comportamiento incluyen la prueba del laberinto acuático de Morris (MWW) y la prueba de la barra horizontal. La prueba de la barra redonda es una prueba de equilibrio motor, coordinación y forma de andar conducida utilizando dos barras de diámetro variable. La barra A es la de mayor diámetro (más fácil, considerada la barra de entrenamiento) y la barra D es la de diámetro más pequeño (más difícil, considerada la barra de prueba). Los datos se presentan como "errores" (número de resbalones/10 cm) y "velocidad" (tiempo necesario para recorrer 10 cm/s). El ejercicio del laberinto acuático se llevó a cabo en las semanas 10 y terminación. Se tomaron las siguientes medidas de neuropatología: agregación de alfa sinucleína, sinaptofisina, y MAP2. Se tomaron las siguientes medidas de bioquímica: alfa sinucleína, PSD95, sinaptofisina. Se realizaron multimarcado seleccionado y marcado confocal utilizando marcadores sinápticos, neuronales y gliales.

Los resultados demostraron que todos los anticuerpos, excepto 5D12, producían una reducción importante en la acumulación de α -syn y la preservación de las densidades sinápticas y dendríticas, así como resultados positivos en el ejercicio del laberinto acuático de Morris. El anticuerpo 9E4 es eficaz en los estudios *in vitro* e *in vivo*, así como en los ensayos de comportamiento. Los resultados indican que el anticuerpo puede reducir los agregados de alfa sinucleína neuríticos/axonales.

Resultados de comportamiento: El anticuerpo 9E4 mejoró el ejercicio del laberinto acuático en los ratones transgénicos con α -sinucleína (Figuras 3-4). En contraste, el anticuerpo 5D12 no mejoró el ejercicio del laberinto acuático en los ratones transgénicos con α -sinucleína (Figura 4). Los anticuerpos 9E4 y 1H7 mejoraron la ejecución de la prueba de la barra medida tanto por la velocidad como por los errores, mientras que los anticuerpos 5D12 y 5C1 no la mejoraron (Figura 4).

Resultados de neuropatología: Los anticuerpos 9E4, 1H7 y 5C1 redujeron la distrofia neurítica positiva a ELADW-105, mientras que el anticuerpo 5D12 no la redujo. En los ratones transgénicos con alfa sinucleína, el anticuerpo 9E4 redujo la zona de neuropilo en un 43 % en la neocorteza y en un 40 % en los ganglios basales en comparación con el control. El anticuerpo 9E4 también preservó la sinaptofisina y MAP2 en la neocorteza y en los ganglios basales.

Ejemplo III. Inmunoprecipitación

Se realizó la inmunoprecipitación para analizar la eficacia de la unión de varias versiones de anticuerpos 9E4 humanizados frente a su antígeno tomado de tejido enfermo (Figura 5). Se inmunoprecipitaron 150 μ g de lisados de cerebro solubles en Tris procedentes de cerebros con demencia con cuerpos de Lewy, con 5 μ g de cada anticuerpo indicado utilizando perlas magnéticas de proteína G (New England Biolabs). Se lavaron las muestras 5 veces con PBS/NaCl 350 mM/NP-40 al 0,5 %, se hirvieron, y las muestras resultantes se resolvieron por SDS-PAGE. Después de transferencia, se incubaron las membranas con Ab5038 (Millipore), un anticuerpo policlonal que detecta la sinucleína total. Se repitió el experimento tres veces para confirmar la exactitud.

Ejemplo IV. Transferencia de Western

La transferencia de Western de sinucleína humana recombinante con anticuerpos 9E4 de ratón, quiméricos y humanizados se muestra en la Figura 6. Las curvas de dilución del anticuerpo eran aparentemente similares para los anticuerpos 9E4 de ratón, quiméricos y humanizados. Todos los anticuerpos detectaron una banda a 28 kDa y una segunda banda a 49 kDa. La banda a 49 kDa es probablemente un multímero de sinucleína.

Las cantidades indicadas de sinucleína de referencia humana expresada en bacterias, recombinante, se resolvieron por SDS-PAGE, y se transfirieron con cantidades idénticas de la forma indicada de 9E4. Después de lavado, se aplicaron los anticuerpos policlonales de cabra apropiados a cada especie conjugados con el fluoróforo IRDye-800, y se lavó la transferencia. Los tiempos de exposición fueron idénticos para los diferentes anticuerpos.

Depósito

El siguiente hibridoma ha sido depositado según las provisiones del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) en la fecha indicada. Este depósito será mantenido en un depositario autorizado y será reemplazado en el caso de mutación, no viabilidad o destrucción durante un período de al menos cinco años después de la solicitud más reciente de liberación de una muestra recibida por el depositario, durante un período de al menos treinta años después de la fecha de depósito, o durante la vida ejecutable de la patente relacionada, cualquiera de los períodos que sea más largo. Todas las restricciones sobre la disponibilidad al público de estas líneas de células serán irrevocablemente eliminadas después de la concesión de una patente a partir de la solicitud.

Anticuerpo monoclonal	Línea celular	Epítipo/Especificidad	Isotipo	Fecha de depósito	Acceso No.
9E4	JH17.9E4.3.37.1.14.2	residuos 118-126 de alfa-sinucleína	IgG1 κ	Feb. 26, 2007	PTA-8221

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Saldanha, Jose
Nijjar, Tarlochan

5 <120> Anticuerpos humanizados que reconocen la alfa-sinucleína

<130> 057450/424859

10 <150> 61/553,131
<151> 2011-10-28

<160> 32

15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

25 <400> 1

```

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

```

40

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

50 <400> 2

```

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

```

65

<210> 3
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 3

```

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 Phe 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

```

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 4

```

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 Tyr 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 Phe 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

```

<210> 5
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 5

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
 5 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
 10 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
 15
 <210> 6
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Sintetizado
 25
 <400> 6
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 30 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Ser Asp Lys Arg 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 Glu Asp Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 40 115
 <210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sintetizado
 50
 <400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 55 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 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 Ser Ser Asp Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 65 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 8

```

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
          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 Asp 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
Ser Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100          105          110
Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 9
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 9

```

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
          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
Ser Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100          105          110
Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 10
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 10

[illegible]

<210> 11
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado

25 <400> 11

[illegible]

<210> 12
<211> 140
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado

30 <400> 12

55

60

65

ES 2 937 409 T3

	Met	Asp	Val	Phe	Met	Lys	Gly	Leu	Ser	Lys	Ala	Lys	Glu	Gly	Val	Val
	1				5					10					15	
5	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				
10	Asn	Val	Gly	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Ala	Val	Ala	Gln	Lys
	65					70					75				80	
	Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Phe	Val	Lys
					85					90				95		
	Lys	Asp	Gln	Leu	Gly	Lys	Asn	Glu	Glu	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Gly	Ile
				100				105					110			
15	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				
20	<210> 13															
	<211> 107															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
25	<220>															
	<223> Sintetizado															
	<400> 13															
30	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
	1				5					10					15	
	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
				20					25					30		
	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
			35					40				45				
35	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
		50					55					60				
	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
	65					70					75				80	
	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
40					85					90				95		
	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
				100				105								
45	<210> 14															
	<211> 330															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
50	<223> Sintetizado															
	<400> 14															
55	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	1				5					10					15	
60																
65																

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 5 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 10 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 15 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Val Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 20 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 25 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 30 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 35 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 15

40 <211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Sintetizado

<400> 15

50 gacatccaga tgaccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60
 atcacctgca agtccatcca gaccctgctg tactcctcca accagaagaa ctacctggcc 120
 tggttccagc agaagcccg caaggccccc aagctgctga tctactgggc ctccatccgc 180
 aagtcggcg tgcctcccg cttctccggc tccggctccg gcaccgactt caccctgacc 240
 atctcctccc tgcagccga ggacttcgcc acctactact gccagcagta ctactcctac 300
 cccctgacct tcggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339

<210> 16

<211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Sintetizado

<400> 16

65

ES 2 937 409 T3

5	gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60 atcacctgca agtccatcca gaccctgctg tactcctcca accagaagaa ctacctggcc 120 tggtaccagc agaagcccg caaggccccc aagctgctga tctactgggc ctccatccgc 180 aagtccggcg tgcctcccg cttctccggc tccggctccg gcaccgactt caccctgacc 240 atctcctccc tgcagcccg ggacttcgcc acctactact gccagcagta ctactcctac 300 ccctgacct tcggcggcg caccaagctg gagatcaag 339
10	<210> 17 <211> 339 <212> ADN <213> Secuencia artificial
15	<220> <223> Sintetizado
20	<400> 17 gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60 atcacctgca agtccatcca gaccctgctg tactcctcca accagaagaa ctacctggcc 120 tggttccagc agaagcccg caaggccccc aagctgctga tctactgggc ctccatccgc 180 aagtccggcg tgcctcccg cttctccggc tccggctccg gcaccgactt caccctgacc 240 atctcctccc tgcagcccg ggacctggcc acctactact gccagcagta ctactcctac 300 ccctgacct tcggcggcg caccaagctg gagatcaag 339
25	<210> 18 <211> 348 <212> ADN <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Sintetizado
35	<400> 18 gaggtgcagc tggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60 tctgcgcgcg cctccggctt cacccttctcc aactacggca tgtcctgggt gcgccaggcc 120 ccgggcaagg gcctggagtg ggtggcctcc atctcctccg gcggcggctc caccctactac 180 ccgcacaacg tgaaggggcg cttcaccatc tcccgcgacg acgccaagaa ctccctgtac 240 ctgcagatga actccctgcg cgcgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcggcggc 300 gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctcc 348
40	<210> 19 <211> 348 <212> ADN <213> Secuencia artificial
45	<220> <223> Sintetizado
50	<400> 19 gaggtgcagc tggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60 tctgcgcgcg cctccggctt cacccttctcc aactacggca tgtcctgggt gcgccaggcc 120 ccgggcaagg gcctggagtg ggtggcctcc atctcctccg gcggcggctc caccctactac 180 ccgcacaacg tgaaggggcg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240 ctgcagatga actccctgcg cgcgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcggcggc 300 gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctcc 348
55	<210> 20 <211> 348 <212> ADN <213> Secuencia artificial
60	<220> <223> Sintetizado
65	

<400> 20

5 gaggtgcagc tggtaggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcgggctc cctgcgcctg 60
 tcctgcgcgc cctccggctt cacccttctcc aactacggca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtggcctcc atctcctccg gcggcgggctc caccctactac 180
 cccgacaacg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgacg acgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg cggcgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcggcggc 300
 gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctcc 348

<210> 21

<211> 348

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 21

20 gaggtgcagc tggtaggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcgggctc cctgcgcctg 60
 tcctgcgcgc cctccggctt cacccttctcc aactacggca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtggcctcc atctcctccg gcggcgggctc caccctactac 180
 cccgacaacg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgcg cggcgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgcggcggc 300
 gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctcc 348

<210> 22

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 22

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp
 1 5 10 15
 Val Ser Gly Ser Ser Gly
 20

<210> 23

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 23

atggacatgc gcgtgccgc ccagctgctg ggctgtctga tgcgtgggt gtccggctcc 60
 tccggc 66

<210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 24

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys

5 <210> 25
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 25

15 atggagttcg gctgtctctg gctgttctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgc 57

<210> 26
 <211> 113
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 42
 <223> Xaa = Y o F

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 89
 <223> Xaa = F o L

35 <400> 26

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 Xaa 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 Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

50 Lys

<210> 27
 <211> 116
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 74
 <223> Xaa = N o D

65 <220>

<221> VARIANTE

<222> 97

<223> Xaa = A o S

5

<400> 27

10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115

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
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 Xaa 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
Xaa Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

30

<400> 28

35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105

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

<210> 29

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

50

<400> 29

60

65

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
 5 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 Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 10 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
 15 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
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 20 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
 25 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

 <210> 30
 <211> 219
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintetizado

 35 <400> 30

 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
 40 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
 45 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
 50 Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 55 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 60 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

 65 <210> 31

<211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 31

10	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
				20					25					30		
	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
15			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	Asp	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
	65					70					75					80
20	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			
25	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	
30	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
35		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	
40	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	Val	Lys	Thr
			275					280					285			
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
		290					295					300				
45	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
					325					330					335	
	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
				340					345					350		
50	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				
55	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		
60	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
			435					440					445			

65

<210> 32
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 32

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
			20				25					30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35				40					45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55				60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70					75				80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115				120						125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155				160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165					170						175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
		180					185					190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195				200						205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225				230						235				240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		260						265				270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275				280						285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305				310						315				320	
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325					330						

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que comprende una cadena pesada humanizada que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera humanizada que comprende una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO:5,
 en donde el anticuerpo se une a la alfa-sinucleína con una afinidad igual o mayor que la del anticuerpo producido por el hibridoma depositado como ATCC PTA-8221, y
 10 en donde la región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada humana y la región variable de cadena ligera madura se fusiona con una región constante de cadena ligera humana.
- 15 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde:
 la región constante de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 14 siempre que el residuo de lisina C-terminal se pueda omitir; y
 la región constante de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO:13.
- 20 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde:
 la región constante de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO:14 siempre que el residuo de lisina C-terminal se pueda omitir; y
 25 la región constante de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO:28.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la región constante de cadena pesada es de isotipo IgG1 humano.
5. Un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada como se define en cualquier reivindicación anterior.
- 30 6. El ácido nucleico o ácidos nucleicos de la reivindicación 5 que tienen una secuencia que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 17, 18 y 20.
- 35 7. Una célula huésped que comprende un vector o vectores que comprenden el ácido nucleico o ácidos nucleicos de la reivindicación 5 o 6.
8. Un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método para tratar a un paciente que tiene o está en riesgo de una sinucleinopatía.
- 40 9. Un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método para detectar cuerpos de Lewy en un paciente que tiene o está en riesgo de una enfermedad con cuerpos de Lewy, el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del anticuerpo y detectar el anticuerpo unido en el paciente.

Fig. 1
Alineamiento de VH de 9E4

Numeración de Kabat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
m9E4VH		E	V	K	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	A	S	L	K	L
1791009		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
Hu9E4VHv1		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
Hu9E4VHv2		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
Hu9E4VHv3		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
Hu9E4VHv4		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
Numeración de Kabat		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
m9E4VH		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T
1791009		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	W	M	S	W	V	R	Q	A
Hu9E4VHv1		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A
Hu9E4VHv2		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A
Hu9E4VHv3		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A
Hu9E4VHv4		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A
Numeración de Kabat		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59
m9E4VH		S	D	K	R	L	E	W	V	A	S	I	S	S	G	G	G	S	T	Y	Y
1791009		P	G	K	G	L	E	W	V	A	N	I	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y
Hu9E4VHv1		P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	S	S	G	G	G	S	T	Y	Y
Hu9E4VHv2		P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	S	S	G	G	G	S	T	Y	Y
Hu9E4VHv3		P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	S	S	G	G	G	S	T	Y	Y
Hu9E4VHv4		P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	S	S	G	G	G	S	T	Y	Y

Fig. 1 (cont.)

Alineamiento de VH de 9E4

Numeración

de Kabat

m9E4VH	50	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
1791009	P	D	N	V	K	G	R	F	T	I	S	R	E	D	A	K	N	T	L	Y
Hu9E4VHv1	V	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y
Hu9E4VHv2	P	D	N	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	A	K	N	S	L	Y
Hu9E4VHv3	P	D	N	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y
Hu9E4VHv4	P	D	N	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	A	K	N	S	L	Y

Numeración

de Kabat

m1H7VH	30	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
1791009	L	Q	M	S	S	L	R	S	E	D	T	A	L	Y	Y	C	S	R	G	G
Hu9E4VHv1	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	S
Hu9E4VHv2	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	G	G
Hu9E4VHv3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	G	G
Hu9E4VHv4	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	G

Numeración

de Kabat

m9E4VH	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
1791009	A	G	I	-	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	-
Hu9E4VHv1	S	D	M	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-
Hu9E4VHv2	A	G	I	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-
Hu9E4VHv3	A	G	I	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-
Hu9E4VHv4	A	G	I	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-

Fig. 2**Alineamiento de VL de 9E4****Numeración
de Kabat**

m9E4VL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
63102889	D	I	V	M	S	Q	S	P	S	S	L	A	V	S	V	G	E	K	V	T
Hu9E4VLv1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
Hu9E4VLv2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
Hu9E4VLv3	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T

**Numeración
de Kabat**

m9E4VL	21	22	23	24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	27E	27F	28	29	30	31	32	33	34
63102889	I	T	C	K	S	I	Q	T	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
Hu9E4VLv1	I	T	C	K	S	I	Q	T	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
Hu9E4VLv2	I	T	C	K	S	I	Q	T	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
Hu9E4VLv3	I	T	C	K	S	I	Q	T	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A

**Numeración
de Kabat**

m9E4VL	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
63102889	W	F	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R
Hu9E4VLv1	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L
Hu9E4VLv2	W	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R
Hu9E4VLv3	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R
	W	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R

Fig. 2 (cont.)

Alineamiento de VL de 9E4

Numeración

de Kabat

55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
<u>K</u>	<u>S</u>	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
<u>Q</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
<u>K</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
<u>K</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
<u>K</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
<u>K</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T

Numeración

de Kabat

75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
I	S	S	V	K	A	E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y
I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	S	T
I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y
I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y
I	S	S	L	Q	P	E	D	L	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y

Numeración

de Kabat

95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K
<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K

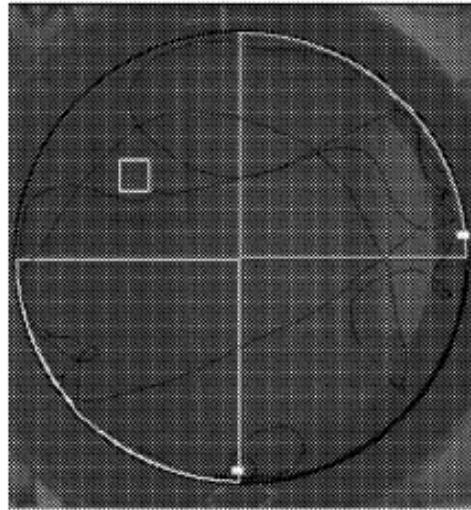
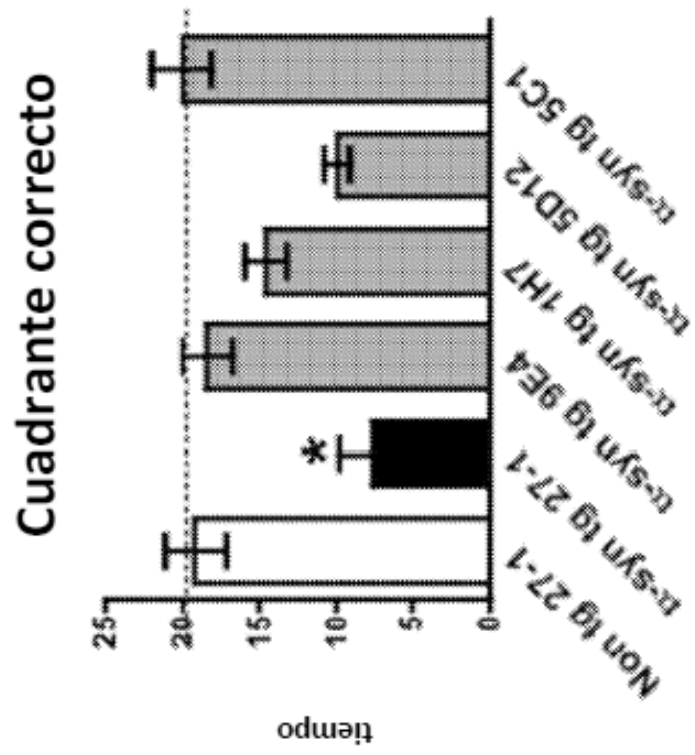


Fig. 3

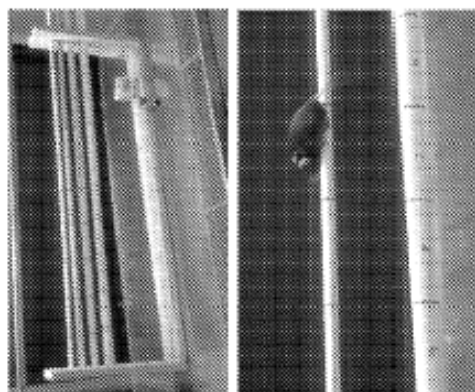
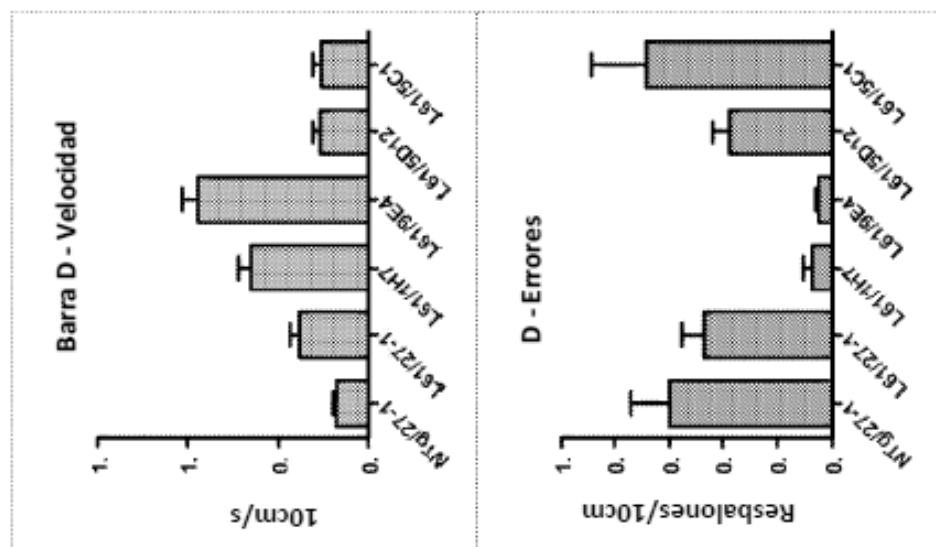


Fig. 4

Fig. 5

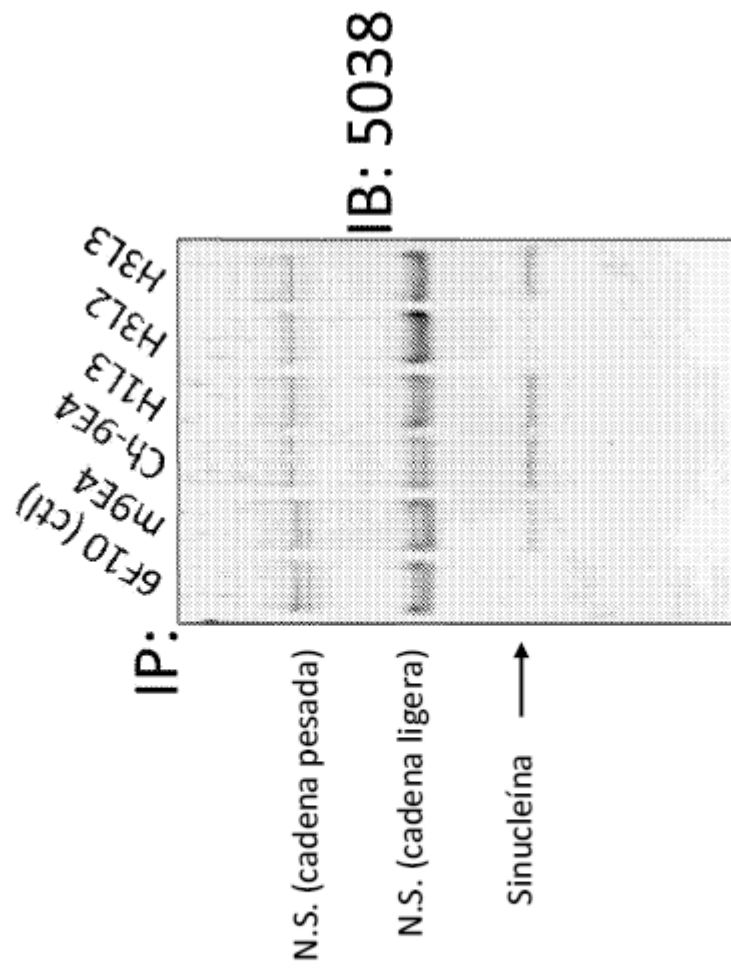


Fig. 6

