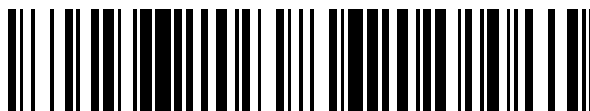


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 662**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2010 E 10747562 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2467153**

54 Título: **Utilización de mimotopos de epítomos de alfa-sinucleína para el tratamiento de enfermedades de cuerpos de Lewy**

30 Prioridad:

**21.08.2009 AT 13242009**

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

**09.06.2016**

73 Titular/es:

**AFFIRIS AG (100.0%)  
Karl-Farkas-Gasse 22  
1030 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**MANDLER, MARKUS;  
WENINGER, HARALD;  
SANTIC, RADMILA y  
LAHSNIG, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**Observaciones :**

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

ES 2 573 662 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

Utilización de mimotopos de epítomos de alfa-sinucleína para el tratamiento de enfermedades de cuerpos de Lewy.

- 5 La presente invención se refiere a un medicamento destinado a la utilización para prevenir y/o tratar las sinucleinopatías.

Las sinucleinopatías son un grupo diverso de trastornos neurodegenerativos que comparten una característica patológica común: en el examen neuropatológico pueden detectarse lesiones características que contienen  
10 agregados anormales de proteína alfa-sinucleína (alfa-syn, a-syn) en poblaciones seleccionadas de neuronas y células gliales.

La alfa-syn (inicialmente identificada como PARK1 y PARK4) es una proteína de 140 aminoácidos ampliamente expresada en el neocórtex, el hipocampo, el giro dentado, el bulbo olfativo, el cuerpo estriado, el tálamo y el  
15 cerebelo. Alfa-syn también se expresa a nivel elevado en las células hematopoyéticas, incluyendo los linfocitos B, T y NK, así como en monocitos y plaquetas. Se desconoce cuál es la función exacta de estas células, pero se han implicado en la diferenciación de los megacariocitos (precursores de plaquetas).

Entre las sinucleinopatías más comunes se incluyen de manera no limitativa los trastornos de cuerpos de Lewy (TCL), tales como la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Parkinson con demencia (EPD) y la demencia con cuerpos de Lewy (DCL), así como la atrofia multisistémica (AMS) o la neurodegeneración con  
20 acumulación cerebral de hierro de tipo I (NACH tipo I). Entre las opciones de tratamiento actuales para estas enfermedades se incluyen medicaciones sintomáticas, tales como la L-dopa, fármacos anticolinérgicos, así como inhibidores de la monoamina oxidasa. Sin embargo, todas las oportunidades de tratamiento existentes actualmente  
25 sólo conducen a un alivio sintomático pero no inducen un efecto modificador de enfermedad de larga duración en el paciente.

Los trastornos de cuerpos de Lewy (TCL) son trastornos neurodegenerativos progresivos que se caracterizan por temblores, rigidez, bradiquinesia y por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el cerebro. En el caso de los TCL  
30 y la EPD entre los signos se incluyen además las alteraciones cognitivas. Hasta el 2% de la población de más de 60 años de edad en los países occidentales desarrollan los signos típicos de EP/TCL. Actualmente sólo se dispone de tratamiento sintomático. Desafortunadamente, estas terapias sólo proporcionan un alivio temporal de los síntomas tempranos y no detienen la progresión de la enfermedad. La patogénesis de la EP/TCL todavía no se entiende por completo pero aparentemente participan en el desarrollo de la enfermedad la susceptibilidad genética y factores  
35 ambientales. A pesar de todos los avances genéticos, la EP/TCL es principalmente un trastorno esporádico sin causa conocida (también denominado EP/TCL idiopático).

Los pacientes que sufren de dicha enfermedad desarrollan inclusiones intracelulares ubiquitinadas características denominadas cuerpos de Lewy (CL) en las áreas corticales y subcorticales del cerebro. Especialmente las regiones  
40 con un contenido elevado de neuronas dopaminérgicas o proyecciones neuronales muestran esta típica características patológica. Recientemente, varios estudios han podido demostrado que la proteína sináptica alfa-syn desempeña un papel central en la patogénesis de los TCL. En los TCL, alfa-syn se acumula en los CL en todas las áreas cerebrales afectadas. Además, ha podido demostrarse que las mutaciones puntuales, así como las duplicaciones o multiplicaciones en el gen alfa-syn se asocian a formas familiares raras de parkinsonismo. Resulta  
45 importante que, basándose en los resultados de estudios de sobreexpresión en ratones transgénicos (tg), así como en *Drosophila melanogaster*, se pone de manifiesto su papel clave en la patogénesis de la EP/TCL, ya que estos modelos animales imitan varias características de la EP.

Otra sinucleinopatía muy importante es la atrofia multisistémica (AMS). La AMS es un trastorno neurodegenerativo  
50 esporádico que se caracteriza por síntomas de parkinsonismo resistente a la L-DOPA, ataxia cerebelar y disautonomía. Los pacientes sufren de pérdida neuronal multisistema que afecta a diversas áreas cerebrales, incluyendo el cuerpo estriado, la sustancia negra, el cerebelo, el puente troncoencefálico, así como las olivas inferiores y la médula espinal. La AMS se caracteriza por inclusiones citoplasmáticas gliales (ICG) alfa-syn-positivas y neuronales raras en todo el sistema nervioso central. Estas inclusiones se asocian a degeneración estriatonigral, atrofia olivopontocerebelar y afectación de los núcleos autonómicos en la médula y la médula espinal. La importancia de las ICG para la patogénesis de la AMS se reconoce generalmente y ha sido puesta de manifiesto por  
55 análisis recientes de modelos de ratón transgénico que analizan el efecto de la sobreexpresión de alfa-syn en la oligodendroglía. En ratones tg que sobreexpresan alfa-syn humana, se han observado tanto agregados similares a ICG como marcadores bioquímicos de AMS.

Aunque los mecanismos exactos por los que la acumulación de alfa-syn conduce a las características típicas de la neurodegeneración en las sinucleinopatías no se entiende por completo, algunos estudios recientes infieren que la formación y acumulación anormales de alfa-syn está implicada en los procesos degenerativos que subyacen a la sinucleinopatía. Recientemente, se han identificado diferentes formas de alfa-syn en los CL. Aparte de la forma de  
60 longitud completa de la proteína, se han identificado diferentes formas de alfa-syn modificada, incluyendo las formas fosforilada, nitrada y mono-, di- o triubiquitinada de alfa-syn. Además, las formas truncadas C-terminalmente de la

proteína, tales como alfa-syn 1-119, alfa-syn 1-122 y alfa-syn 1-123, han sido detectadas en tejido cerebral de tanto ratones transgénicos como en casos de EP. Actualmente se cree que hasta 15% de la alfa-syn detectada en los CL y neuritas de Lewy se encuentra truncada. Los estudios *in vitro* anteriores con alfa-syn truncada han podido demostrar que la alfa-syn que carece de los 20 a 30 aminoácidos C-terminales muestra una tendencia incrementada a agregarse y formar filamentos presentes en las neuritas de Lewy y en los CL. De esta manera, estas versiones truncadas podrían actuar de una manera similar a las formas truncadas y modificadas del amiloide beta (A $\beta$ ) en la enfermedad de Alzheimer (EA). Estas formas truncadas y modificadas de A $\beta$  se cree que actúan como moléculas de inóculo para la deposición de placas y muestran una mayor tendencia a la agregación, así como una neurotoxicidad y sinaptotoxicidad elevadas *in vivo* e *in vitro*.

De esta manera, la alfa-syn de longitud completa, así como las formas truncadas y/o modificadas de alfa-syn, que muestran efectos potenciales de inoculación, se cree que se acumulan, conduciendo a la formación de oligómeros. Basándose en estudios recientes, se cree que dicha formación de oligómeros, por ejemplo en las terminales sinápticas y axones, desempeña un papel importante para el desarrollo de la EP/TCL y podría, de esta manera, resultar potenciada por la presencia de formas truncadas de alfa-syn. Por lo tanto, la reducción del depósito y oligomerización de alfa-syn podría resultar beneficiosa en el tratamiento de las sinucleopatías, especialmente de la TCL/EP y AMS idiopáticas y podría representar la primera estrategia para el tratamiento de estas enfermedades neurodegenerativas, adicional al mero alivio de los síntomas que resultan de las estrategias actuales de tratamiento, tales como la aplicación de L-DOPA.

En Iwatsubo T. (Neuropathology 27(5):474-478, 2007), se examina una correlación entre el depósito de alfa-sinucleína y la fosforilación de la misma con una patogénesis de las alfa-sinucleopatías. El autor de esta publicación encontró que la serina 129 de la alfa-sinucleína depositada en las lesiones sinucleopáticas se encontraba extensivamente fosforilada. El documento US 2007/213243 se refiere a alfa-sinucleína humana mutante, así como a péptidos derivados de la misma que pueden utilizarse para inhibir la agregación de la alfa-sinucleína humana de tipo salvaje. En el documento WO 2004/041067 se dan a conocer medios y métodos para prevenir o tratar las enfermedades asociadas a la agregación de la alfa-sinucleína, que comprenden la utilización de fragmentos de alfa-sinucleína. En el documento US 2003/166558, se describen péptidos que pueden utilizarse para inducir una respuesta inmunitaria contra los depósitos de proteínas. El documento US 2005/198694 se refiere a fragmentos de alfa-sinucleína que comprenden por lo menos 100 aminoácidos y que presentan una delección C-terminal de entre 1 y 23 aminoácidos.

Liang *et al.* (J. Neurochem. 99:470-482, 2006) han estudiado la regulación de la alfa-sinucleína en ratas. Observaron que en ratas que preferían alcohol, la tasa de expresión de la alfa-sinucleína se encontraba incrementada en comparación con las ratas que no preferían alcohol.

En Hamilton B.A. (Genomics 83:739-742, 2004), se examina la distribución de la 53Thr y 53Ala en la alfa-sinucleína en primates.

En el documento WO 2004/041067, se dan a conocer fragmentos inmunógenos de alfa-sinucleína que pueden inducir una respuesta inmunitaria contra un epítipo específico en los residuos 70 a 140 de la alfa-sinucleína.

El documento WO 2006/045037 se refiere a moléculas C-terminales truncadas de alfa-sinucleína que pueden utilizarse para cribar para agentes que presentan una actividad farmacológica útil en el tratamiento de una enfermedad de cuerpos de Lewy.

Aunque las terapias experimentales que utilizan factores neurotróficos y la injertación de células dopaminérgicas han proporcionado resultados prometedores, se necesitan enfoques alternativos diseñados para reducir la acumulación neuronal de la alfa-syn. Existen cada vez más pruebas convincentes de que los agregados de alfa-syn podrían ser una diana para la inmunoterapia. En efecto, recientemente se ha demostrado un potencial para el tratamiento de las sinucleopatías. Se han vacunado con proteína alfa-syn humana ratones tg que sobreexpresaban alfa-syn humana. En ratones que producían anticuerpos de afinidad relativa elevada tras la vacunación, se observó una menor acumulación de alfa-syn agregada en los cuerpos celulares y sinapsis neuronales que se asoció a una neurodegeneración reducida. Además, los anticuerpos producidos por los animales inmunizados también detectaron las formas agregadas anormales de alfa-syn asociadas a la membrana neuronal y estimularon la degradación de estos agregados, probablemente a través de vías lisosómicas. Se han observado efectos similares utilizando inmunoterapia pasiva con un anticuerpo específico de alfa-syn aplicado exógenamente. Estos resultados sugieren que la vacunación resulta eficaz para reducir la acumulación neuronal de agregados de alfa-syn y que el desarrollo adicional de este enfoque podría inducir efectos beneficiosos en el tratamiento de las TCL y de las sinucleopatías.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un medicamento destinado a prevenir y tratar las sinucleopatías basado en una vacuna.

La presente invención se refiere a la provisión de por lo menos un péptido o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

$(X_1)_n X_2 X_3 X_4 X_5 G X_6 P (X_7)_m$  (Fórmula I),

en la que:

5  $X_1$  es cualquier residuo aminoácido,

$X_2$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de lisina (K), arginina (R), alanina (A) e histidina (H),

10  $X_3$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), glicina (G) y alanina (A), preferentemente asparagina (N), serina (S), glicina (G) y alanina (A),

$X_4$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) y alanina (A),

15  $X_5$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D),

20  $X_6$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de alanina (A) y tirosina (Y),

$X_7$  es cualquier residuo aminoácido,

n y m, independientemente, son 0 o un número interior superior a 0,

25 y en el que la secuencia de aminoácidos según la fórmula I no es idéntica o no comprende el fragmento polipeptídico 7-mero de la alfa-sinucleína que presenta la secuencia de aminoácidos KNEEGAP,

30 dicho péptido o péptidos o polipéptido o polipéptidos que presentan una capacidad de unión a un anticuerpo que es específico para un epítipo de alfa-sinucleína que comprende la secuencia de aminoácidos KNEEGAP, para la utilización en la prevención y/o el tratamiento de las sinucleinopatías.

Dichos péptidos o polipéptidos según la presente invención pueden proporcionarse en composiciones adecuadas para la utilización pretendida para la prevención y/o el tratamiento de las sinucleinopatías, especialmente en composiciones farmacéuticas, preferentemente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse en un paciente que lo requiere en una cantidad eficaz para conseguir el efecto preventivo y/o terapéutico.

40 Los péptidos y polipéptidos según la presente invención pueden inducir la formación *in vivo* de anticuerpos dirigidos (ligantes) a la alfa-sinucleína y a fragmentos de la misma, en particular a fragmentos de alfa-sinucleína que comprenden la secuencia de aminoácidos KNEEGAP. Sin embargo, los anticuerpos dirigidos (ligantes) de dichos péptidos y polipéptidos muestran una inmunorreactividad nula o sustancialmente nula con la beta-sinucleína (beta-syn, b-syn). Por lo tanto, al contrario que la alfa-sinucleína original o fragmento o fragmentos de la misma, los péptidos y polipéptidos según la presente invención proporciona una especificidad para el agente relacionado con la enfermedad y evitan la reactividad cruzada con sinucleínas no relacionadas con la enfermedad. Lo anterior sugiere fuertemente una superioridad significativa con respecto a la eficacia y la seguridad, ésta última en particular debido a las características neuroprotectoras que han sido descritas para la beta-sinucleína (Hashimoto M. *et al.*, J. Biol. Chem. 279(22):23622-9, 28 de mayo de 2004; Hashimoto M., Neuron. 32(2):213-23, 25 de octubre de 2001).

50 Los anticuerpos específicos de alfa-sinucleína inducidos por la administración de los compuestos de la presente invención podrían no sólo unirse a las formas monoméricas de la alfa-sinucleína sino también a las formas multiméricas. Lo anterior permite reducir la cantidad de oligómeros de alfa-sinucleína en el cuerpo del individuo que debe ser tratado. La reducción de la alfa-sinucleína resulta particularmente beneficiosa en el tratamiento de las sinucleinopatías.

55 La secuencia de aminoácidos  $(X_1)_n X_2 X_3 X_4 X_5 G X_6 P (X_7)_m$  se considera un mimotopo del epítipo de alfa-sinucleína que comprende la secuencia de aminoácidos KNEEGAP. Según la presente invención, el término "mimotopo" se refiere a una molécula que presenta una conformación que presenta un equivalente topológico al epítipo del que es un mimético. El mimotopo se une a la misma región de unión a antígeno de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno deseado. El mimotopo induce una respuesta inmunitaria en un huésped que es reactivo al antígeno del que es un mimético. El mimotopo puede actuar además como competidor del epítipo del que es un mimético en ensayos de inhibición *in vitro* (por ejemplo ensayos ELISA de inhibición) que implican el epítipo y un anticuerpo que se une a dicho epítipo. Sin embargo, un mimotopo de la presente invención puede no evitar o competir necesariamente con la unión del epítipo del que es un mimético en un ensayo de inhibición *in vitro*, aunque pueda inducir una respuesta inmunitaria específica al administrarlo en un mamífero.

65 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "epítipo" se refiere a una región inmunógena de un antígeno

que es reconocida por una molécula de anticuerpo particular. En general, un antígeno presentará uno o más epítopos, cada uno de ellos capaz de unirse a un anticuerpo que reconoce el epítipo particular.

Los mimotopos de la presente invención pueden producirse sintéticamente mediante métodos de síntesis química que son bien conocidos en la técnica, en forma de un péptido aislado o como parte de otro péptido o polipéptido. Alternativamente, el mimotopo péptido puede producirse en un microorganismo que produce el mimotopo péptido que a continuación se aísla y, si se desea, purificarse adicionalmente. El péptido mimotopo puede producirse en microorganismos tales como bacterias, levaduras u hongos, en células eucariotas tales como una célula de mamífero o una célula de insecto, o en un vector virus recombinante, tal como adenovirus, virus de la viruela, virus herpes, virus del bosque de Simliki, baculovirus, bacteriófago, virus Sindbis o virus Sendai. Entre las bacterias adecuadas para producir el péptido mimotopo se incluyen *E. coli*, *B. subtilis* o cualquier otra bacteria que pueda expresar péptidos tales como el péptido mimotopo. Entre los tipos de levadura adecuados para expresar el péptido mimotopo se incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, *Pichia pastori* o cualquier otra levadura capaz de expresar péptidos. Los métodos correspondientes son bien conocidos en la técnica. También los métodos para aislar y purificar péptidos producidos recombinantemente son bien conocidos en la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo, la filtración en gel, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de intercambio iónico, etc.

Para facilitar el aislamiento del péptido mimotopo, puede prepararse un polipéptido de fusión en el que el péptido mimotopo se fusiona traduccionalmente (se une covalentemente) a un péptido heterólogo que permite el aislamiento mediante cromatografía de afinidad. Los polipéptidos heterólogos típicos son la etiqueta de His (por ejemplo His<sub>6</sub>, 6 residuos de histidina), etiqueta GST (glutación-S-transferasa), etc. El polipéptido de fusión facilita no sólo la purificación de los mimotopos sino que también puede evitar que el polipéptido mimotopo resulte degradado durante la purificación. Si se desea eliminar el polipéptido heterólogo después de la purificación, el polipéptido de fusión puede comprender un sitio de corte en la unión entre el péptido mimotopo y el polipéptido heterólogo. El sitio de corte consiste de una secuencia de aminoácidos que se corta con un enzima específico para la secuencia de aminoácidos en el sitio (por ejemplo proteasas).

Según una forma de realización preferida de la presente invención, X<sub>2</sub> es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de lisina (K) y arginina (R) y/o X<sub>6</sub> es alanina (A).

Según una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, el péptido o polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ANEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KAEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KQEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNDDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RSEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ANDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ANEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ASEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSEDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RSAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RSDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RSEDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSEDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQDDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, preferentemente (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNDEGAP(X<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNEEGAP(X<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNDEGAP(X<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNAEGAP(X<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSDEGAP(X<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNAEGAP(X<sub>2</sub>)<sub>m</sub> o (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RSEEGAP(X<sub>2</sub>)<sub>m</sub>.

Los péptidos y polipéptidos de la presente invención también pueden modificarse en los extremos N-terminal y/o C-terminal de los mismos o en un sitio próximo a los mismos, de manera que en dichas posiciones se une un residuo de cisteína a los mismos. En una forma de realización preferida, se utilizan residuos de cisteína posicionados terminalmente (situados en los extremos N-terminal y C-terminal del péptido) para entrecruzar dichas moléculas con moléculas portadoras, tales como KLH o para ciclar los péptidos mediante un enlace disulfuro. Por lo tanto, n y/o m preferentemente son 1 y X<sub>1</sub> y/o X<sub>7</sub> son preferentemente cisteína (C).

Los mimotopos de la presente invención pueden utilizarse además en diversos ensayos y kits, en particular en ensayos y kits inmunológicos. Por lo tanto, resulta particularmente preferido que los péptidos y polipéptidos de la presente invención pueden ser parte de otro péptido o polipéptido, particularmente un enzima que se utiliza como informador en ensayos inmunológicos. Entre dichos enzimas informadores se incluyen, por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

Los mimotopos de alfa-sinucleína según la presente invención preferentemente son polipéptidos antigénicos que en su secuencia de aminoácidos varían respecto a la secuencia de aminoácidos de la alfa-sinucleína o de fragmentos de alfa-sinucleína. A este respecto, los mimotopos de la invención pueden comprender no sólo sustituciones de aminoácidos de uno o más residuos aminoácidos naturales sino también uno o más aminoácidos no naturales (es decir, no de los 20 aminoácidos "clásicos") o pueden ensamblarse por completo a partir de dichos aminoácidos no naturales. Además, los antígenos inventivos que inducen anticuerpos anti-alfa-sinucleína pueden ensamblarse con D-aminoácidos o L-aminoácidos o con combinaciones de DL-aminoácidos y, opcionalmente, pueden haberse cambiado mediante modificaciones adicionales, cierres de anillos o derivaciones. Pueden proporcionarse antígenos inductores de anticuerpos anti-alfa-sinucleína a partir de bibliotecas de péptidos disponibles comercialmente. Preferentemente, dichos péptidos presentan por lo menos 7 aminoácidos, y las longitudes preferidas pueden ser de

hasta 16, preferentemente de hasta 14 o 20 residuos aminoácidos (por ejemplo 7 o 8 o 20, 7 o 8 a 16, etc.). De esta manera, el péptido o polipéptido de la presente invención comprende 7 a 30, preferentemente 7 a 20, más preferentemente 7 a 16, más preferentemente 8 residuos aminoácidos. Sin embargo, según la invención, también pueden utilizarse perfectamente péptidos más largos como antígenos inductores de anticuerpos anti-alfa-sinucleína.

Además, los mimotopos de la presente invención también pueden formar parte de un polipéptido y en consecuencia comprender en el extremo N-terminal y/o C-terminal del mismo por lo menos un residuo aminoácido adicional.

Para preparar mimotopos de alfa-sinucleína (es decir, antígenos productores de anticuerpos anti-alfa-sinucleína), evidentemente también resultan adecuadas bibliotecas fágicas y bibliotecas de péptidos, por ejemplo producidos mediante química combinatorial o que se obtienen mediante técnicas de cribado de alto rendimiento para las estructuras más variables (Display: A Laboratory Manual, de Carlos F. Barbas (editor) *et al.*; Willats W.G., Phage display: practicalities and prospects. Plant Mol. Biol. 50(6):837-54, dic. de 2002).

Además, según la invención también pueden utilizarse antígenos inductores de anticuerpos anti-alfa-sinucleína basados en ácidos nucleicos ("aptámeros") y estos también pueden encontrarse con las bibliotecas más variables (de oligonucleótidos) (por ejemplo con 2 a 180 residuos de ácidos nucleicos) (por ejemplo Burgstaller *et al.*, Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 5(5):690-700, 2002; Famulok *et al.*, Acc. Chem. Res. 33:591-599, 2000; Mayer *et al.*, PNAS 98:4961-4965, 2001, etc.). En los antígenos inductores de anticuerpos anti-alfa-sinucleína basados en ácidos nucleicos, puede proporcionarse el esqueleto de ácidos nucleicos, por ejemplo por los compuestos fosfodiéster naturales, o también por fosforotioatos o combinaciones o variaciones químicas (por ejemplo como APN), en las que como bases pueden utilizarse, según la invención, principalmente U, T, A, C, G, H y mC. Los residuos 2' de los nucleótidos que pueden utilizarse según la presente invención preferentemente son H, OH, F, Cl, NH<sub>2</sub>, O-metilo, O-etilo, O-propilo u O-butilo, en los que los ácidos nucleicos también pueden modificarse de maneras diferentes, es decir, por ejemplo, con grupos protectores, ya que se utilizan comúnmente en la síntesis de oligonucleótidos. De esta manera, los antígenos inductores de anticuerpos anti-alfa-sinucleína basados en aptámeros también son antígenos inductores de anticuerpos anti-alfa-sinucleína preferentes comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

Según la presente invención, el término "sinucleinopatías" incluye todos los trastornos neurodegenerativos caracterizados por agregaciones patológicas de sinucleína. Varios trastornos neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de cuerpos de Lewy (ECL), la enfermedad de cuerpos de Lewy difusos (ECLD), la demencia con cuerpos de Lewy (DCL), el parkinsonismo con demencia (EPD), la atrofia multisistémica (AMS) y la neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo I (NACH tipo I) se agrupan colectivamente como sinucleinopatías.

Los péptidos y polipéptidos según la presente invención pueden utilizarse no sólo para tratar las sinucleinopatías sino también para evitar dichas enfermedades en individuos en riesgo de desarrollar una sinucleinopatía (por ejemplo predispuestos, por ejemplo genéticamente predispuestos, a desarrollar una sinucleinopatía).

Las abreviaturas para los residuos aminoácidos dados a conocer en la presente invención siguen las recomendaciones de la IUPAC:

| Aminoácido   | Código de 3 letras | Código de 1 letra |
|--------------|--------------------|-------------------|
| Alanina      | Ala                | A                 |
| Arginina     | Arg                | R                 |
| Asparagina   | Asn                | N                 |
| Aspártico    | Asp                | D                 |
| Cisteína     | Cys                | C                 |
| Glutámico    | Glu                | E                 |
| Glutamina    | Gln                | Q                 |
| Glicina      | Gly                | G                 |
| Histidina    | His                | H                 |
| Isoleucina   | Ile                | I                 |
| Leucina      | Leu                | L                 |
| Lisina       | Lys                | K                 |
| Metionina    | Met                | M                 |
| Fenilalanina | Phe                | F                 |
| Prolina      | Pro                | P                 |
| Serina       | Ser                | S                 |
| Treonina     | Thr                | T                 |
| Triptófano   | Trp                | W                 |
| Tirosina     | Tyr                | Y                 |
| Valina       | Val                | V                 |

Los péptidos y polipéptidos de la presente invención puede ser parte además de un polipéptido que comprende 7 a

30 residuos aminoácidos. En consecuencia, n y m pueden ser independientemente un número entero seleccionado de entre el grupo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 y 25.

El péptido o polipéptido o péptidos o polipéptidos según la presente invención pueden consistir en la secuencia de aminoácidos  $(X_1)_n X_2 X_3 X_4 X_5 G X_6 P (X_7)_m$ , en la que n y m son, independientemente, 0 o 1 o son parte de un polipéptido que comprende por lo menos 7 residuos aminoácidos, preferentemente por lo menos 10 residuos aminoácidos, más preferentemente por lo menos 15 residuos aminoácidos y/o un máximo de 50 residuos aminoácidos, preferentemente un máximo de 30 residuos aminoácidos, más preferentemente de 16 residuos aminoácidos.

Inesperadamente, resulta que los compuestos según la presente invención que comprenden o que consisten en las secuencias de aminoácidos listadas anteriormente resultan particularmente adecuadas para la utilización para la preparación de un medicamento destinado a la utilización para tratar o prevenir las sinucleinopatías. Estos péptidos (mimotopos) son capaces de inducir la formación in vivo de anticuerpos dirigidos contra el epítipo original de la alfa-sinucleína humana que comprende la secuencia de aminoácidos KNEEGAP y la proteína alfa-sinucleína humana misma. Sin embargo, dichos péptidos (mimotopos) no son capaces de inducir inmunorreactividad contra la proteína beta-sinucleína humana. Los anticuerpos inducidos por péptido son responsables de la eliminación de la alfa-sinucleína (que participa en la formación de agregados de alfa-sinucleína, cuerpos de Lewy) y/o para la disolución de los agregados de alfa-sinucleína (cuerpos de Lewy) en un individuo.

Los péptidos y polipéptidos según la presente invención pueden utilizarse para la preparación de un medicamento, en particular una vacuna, que puede utilizarse para tratar una alfa-sinucleinopatía, en el que el medicamento resulta particularmente adecuado para tratar una sinucleinopatía seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de cuerpos de Lewy (ECL), enfermedad de cuerpos de Lewis difusos (ECLD), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), parkinsonismo con demencia (EPD), atrofia multisistémica (AMS) y neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo I (NACH tipo I).

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el péptido o péptidos o polipéptido o polipéptidos se acoplan a un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente HLA (hemocianina de lapa americana), toxoide tetánico, proteína de unión a albúmina, albúmina de suero bovino, un dendrímero (MAP, *Biol. Chem.* 358:581), conectores peptídicos (o regiones flanqueantes), así como las sustancias adyuvantes indicadas en Singh *et al.*, *Nat. Biotech.* 17:1075-1081, 1999 (en particular las indicadas en la Tabla 1 de dicho documento) y O'Hagan *et al.*, *Nature Reviews, Drug Discovery* 2(9):727-735, 2003 (en particular los compuestos inmunopotenciadores endógenos y sistemas de administración indicados en dicha referencia) y otros o mezclas de los mismos. La química de conjugación (por ejemplo mediante compuestos heterobifuncionales tales como GMB S y, evidentemente, también otros indicados en "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson) en el presente contexto pueden seleccionarse de entre reacciones conocidas por el experto en la materia. Además, la composición de vacuna puede formularse con un adyuvante, preferentemente una composición de aluminio de baja solubilidad, en particular hidróxido de aluminio. Evidentemente pueden utilizarse también adyuvantes tales como fosfato de aluminio MF59, fosfato de calcio, citoquinas (por ejemplo IL-2, IL-12, GM-CSF), saponinas (por ejemplo QS21), derivados de MDP, oligos CpG, IC31, LPS, MPL, polifosfacenos, emulsiones (por ejemplo de Freund, SAF), liposomas, virosomas, iscomas, copleatos, micropartículas de PLG, partículas de poloxámero, partículas similares a virus, enterotoxina termolábil (ET), toxina del cólera (TC), toxinas mutantes (por ejemplo LTK63 y LTR72), micropartículas y/o liposomas polimerizados.

El péptido o polipéptido de la presente invención preferentemente se une al vehículo o adyuvante mediante un conector, que se selecciona de entre el grupo que consiste en NHS-poli(óxido de etileno) (PEO) (por ejemplo NHS-PEO<sub>4</sub>-maleimida).

Una vacuna que comprende el presente compuesto (mimotopo) y el vehículo farmacéuticamente aceptable puede administrarse mediante cualquier modo de aplicación adecuado, por ejemplo i.d., i.p., i.m., por vía intranasal, oral, subcutánea, etc., y en cualquier dispositivo de administración adecuado (O'Hagan *et al.*, *Nature Reviews, Drug Discovery* 2(9):727-735, 2003). El compuesto de la presente invención preferentemente se formula para la administración subcutánea, intradérmica o intramuscular (ver, por ejemplo, "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations", Sarfaraz Niazi, CRC Press Inc., 2004).

Típicamente, la vacuna contiene el compuesto según la invención en una cantidad de entre 0,1 ng y 10 mg, preferentemente de entre 10 ng y 1 mg, en particular de entre 100 ng y 100 µg, o, alternativamente, por ejemplo de entre 100 fmoles y 10 µmoles, preferentemente de entre 10 pmoles y 1 µmol, en particular de entre 100 pmoles y 100 nmoles. Típicamente, la vacuna puede contener además sustancias auxiliares, por ejemplo tampones, estabilizantes, etc. Preferentemente, dichas sustancias auxiliares, por ejemplo un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como agua, tampón y/o estabilizantes, se encuentran contenidos en una cantidad de entre 1% y 99% (en peso), más preferentemente entre 5% y 80% (en peso), especialmente entre 10% y 70% (en peso). Entre los posibles regímenes de administración se incluyen un tratamiento semanal, bisemanal, cada cuatro semanas (mensual) o bimensual durante aproximadamente 1 a 12 meses; sin embargo, resultan preferidos también 2 a 5, especialmente 3 a 4, administración de vacuna iniciales (en uno o dos meses), seguido de vacunaciones de refuerzo 6 a 12 meses después o incluso años después, aparte de otros regímenes ya propuestos para otras vacunas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un péptido que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ANEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ANEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KAEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNAEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNEDGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KQEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNDDGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNDEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNEDGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RSEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ANDEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ANEDGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ASEEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNEDGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNDEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNAEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNAEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSAEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSDEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSEDEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQDEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQEDGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSDEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSDEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSDEGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, y (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQDDGAP (X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, en el que X<sub>1</sub> y X<sub>7</sub> son cisteínas y n y m son, independientemente, 0 o 1.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el péptido se acopla con un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente HLA (hemocianina de lapa americana).

La formulación farmacéutica según la presente invención, que puede formularse en forma de una vacuna para, por ejemplo, la administración subcutánea, intradérmica y/o intramuscular, puede utilizarse en el tratamiento de cualquier tipo de sinucleinopatía.

La presente invención se ilustra adicionalmente en las figuras y ejemplos, a continuación; sin embargo, sin limitarse a los mismos.

La figura 1 representa la secuencia de la alfa-sinucleína de longitud completa (140 aa; entrada de Swiss Prot. nº P37840) y la secuencia utilizada para crear un anticuerpo monoclonal para la detección de la alfa-sinucleína de longitud completa, así como las versiones truncadas y modificadas C-terminalmente de la misma. El péptido en la posición 100-109 utilizado para la generación del anticuerpo monoclonal se encuentra subrayado. El péptido (p4453) se acopló con una C en posición C-terminal.

La figura 2 representa la detección de alfa-sinucleína mediante ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal generado específico para la alfa-sinucleína humana en las posiciones 100 a 109. El anticuerpo monoclonal 12-9-9 se generó y se sometió a ensayo para su especificidad para las sinucleínas en el ELISA. Se detectaron alfa-sinucleína (p4446) y el epítipo humano p4453. No se detectó la proteína p4447 de control negativo (beta-sinucleína).

La figura 3 representa la definición del epítipo mínimo del anticuerpo monoclonal 12-9-9 mediante ELISA.

Los péptidos p4446 (alfa-sinucleína), p4453 (epítipo humano utilizado para crear el anticuerpo sometido a ensayo) fueron detectados por el anticuerpo. El epítipo original p4453 se truncó N- o C-terminalmente y se utilizó para el ELISA con el fin de definir el epítipo mínimo necesario para la unión específica. Los péptidos p5399 y p5403 perdieron su unión al anticuerpo monoclonal 12-9-9. De esta manera, la secuencia mínima necesaria para la unión de 12-9-9 se predice que es KNEEGAP situada en las posiciones 102 a 108 de la alfa-sinucleína, mientras que el truncado de uno de los aminoácidos flanqueantes anuló la unión. Se presentan los datos en una escala lineal.

La figura 4 representa la detección de epítipos y mimotopos mediante ELISA utilizando un anticuerpo monoclonal específico para la alfa-sinucleína humana en las posiciones 100 a 109. La alfa-sinucleína, así como los péptidos p5436 (epítipo mínimo humano) y el mimotopo p5439 se detectaron de manera similar con el anticuerpo monoclonal 12-9-9. El mimotopo p5440 no se detectó, mientras que el mimotopo p5444 se detectó en grado mucho más débil que el epítipo humano por el anticuerpo monoclonal 12-9-9.

La figura 5 representa la inducción de la respuesta inmunitaria contra la alfa-sinucleína tras la inmunización con péptido. Los sueros de los ratones inmunizados (p5436 a p5590) mostraban títulos contra la alfa-sinucleína tras 3 vacunaciones. Los sueros de los ratones inmunizados (p5463 a p5466) no detectaron alfa-sinucleína (títulos medidos en ELISA de semimáximo de 1:50 o inferior). Se definió la clase de inmunogenicidad de la manera siguiente: clase 2 - péptidos que inducían una respuesta inmunitaria con DO semimáxima superior a 1:1.000. Clase 1: péptidos que inducían una respuesta inmunitaria con una DO semimáxima de entre 1.000 y 51. Clase 0: péptidos que una respuesta inmunitaria nula o muy baja con una DO semimáxima de aproximadamente 50 o inferior.

## Ejemplos

Con el fin de identificar los péptidos y polipéptidos que pueden utilizarse para tratar y/o prevenir las sinucleopatías, se utilizó un anticuerpo que puede detectar la secuencia de aminoácidos derivada de la alfa-sinucleína humana LGKNEEGAPQ (=epítipo original, SEC ID nº 3, p4453) y la alfa-sinucleína humana de longitud completa (SEC ID nº 1, p4446). No reconoce la beta-sinucleína humana (SEC ID nº 2, p4447, número de acceso Q16143: mdvfmkgism akegvvaiae ktkqgvteaa ektkegvlyv gsktregvvq gvasvaektk eqashlggav fsgagniaaa tglvkreefp tdlkpeevaq eaaeepliep lmepegesy e dppqeeyqey epea). El anticuerpo puede ser una preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales o cualquier parte anticuerpo o derivado del mismo y se une específicamente al epítipo LGKNEEGAPQ de la alfa-sinucleína humana, es decir, se une a péptido y proteína de longitud completa pero no se une a beta-sinucleína humana. Los mimotopos se identifican y se caracterizan adicionalmente con dichos anticuerpos

monoclonales (detectando una secuencia dentro de los aminoácidos 100 a 109 de la proteína alfa-sinucleína humana) y bibliotecas de péptidos.

**Ejemplo 1: generación de anticuerpos monoclonales para detectar específicamente el epítipo de alfa-sinucleína humana original LGKNEEGAPQC, SEC ID nº 3, p4453 y alfa-sinucleína humana pero no a beta-sinucleína humana.**

Un anticuerpo monoclonal derivado de la fusión "AFFiRiS 6": se inmunizaron ratones Balb/c (Charles River) con el epítipo de alfa-sinucleína original LGKNEEGAPQ-C acoplado a TGB (tiroglobulina bovina) y ACF (adyuvante completo de Freund; primera inyección), así como AIF (adyuvante incompleto de Freund; 3 inyecciones de refuerzo) como adyuvante. Se detectaron hibridomas productores de anticuerpos específicos de péptido LGKNEEGAPQ mediante ELISA (placas de ELISA recubiertas con péptido LGKNEEGAPQC). Se utilizó alfa-sinucleína humana (proteína recombinante, p4446) como péptido de control positivo: se incluyeron hibridomas que reconocían la proteína recombinante inmovilizada sobre placas de ELISA debido a que se unen tanto específicamente tanto a péptido como a alfa-sinucleína de longitud completa. Se utilizó beta-sinucleína humana (proteína recombinante, p4447) como péptido de control negativo: los hibridomas que reconocían ambas proteínas recombinantes inmovilizadas sobre las placas de ELISA se excluyeron porque no distinguían entre las dos proteínas de sinucleína diferentes. Se analizó el clon de hibridoma (12-9-9, IgG1, kappa) para la detección específica de la alfa sinucleína humana natural epítipo LGKNEEGAPQ. 12-9-9 reconoce el epítipo inyectado, así como la proteína alfa-sinucleína de longitud completa (proteína recombinante; obtenida de rPeptide, Bogart, GA, USA) en el ELISA (ver la figura 2). Sin embargo, no detecta la proteína beta-sinucleína (proteína recombinante, obtenida de rPeptide, Bogart, GA, USA) en el ELISA (ver la figura 2). A continuación, se definió el epítipo mínimo necesario para la unión del anticuerpo, en el ELISA utilizando los péptidos p4446, p4453, p5397, p5398, p5399, p5400, p5401, p5402, p5403, p5404, p5405, p5406 (ver la figura 3) y p5436 (ver la figura 4). p4446, p4453, p5397, p5398 y p5402 así como p5436 conservaron las capacidades de unión completas, mientras que p5399, p5400, p5401, p5403, p5404, p5405 y p5406 perdieron la unión a 12-9-9. De esta manera, el epítipo mínimo necesario para la unión se ha definido que es KNEEGAP.

**Ejemplo 2: expresión fágica, unión *in vitro* y ELISA de inhibición**

Las bibliotecas de expresión fágica utilizadas en el presente ejemplo fueron: Ph.D. 7: New England BioLabs E8102L (biblioteca de 7meros lineales), Ph. D. 12: New England BioLabs E8111L (biblioteca de 12meros lineales) y Ph. D. C7C: New England BioLabs E8120L (una biblioteca de heptapéptidos restringidos por disulfuros). Se llevó a cabo la expresión fágica siguiendo el protocolo del fabricante ([www.neb.com](http://www.neb.com)). Tras 2 o 3 rondas posteriores de selección, se recolectaron clones fágicos individuales y se los sobrenadantes fágicos se sometieron a ELISA en placas recubiertas con el anticuerpo que se había utilizado para el procedimiento de selección. Se secuenciaron los clones fágicos que eran positivos en dicho ELISA (señal fuerte para la diana pero sin señal para el control no específico). A partir de las secuencias de ADN, se dedujeron las secuencias peptídicas. Se sintetizaron estos péptidos y se caracterizaron en ELISA de unión y de inhibición. A algunos péptidos se les unieron AA adicionales al extremo C-terminal. Además, se crearon algunos nuevos mimotopos mediante la combinación de información de secuencia de los mimotopos identificados en el cribado. Se utilizaron ambos grupos que contenían mimotopos recién diseñados para apoyar la identificación de una secuencia de consenso para una vacunación con mimotopo.

1. Ensayo (ELISA) *in vitro* de unión

Se acoplaron a ASB péptidos derivados de la expresión fágica, así como variantes truncadas N-terminalmente de los mismos, y se unieron a placas de ELISA (1 µM) y a continuación se incubaron con el anticuerpo monoclonal que se había utilizado para el procedimiento de cribado, a fin de analizar la capacidad de unión de los péptidos identificados (ver la figura 4).

2. Ensayo (ELISA) *in vitro* de inhibición

Se incubaron diferentes cantidades de péptidos (concentraciones comprendidas entre 400 µg/ml y 3 µg/ml (diluciones en serie), derivados de la expresión fágica, con el anticuerpo monoclonal que se había utilizado para el procedimiento de cribado. Los péptidos que redujeron la unión posterior del anticuerpo al epítipo de la alfa-sinucleína humana original (p5436) y la proteína alfa-sinucleína humana (p4446) utilizadas para recubrir placas de ELISA se consideraron inhibidoras en el presente ensayo.

**Ejemplo 3: ensayos *in vivo* de mimotopos: análisis de la inmunogenicidad**

1. Ensayos *in vivo* de mimotopos

Se acoplaron péptidos tanto inhibidores como no inhibidores a HLA y se inyectaron en ratones (ratones C57/B16 o BalbC de tipo salvaje; inyección subcutánea en el flanco) conjuntamente con un adyuvante apropiado (hidróxido de aluminio). Los animales se vacunaron 3 veces a intervalos bisemanales y además se extrajeron sueros quincenalmente. En cada suero se determinaron los títulos contra los péptidos inyectados, así como contra un péptido irrelevante. Se determinaron los títulos contra la proteína alfa-sinucleína humana recombinante y la beta-

sinucleína humana recombinante partiendo del suero 2, respectivamente. En general, se analizaron los sueros mediante la reacción contra péptidos acoplados con albúmina de suero bovino (ASB) y proteínas de longitud completa recombinantes que se inmovilizaron sobre placas de ELIAS. Se determinaron los títulos utilizando anticuerpos específicos anti-IgG de ratón. Para ejemplos de inmunogenicidad contra el péptido inyectado y la alfa-sinucleína, ver las Tablas 5 y 6.

## 2. Resultados

2.1. Identificación de un mAb específico de alfa-sinucleína: la figura 2 ilustra la caracterización del anticuerpo monoclonal específico de la alfa-sinucleína 12-9-9 (IgG1, kappa) derivado de la fusión Affiris 6.

2.2. Cribado para mimotopos específicos de alfa-sinucleína:

2.2.1. Expresión fágica PhD 7, PhD 12 y PhD C7C y cribado mutacional.

2.2.1.1. Cribado con anticuerpo monoclonal dirigido contra LGKNEEGAPQ

Mediante el cribado de las bibliotecas de expresión fágica PhD 7, PhD 12 y PhD C7C y el desplazamiento selectivo de aminoácidos individuales, se identificó un total de 60 secuencias (ver la Tabla 1, ID18-77).

La Tabla 1 muestra ejemplos de todos los péptidos utilizados.

| SEC ID | nº de péptido | secuencia                          |
|--------|---------------|------------------------------------|
| 1      | p4446         | Alfa-sinucleína (figura 1; P37840) |
| 2      | p4447         | Beta-sinucleína; Q16143            |
| 3      | p4453         | LGKNEEGAPQC                        |
| 4      | p4454         | MGKGEEGYPC                         |
| 5      | p5397         | GKNEEGAPQC                         |
| 6      | p5398         | KNEEGAPQC                          |
| 7      | p5399         | NEEGAPQC                           |
| 8      | p5400         | EEGAPQC                            |
| 9      | p5401         | EGAPQC                             |
| 10     | p5402         | LGKNEEGAPC                         |
| 11     | p5403         | LGKNEEGAC                          |
| 12     | p5404         | LGKNEEGC                           |
| 13     | p5405         | LGKNEEC                            |
| 14     | p5406         | LGKNEC                             |
| 15     | p5435         | CKNEEGAP                           |
| 16     | p5436         | KNEEGAPC                           |
| 17     | p1253         | DAEFRHDSGY-C                       |
| 18     | p5437         | ANEEGAPC                           |
| 19     | p5438         | KAEEGAPC                           |
| 20     | p5439         | KNAEGAPC                           |
| 21     | p5440         | KNEAGAPC                           |
| 22     | p5441         | KNEEAAPC                           |
| 23     | p5442         | KNEEGAAC                           |
| 24     | p5443         | RNEEGAPC                           |
| 25     | p5444         | HNEEGAPC                           |
| 26     | p5445         | KNDEGAPC                           |
| 27     | p5446         | KNEDGAPC                           |
| 28     | p5447         | KQEEGAPC                           |
| 29     | p5448         | KSEEGAPC                           |
| 30     | p5449         | KNDDGAPC                           |
| 31     | p5461         | KPSFKNEC                           |
| 32     | p5462         | QPSFAMEC                           |
| 33     | p5463         | SPSFKQEC                           |
| 34     | p5464         | TPSWKGEC                           |
| 35     | p5465         | DPSFALEC                           |
| 36     | p5466         | LPSFRLEC                           |
| 37     | p5467         | EPNSRMDC                           |
| 38     | p5468         | QPSSKLDC                           |
| 39     | p5469         | HHQSKFFDAPPC                       |
| 40     | p5547         | QASFAMEC                           |

|    |        |           |
|----|--------|-----------|
| 41 | p5548  | TASWKGEC  |
| 42 | p5549  | QASSKLDC  |
| 43 | p5550  | QPAFAMEC  |
| 44 | p5551  | TPAWKGEC  |
| 45 | p5552  | QPASKLDC  |
| 46 | p5553  | QPSFAMAC  |
| 47 | p5554  | TPSWKGAC  |
| 48 | p5555  | QPSSKLAC  |
| 49 | p5556  | APSWKGEC  |
| 50 | p5557  | TPSAKGEC  |
| 51 | p5558  | TPSWAGEC  |
| 52 | p5559. | TPSWKAEC  |
| 53 | p5560  | CTPSWKGE  |
| 54 | p5587  | RNDEGAPC  |
| 55 | p5588  | RNEDGAPC  |
| 56 | p5589  | RQEEGAPC  |
| 57 | p5590  | RSEEGAPC  |
| 58 | p5591  | ANDEGAPC  |
| 59 | p5592  | ANEDGAPC  |
| 60 | p5593  | HSEEGAPC  |
| 61 | p5594  | ASEEGAPC  |
| 62 | p5595  | HNEDGAPC  |
| 63 | p5596  | HNDEGAPC  |
| 64 | p5597  | RNAEGAPC  |
| 65 | p5598  | HNAEGAPC  |
| 66 | p5599  | KSAEGAPC  |
| 67 | p5600  | KSDEGAPC  |
| 68 | p5601  | KSEDEGAPC |
| 69 | p5602  | RQDEGAPC  |
| 70 | p5603  | RQEDGAPC  |
| 71 | p5604  | HSAEGAPC  |
| 72 | p5605  | RSAEGAPC  |
| 73 | p5606  | RSDEGAPC  |
| 74 | p5607  | RSEDEGAPC |
| 75 | p5608  | HSDEGAPC  |
| 76 | p5609  | HSEDEGAPC |
| 77 | p5610  | RQDDGAPC  |

La Tabla 2 muestra ejemplos de péptidos y de la capacidad de unión de los mismos en comparación con el epítipo original.

| número interno | secuencia   | unión | observación |
|----------------|-------------|-------|-------------|
| p5435          | CKNEEGAP    | 2     | original    |
| p5436          | KNEEGAPC    | 2     | original    |
| p5437          | ANEEGAPC    | 2     | mimotopo    |
| p5438          | KAEEGAPC    | 1     | mimotopo    |
| p5439          | KNAEGAPC    | 2     | mimotopo    |
| p5443          | RNEEGAPC    | 2     | mimotopo    |
| p5444          | HNEEGAPC    | 2     | mimotopo    |
| p5445          | KNDEGAPC    | 2     | mimotopo    |
| p5446          | KNEDGAPC    | 2     | mimotopo    |
| p5447          | KQEEGAPC    | 2     | mimotopo    |
| p5448          | KSEEGAPC    | 2     | mimotopo    |
| p5449          | KNDDGAPC    | 2     | mimotopo    |
| p5398          | KNEEGAPQC   | 2     | original    |
| p5402          | LGKNEEGAPC  | 2     | original    |
| p5397          | GKNEEGAPQC  | 2     | original    |
| p4454          | MGKGEEGYPQC | 2     | original    |
| p4453          | LGKNEEGAPQC | 2     | original    |
| p5461          | KPSFKNEC    | 2     | mimotopo    |
| p5462          | QPSFAMEC    | 2     | mimotopo    |
| p5463          | SPSFKQEC    | 2     | mimotopo    |
| p5464          | TPSWKGEC    | 2     | mimotopo    |

|       |            |   |               |
|-------|------------|---|---------------|
| p5465 | DPSFALEC   | 2 | mimotopo      |
| p5466 | LPSFRLEC   | 1 | mimotopo      |
| p5468 | QPSSKLDC   | 2 | mimotopo      |
| p5547 | QASFAMEC   | 1 | mimotopo      |
| p5548 | TASWKGEC   | 2 | mimotopo      |
| p5549 | QASSKLDC   | 1 | mimotopo      |
| p5551 | TPAWKGEC   | 1 | mimotopo      |
| p5556 | APSWKGEC   | 2 | mimotopo      |
| p5558 | TPSWAGEC   | 2 | mimotopo      |
| p5560 | CTPSWKGE   | 2 | mimotopo      |
| p5587 | --RNDEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5588 | --RNEDGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5589 | --RQEEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5590 | --RSEEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5591 | --ANDEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5593 | --HSEEGAPC | 1 | mimotopo      |
| p5594 | --ASEEGAPC | 1 | mimotopo      |
| p5596 | --HNDEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5597 | --RNAEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5598 | --HNAEGAPC | 1 | mimotopo      |
| p5599 | --KSAEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5600 | --KSDEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5601 | --KSEDGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5602 | --RQDEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5603 | --RQEDGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5604 | --HSAEGAPC | 1 | mimotopo      |
| p5605 | --RSAEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5606 | --RSDEGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5607 | --RSEDGAPC | 2 | mimotopo      |
| p5608 | --HSDEGAPC | 1 | mimotopo      |
| p5610 | --RQDDGAPC | 2 | mimotopo      |
| p4446 |            | 2 | $\alpha$ -Syn |

Tabla 2: ejemplos de epítomos y mimotopos de alfa-sinucleína ligantes del anticuerpo monoclonal 12-9-9.

La capacidad de unión se codificó según el código siguiente:

- 5 0: ninguna unión detectable en el ELISA a 12-9-9  
1: unión débil: unión del mimotopo más débil que la de la secuencia original mínima p5436  
2: unión fuerte: unión del mimotopo similar a la de la secuencia original mínima p5436
- 10 2.3. Caracterización *in vitro* de los mimotopos identificados en un cribado (expresión fágica y cribado de péptidos) con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la alfa-sinucleína:
- Las figuras 2 y 3 muestran ejemplos representativos de los ensayos de unión e inhibición utilizados para caracterizar los mimotopos *in vitro*. Los datos obtenidos se resumen en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 3: ensayo de inhibición

| denominación | secuencia  | competencia | observación |
|--------------|------------|-------------|-------------|
| p5435        | CKNEEGAP   | 1           | original    |
| p5436        | KNEEGAPC   | 2           | original    |
| p5439        | KNAEGAPC   | 1           | mimotopo    |
| p5443        | RNEEGAPC   | 2           | mimotopo    |
| p5445        | KNDEGAPC   | 2           | mimotopo    |
| p5446        | KNEDGAPC   | 1           | mimotopo    |
| p5448        | KSEEGAPC   | 1           | mimotopo    |
| p5449        | KNDDGAPC   | 1           | mimotopo    |
| p5398        | KNEEGAPQC  | 2           | original    |
| p5402        | LGKNEEGAPC | 2           | original    |
| p5397        | GKNEEGAPQC | 2           | original    |

|       |          |   |          |
|-------|----------|---|----------|
| p5464 | TPSWKGEC | 1 | mimotopo |
| p5548 | TASWKGEC | 1 | mimotopo |
| p5556 | APSWKGEC | 1 | mimotopo |
| p5557 | TPSAKGEC | 1 | mimotopo |
| p5587 | RNDEGAPC | 2 | mimotopo |
| p5588 | RNEDGAPC | 1 | mimotopo |
| p5590 | RSEEGAPC | 1 | mimotopo |
| p5597 | RNAEGAPC | 1 | mimotopo |
| p5600 | KSDEGAPC | 1 | mimotopo |
| p5602 | RQDEGAPC | 1 | mimotopo |
| p5603 | RQEDGAPC | 1 | mimotopo |

Tabla 3: mimotopos de alfa-sinucleína identificados en la presente invención que proporcionaron resultados positivos en los ensayos de inhibición.

5 Leyenda de la Tabla 3: la capacidad competitiva se codifica siguiendo el código siguiente:

0: ninguna competencia detectable en el ELISA respecto a 12-9-9

1: competencia débil: competencia del mimotopo más débil que la de la secuencia original mínima p5436

2: competencia fuerte: competencia del mimotopo similar a la de la secuencia original mínima p5436

10

Tabla 4: péptidos y proteínas no mimotopo:

| SEC ID nº | denominación | Secuencia       |
|-----------|--------------|-----------------|
| 1         | p4446        | Alfa-sinucleína |
| 2         | p4447        | Beta-sinucleína |
| 3         | p4453        | LGKNEEGAPQC     |
| 4         | p4454        | MGKGEEGYPQC     |
| 5         | p5397        | GKNEEGAPQC      |
| 6         | p5398        | KNEEGAPQC       |
| 7         | p5399        | NEEGAPQC        |
| 8         | p5400        | EEGAPQC         |
| 9         | p5401        | EGAPQC          |
| 10        | p5402        | LGKNEEGAPC      |
| 11        | p5403        | LGKNEEGAC       |
| 12        | p5404        | LGKNEEGC        |
| 13        | p5405        | LGKNEEC         |
| 14        | p5406        | LGKNEC          |
| 15        | p5435        | CKNEEGAP        |
| 16        | p5436        | KNEEGAPC        |
| 17        | p1253        | DAEFRHDSGY-C    |

2.4. Caracterización in vivo de los mimotopos identificados durante el cribado de las bibliotecas de expresión fágica con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la alfa-sinucleína:

15

Se inmunizaron por vía subcutánea ratones C57/B16 o BalbC hembra, 5 a 6 ratones por grupo, con 30 µg de péptido acoplado con HLA. Los grupos de control recibieron inyecciones de PBS o del epítipo original. Como adyuvante se utilizó alúmina. Todos los péptidos administrados fueron capaces de unirse a los anticuerpos monoclonales de unión específica a los aa100-109 de la alfa-sinucleína humana, aunque algunos de los péptidos inhibieron sólo de manera débil la unión del epítipo original a su anticuerpo parental in vitro (en un ensayo in vitro de inhibición). El ensayo ELISA in vitro para determinar el título de anticuerpo se llevó a cabo con sueros de ratones individuales (ver la Tab. 5) tras cada vacunación a intervalos de dos semanas. Los pocillos de la placa de ELISA se recubrieron con conjugados de mimotopo-ASB. El control positivo se llevó a cabo mediante reacción del anticuerpo parental con el conjugado mimotopo-ASB respectivo. La detección se llevó a cabo con anticuerpo anti-IgG de ratón. Además, se inmovilizaron proteínas recombinantes sobre las placas de ELISA y se hicieron reaccionar los sueros. Para todos los mimotopos sometidos a ensayo en ratones C57/B16 o BalbC, pudieron detectarse anticuerpos que reaccionaban con el péptido inyectado individual tras la vacunación repetida. Sin embargo, no todos los ratones indujeron un título elevado contra la alfa-sinucleína (ver la Tab. 5 para ejemplos).

30

Tabla 5: la inducción de respuesta inmunitaria se indica con el título contra el péptido inyectado (p4446). Se midió el título mediante ELISA y se indica como DO semimáxima.

| denominación | Secuencia   | Título en animales, DO semimáxima | observación    |
|--------------|-------------|-----------------------------------|----------------|
|              |             | pep. inyectado                    |                |
| p5436        | KNEEGAPC    | 10.000                            | original       |
| p5439        | KNAEGAPC    | 8.000                             | mimotopo       |
| p5443        | RNEEGAPC    | 9.000                             | mimotopo       |
| p5445        | KNDEGAPC    | 26.000                            | mimotopo       |
| p5402        | LGKNEEGAPC  | 20.000                            | original       |
| p4454        | MGKGEEGYPQC | 17.000                            | ratón original |

5 Tabla 6: clase de inmunogenicidad de mimotopos contra una Syn

| denominación | secuencia   | Clase de inmunogenicidad:<br>una Syn | observación    |
|--------------|-------------|--------------------------------------|----------------|
| p5402        | LGKNEEGAP-C | 2                                    | original       |
| p5436        | KNEEGAPC    | 2                                    | original       |
| p5445        | KNDEGAPC    | 2                                    | mimotopo       |
| p5443        | RNEEGAPC    | 1                                    | mimotopo       |
| p5587        | RNDEGAPC    | 1                                    | mimotopo       |
| p5439        | KNAEGAPC    | 1                                    | mimotopo       |
| p5600        | KSDEGAPC    | 1                                    | mimotopo       |
| p4454        | MGKGEEGYPQC | 1                                    | ratón original |
| p5597        | RNAEGAPC    | 1                                    | mimotopo       |
| p5590        | RSEEGAPC    | 1                                    | mimotopo       |
| p5463        | SPSFKQEC    | 0                                    | mimotopo       |
| p5556        | APSWKGEC    | 0                                    | mimotopo       |
| p5462        | QPSFAMEC    | 0                                    | mimotopo       |
| p5464        | TPSWKGEC    | 0                                    | mimotopo       |
| p5468        | QPSSKLDC    | 0                                    | mimotopo       |
| p5461        | KPSFKNEC    | 0                                    | mimotopo       |
| p5465        | DPSFALEC    | 0                                    | mimotopo       |
| p5466        | LPSFRLEC    | 0                                    | mimotopo       |

Clase de inmunogenicidad:

- 10 los péptidos se clasificaron según su capacidad de inducir una respuesta inmunitaria.
- 2: péptidos que inducían una respuesta inmunitaria con una DO semimáxima superior a 1.000  
1: péptidos que inducían una respuesta inmunitaria con una DO semimáxima de entre 1.000 y 51.
- 15 0: péptidos que no inducían ninguna respuesta inmunitaria o una respuesta inmunitaria muy reducida con una DO semimáxima de aproximadamente 50 o inferior.

# REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende por lo menos un péptido o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

$(X_1)_n X_2 X_3 X_4 X_5 G X_6 P (X_7)_m$  (Fórmula I),

en la que:

$X_1$  es cualquier residuo aminoácido,

$X_2$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en lisina (K), arginina (R), alanina (A) e histidina (H),

$X_3$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), glicina (G) y alanina (A), preferentemente asparagina (N), serina (S), glicina (G) y alanina (A),

$X_4$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) y alanina (A),

$X_5$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D),

$X_6$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en alanina (A) y tirosina (Y),

$X_7$  es cualquier residuo aminoácido,

n y m, independientemente, son 0 o un número entero superior a 0,

y en la que la secuencia de aminoácidos según la fórmula I no es idéntica al, o no comprende el fragmento polipeptídico 7-mero de la alfa-sinucleína que presenta la secuencia de aminoácidos KNEEGAP,

presentando dicho por lo menos un péptido o polipéptido una capacidad de unión a un anticuerpo que es específico para un epítipo de alfa-sinucleína que comprende la secuencia de aminoácidos KNEEGAP

para la utilización en la prevención y/o el tratamiento de las sinucleinopatías.

2. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que  $X_2$  es un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en lisina (K) y arginina (R) y/o  $X_6$  es alanina (A).

3. Composición para la utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que el péptido o polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de entre el grupo que consiste en  $(X_1)_n$ KNDEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ ANEEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KAEEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KNAEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RNEEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ HNEEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KNEDGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KQEEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KSEEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KNDDGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RNDEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RNEDGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RQEEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RSEEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ ANDEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ ANEDGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ HSEEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ ASEEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ HNEDGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ HNDEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RNAEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ HNAEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KSAEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KSDEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KSDEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RQDEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RQEDGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ HSAEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RSAEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RSDEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RSEDGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ HSDEGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ HSEDGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RQDDGAP( $X_7$ )<sub>m</sub>, preferentemente  $(X_1)_n$ KNDEGAP( $X_2$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RNEEGAP( $X_2$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RNDEGAP( $X_2$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KNAEGAP( $X_2$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ KSDEGAP( $X_2$ )<sub>m</sub>,  $(X_1)_n$ RNAEGAP( $X_2$ )<sub>m</sub> o  $(X_1)_n$ RSEEGAP( $X_2$ )<sub>m</sub>.

4. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que n y/o m son 1 y  $X_1$  y/o  $X_7$  son cisteína (C).

5. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que el péptido o polipéptido comprende 7 a 30, preferentemente 7 a 20, más preferentemente 7 a 16, todavía más preferentemente 8, residuos aminoácidos.

6. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que la sinucleinopatía se selecciona de entre el grupo que consiste en trastornos de cuerpos de Lewy (TCL), preferentemente enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Parkinson con demencia (EPD) y demencia con cuerpos de Lewy (DCL), así como atrofia multisistémica (AMS) o neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo I (NACH tipo I).

7. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que dicho por lo

menos un péptido o polipéptido se acopla a un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente HLA (hemocianina de lapa americana).

5 8. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que dicho por lo menos un péptido o polipéptido se formula para la administración intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

10 9. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que dicho por lo menos un péptido o polipéptido se formula con un adyuvante, preferentemente hidróxido de aluminio.

10 10. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que dicho por lo menos un péptido o polipéptido se encuentra contenido en una cantidad desde 0,1 ng a 10 mg, preferentemente 10 ng a 1 mg, en particular 100 ng a 100 µg.

15 11. Péptido que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ANEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KAEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KQEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KNDDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RSEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ANDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ANEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>ASEEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RNAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HNAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>KSEDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RSAEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RSDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RSEDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSDEGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>HSEDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub> y (X<sub>1</sub>)<sub>n</sub>RQDDGAP(X<sub>7</sub>)<sub>m</sub>, en el que X<sub>1</sub> y X<sub>7</sub> son cisteínas y n y m son, independientemente, 0 o 1.

25 12. Péptido según la reivindicación 11, caracterizado por que el péptido se acopla a un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente HLA (hemocianina de lapa americana).

13. Péptido según la reivindicación 11 o 12 para su utilización en la prevención y/o el tratamiento de las sinucleinopatías.

30 14. Formulación farmacéutica que comprende por lo menos un péptido según la reivindicación 11 o 12.

15. Formulación farmacéutica según la reivindicación 14 para su utilización como una vacuna.

Secuencia de la proteína alfa-sinucleína:

|            |            |            |            |                   |            |
|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|
| 10         | 20         | 30         | 40         | 50                | 60         |
| MDVFMKGLSK | AKEGVVAAAE | KTKQGVAAEA | GKTKEGVLYV | GSKTKEGVVH        | GVATVAEKT  |
| 70         | 80         | 90         | 100        | 110               | 120        |
| EQVTNVGGAV | VTGVTAVAQK | TVEGAGSIAA | ATGFVKKDQL | <u>GKNEEGAPQE</u> | GILEDMPVDP |
| 130        | 140        |            |            |                   |            |
| DNEAYEMPSE | EGYQDYEPEA |            |            |                   |            |

Fig. 1

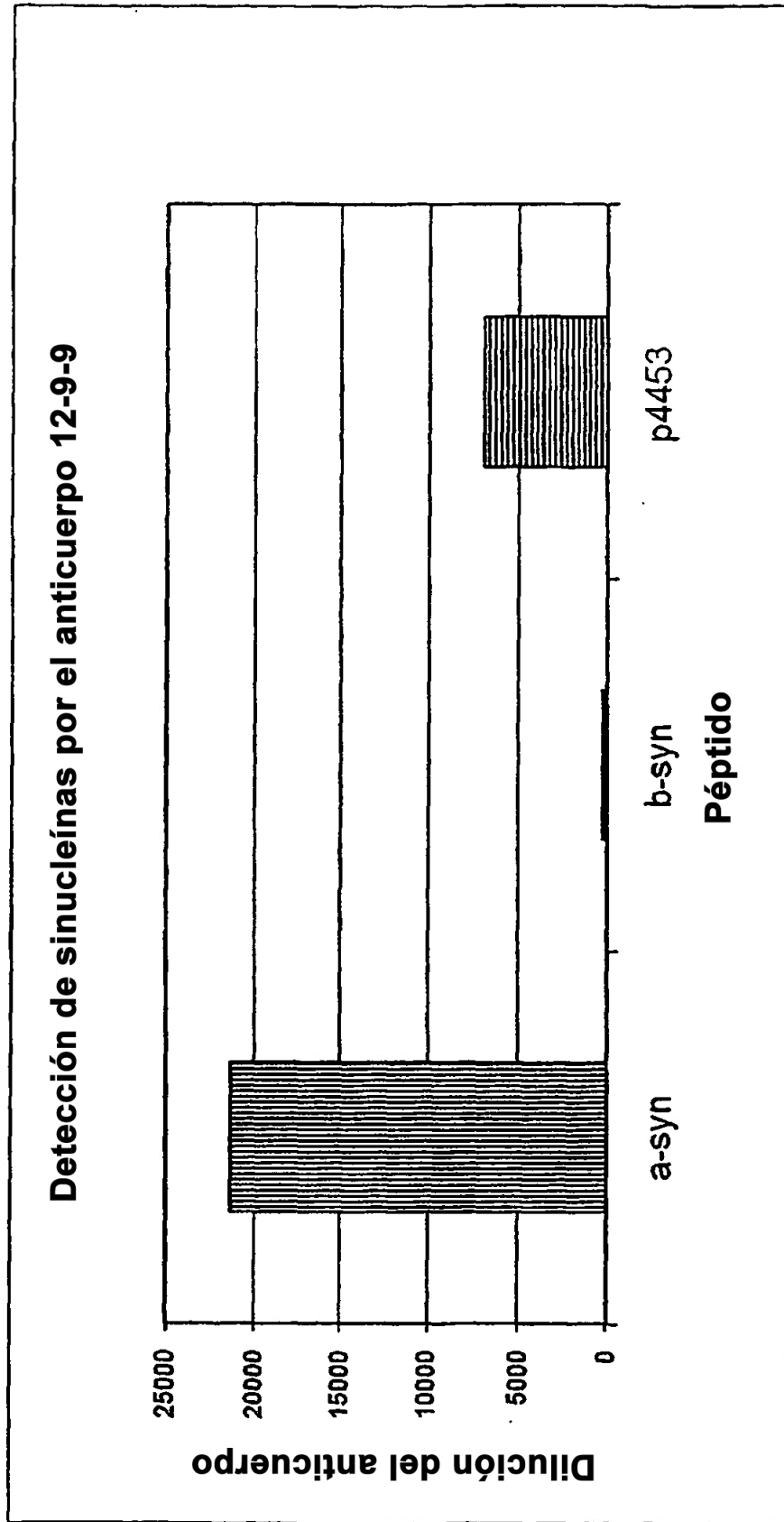


Fig. 2

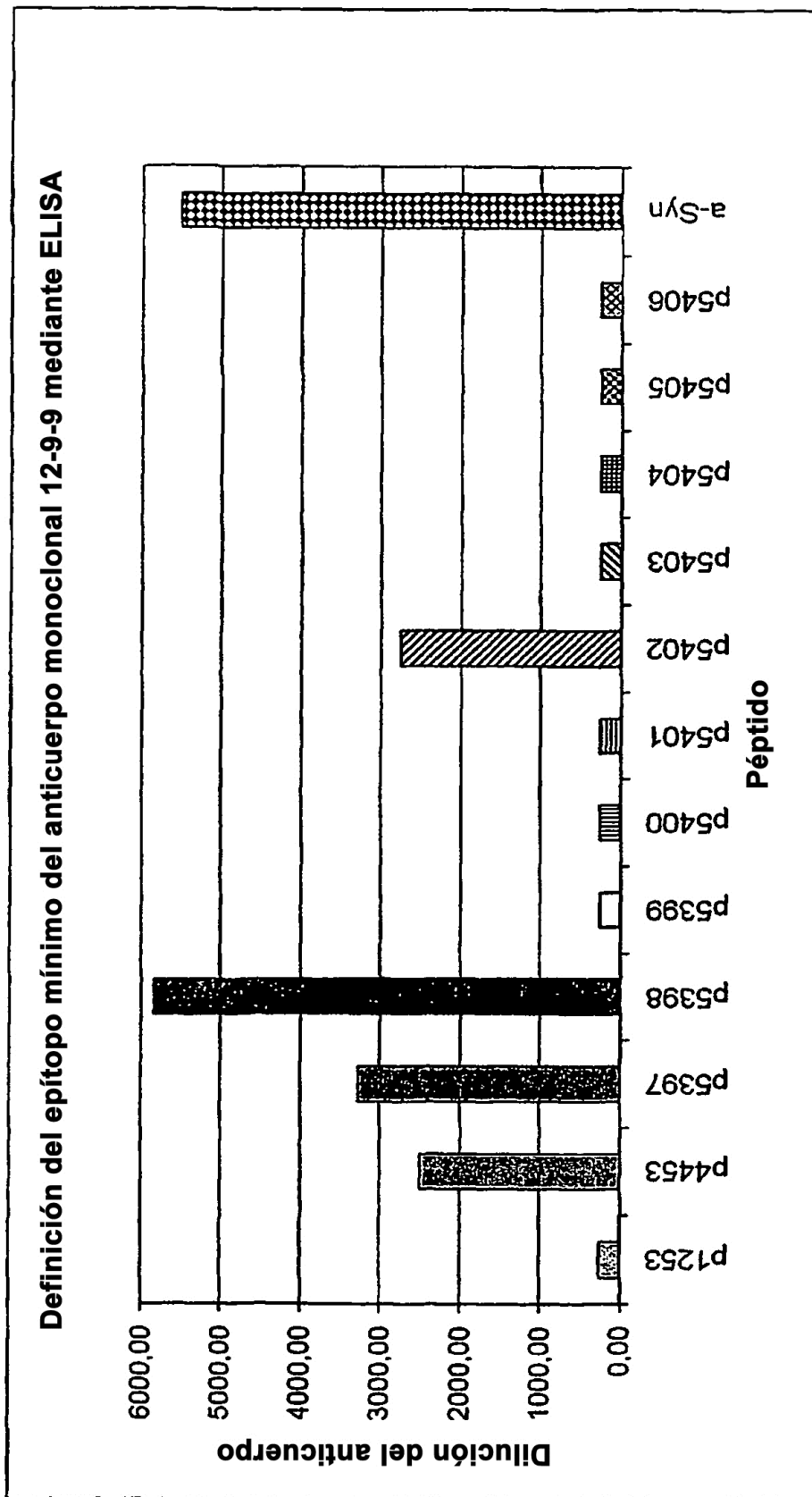


Fig. 3

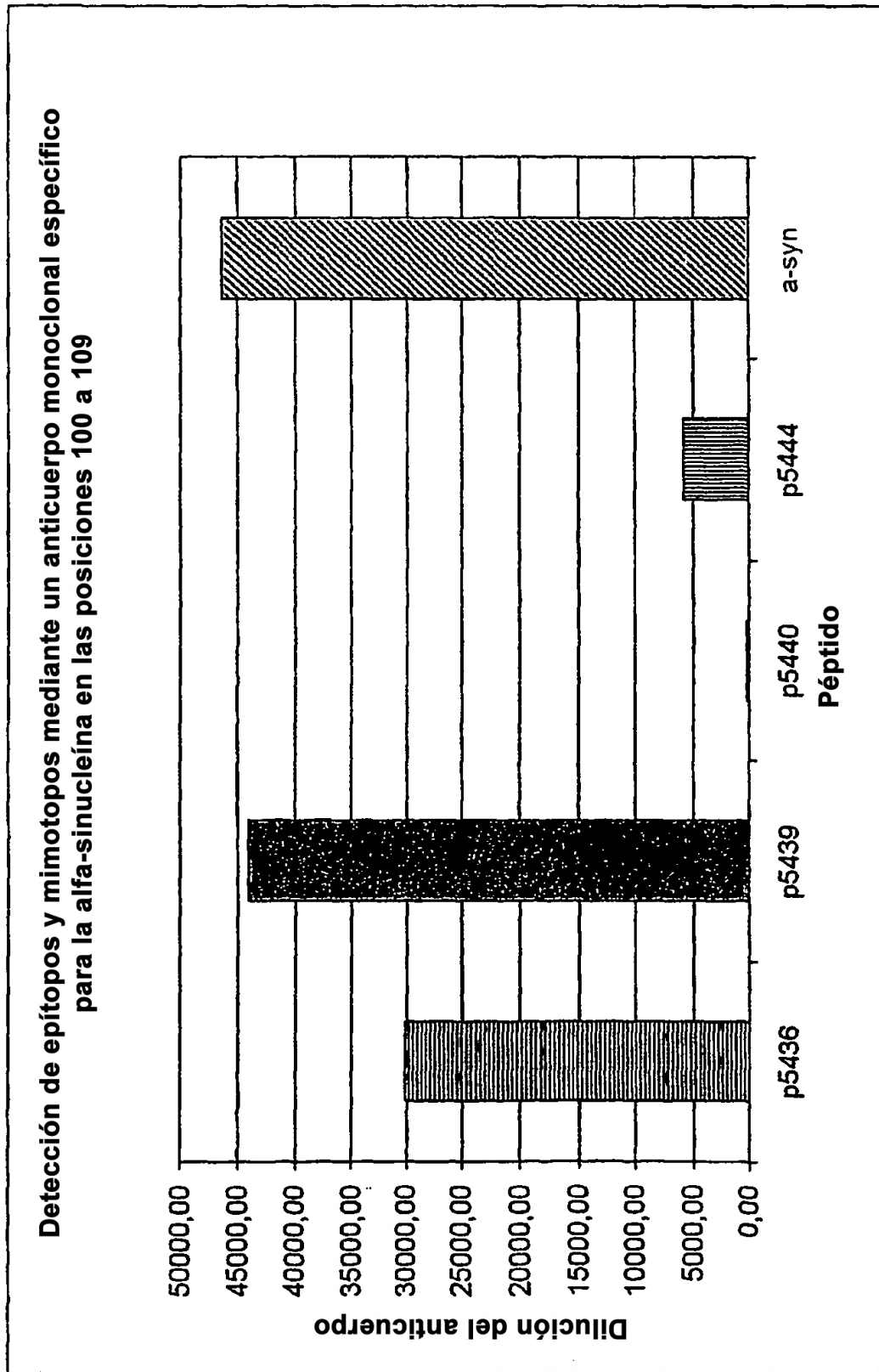


Fig. 4

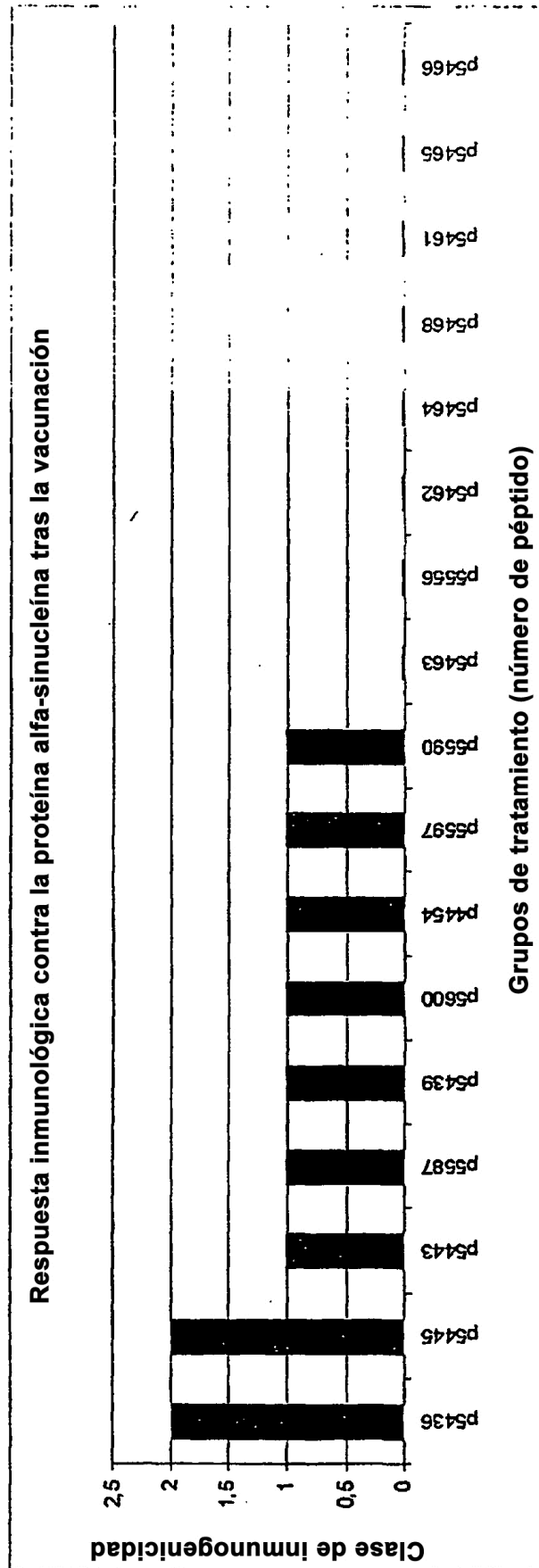


Fig. 5