

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 904**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2014 PCT/EP2014/074840**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075011**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2014 E 14799764 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3071597**

54 Título: **Anticuerpos anti-alfa-sinucleína y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

21.11.2013 EP 13193892

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

28.04.2021

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

BRITSCHGI, MARKUS;

HUBER, SYLWIA;

KALUZA, KLAUS;

KREMER, THOMAS y

MUNDIGL, OLAF

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 821 904 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 anti-alfa-sinucleína y procedimientos de uso

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana y a procedimientos de uso de los mismos.

10 ANTECEDENTES

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas (DA) del sistema nigroestriatal y por la presencia de cuerpos y neuritas (NL) de Lewy (CL), inclusiones intraneuronales proteínicas compuestas principalmente de agregados de alfa-sinucleína filamentosos. La alfa-sinucleína es una proteína que en el cerebro desempeña un papel principal en el control de las funciones neuronales dopaminérgicas y que se cree que está implicada fundamentalmente en la fisiopatología de la EP. De hecho, además del hecho de que la alfa-sinucleína es el componente proteínico principal de los CL, estudios genéticos mostraron que determinadas mutaciones puntuales en y multiplicaciones del gen de la alfa-sinucleína provocan formas familiares de EP. Una gran cantidad de pruebas indica que la patología de alfa-sinucleína en sinapsis dopaminérgicas puede subyacer a la aparición de disfunción y degeneración de células neuronales en el cerebro con EP (Bellucci, A., *et al.*, Brain Res. 1432 (2012) 95-113).

Los cuerpos de Lewy, que son depósitos de alfa-sinucleína, son el signo patológico de la enfermedad de Parkinson (EP) (Goedert, M., Nat. Rev. Neurosci 2 (2001) 492-501). Se informa de la estadificación de la patología cerebral relacionada con la EP esporádica ("Staging of brain pathology related to sporadic PD") por Braak *et al.* (Neurobiology of aging 24 (2003) 197-211).

Los agregados fibrilares de alfa-sinucleína son el componente principal de los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy. El trabajo científico reciente sugiere que los oligómeros prefibrilares de alfa-sinucleína pueden ser contribuyentes clave en la progresión de la enfermedad de Parkinson (Luk, K.C., *et al.*, Science 338 (2012) 949-953; Auluck, P.K., *et al.*, Science 295 (2002) 865-868; Bodner, R.A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 4246-4251; Bucciantini, M., *et al.*, J. Biol. Chem. 279 (2004) 31374-31382; El-Agnaf, O.M., *et al.*, FASEB J. 20 (2006) 419-425; Kaye, R., *et al.*, Science 300 (2003) 486-489; Lashuel, H.A., *et al.*, J. Mol. Biol. 322 (2002) 1089-1102; Masliah, E., *et al.*, Science 287 (2000) 1265-1269).

Chai, Y-J., *et al.*, informan de que la forma oligomérica secretada de α -sinucleína afecta a múltiples etapas del tráfico de membrana ("The secreted oligomeric form of α -synuclein affects multiple steps of membrane trafficking", FEBS Lett. 587 (2013) 452-459). Se informa de exosomas de células BV-2 inducidos por alfa-sinucleína: importante mediador de la neurodegeneración en la EP ("Exosomes of BV-2 cells induced by alpha-synuclein: important mediator of neurodegeneration in PD" por Chang, C., *et al.*, Neurosci. Lett. 548 (2013) 190-195). Feng, R.L., *et al.* informan de que alfa-sinucleína media en las alteraciones en la conductancia de membrana: un papel potencial de los oligómeros de alfa-sinucleína en la vulnerabilidad celular ("Alpha-synuclein mediates alterations in membrane conductance: a potential role for alpha-synuclein oligomers in cell vulnerability", Eur. J. Neurosci. 32 (2010) 10-17). Lee, H-J., *et al.* informan de que el fallo autofágico promueve la exocitosis y la transferencia intercelular de alfa-sinucleína ("Autophagic failure promotes the exocytosis and intercellular transfer of alpha-synuclein", Exp. Mol. Med. 45 (2013) e22). Se informa de la patología sináptica de la agregación de alfa-sinucleína en la demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson y la demencia de la enfermedad de Parkinson ("The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's Disease and Parkinson's Disease Dementia") por Schulz-Schaeffer, W.J. (Acta Neuropathol. 120 (2010) 131-143).

La gran mayoría de la alfa-sinucleína en el cerebro humano está acetilada de forma N terminal (Kellie, J.F., *et al.*, Sci. Rep. 4 (2014) 5797) y esta acetilación N terminal inhibe a la alfa-sinucleína de agregación (Bartels, T., *et al.*, PLoS One 9 (2014) e103727).

Se ha informado de diferentes formas oligoméricas de alfa-sinucleína recombinante: oligómeros de tipo A (citotóxicos, efecto sobre la entrada de Ca^{2+}), oligómeros de tipo C (especies de siembra de agregados), fibrillas mezcladas con lípidos (siembra la agregación de agregados intracelulares), triple prolinea (TP) mutante A30P/A56P/A76P (forma predominantemente oligómeros tóxicos) (véanse, por ejemplo, Danzer, K.M., *et al.*, J. Neurosci. 27 (2007) 9220-9232; Danzer, K.M., *et al.* J. Neurochem. 111 (2009) 192-203; Luk, C.K., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (2009) 20051-20056; Desplats, P., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (2009) 13010-13015; Karpinar, D.P., *et al.*, EMBO J. 28 (2009) 3256-3268; Lee, H-J., *et al.*, J. Biol. Chem. 285 (2010) 9262-9272; Hansen, C., *et al.*, J. Clin. Invest. 121 (2011) 715-725).

Se informa de que la transmisión patológica de alfa-sinucleína inicia una neurodegeneración similar a Parkinson en ratones no transgénicos ("Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in non-transgenic mice") por Luk, K.C., *et al.* (Science 338 (2012) 949-953). Se informa de que la siembra inducida

por oligómeros de alfa-sinucleína proporciona pruebas de la propagación de la patología de alfa-sinucleína ("Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology") y de la transmisión de célula a célula exosómica de oligómeros de alfa-sinucleína ("Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers") por Danzer, K.M., *et al.* (J. Neurochem. 111 (2009) 192-203; Mol. Neurodegen. 7 (2012) 42). Braidy *et al.* informan de la transmisión de alfa-sinucleína y la toxicidad mitocondrial en neuronas entéricas fetales humanas primarias *in vitro* ("Alpha-synuclein transmission and mitochondrial toxicity in primary human foetal enteric neurons in vitro", Neurotox. Res. (2013) ePub el 5 de octubre, 2013). Desplats, P., *et al.* informan de la formación de inclusiones y muerte celular neuronal a través de transmisión de neurona a neurona de alfa-sinucleína ("Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (2009) 13010-13015). Se informa de que la transferencia directa de alfa-sinucleína de neurona a astrogliá provoca respuestas inflamatorias en sinucleinopatías ("Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies") por Lee *et al.* (J. Biol. Chem. 285 (2010) 9262-9272). Lee, S-J., *et al.* informan de la transmisión de célula a célula de agregados de alfa-sinucleína ("Cell-to-cell transmission of alpha-synuclein aggregates", Meth. Mol. Biol. 849 (2012) 347-359; Nat. Rev. Neurol. 6 (2010) 702-706). Las pruebas probablemente más fuertes de una progresión de la patología de alfa-sinucleína por una posible transmisión de una semilla de agregación de alfa-sinucleína provienen de la autopsia de cerebros de determinados pacientes con EP que presentaron patología de Lewy en neuronas fetales que se injertaron en su cerebro 11-16 años antes (Li, J-Y., *et al.*, Nat. Med. 14 (2008) 501-503).

La alfa-sinucleína agregada media en la neurotoxicidad dopaminérgica *in vivo* (Periquet, M., *et al.*, J. Neurosci. 27 (2007) 3338-3346). Pieri, L., *et al.* informan de que los ensamblajes de alfa-sinucleína y exón 1 de huntingtina fibrilares son tóxicos para las células ("Fibrillar alpha-synuclein and huntingtin exon 1 assemblies are toxic to the cells", Biophys. J. 102 (2012) 2894-2905). Van Rooijen *et al.* informan de la permeabilización de membrana por alfa-sinucleína oligomérica: en busca del mecanismo ("Membrane permeabilization by oligomeric alpha-synuclein: in search of the mechanism", PLoS One 5 (2010) e14292).

Muy recientemente, Wagner *et al.* demostraron en ensayos celulares y en un modelo de ratón transgénico para alfa-sinucleína que la molécula pequeña Anle138b actúa como un modulador de oligómero de alfa-sinucleína protector lo que puede ser útil para el tratamiento modificador de enfermedad de la enfermedad de Parkinson (Wagner, J, *et al.*, Acta Neuropathol. 125 (2013) 795-813). Lynch, S.M., *et al.* informan de que un intracuerpo de scFv frente al componente no amiloide de alfa-sinucleína reduce la toxicidad y la agregación intracelular ("A scFv intrabody against the non-amyloid component of alpha-synuclein reduces intracellular aggregation and toxicity", J. Mol. Biol. 377 (2008) 136-147). Se informa de una estrategia para diseñar inhibidores de toxicidad y agregación de alfa-sinucleína como tratamiento novedoso para la enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados ("A strategy for designing inhibitors of alpha-synuclein aggregation and toxicity as a novel treatment for Parkinson's Disease and related disorders") por El-Agnaf, O.M., *et al.* (FASEB J. (2004)). Emadi, S., *et al.* informan de la inhibición de la agregación de alfa-sinucleína con fragmentos de anticuerpos monocatenarios humanos ("Inhibiting aggregation of alpha-synuclein with human single chain antibody fragments") y del aislamiento de un fragmento de anticuerpo monocatenario humano frente a alfa-sinucleína oligomérica que inhibe la agregación y previene la toxicidad inducida por alfa-sinucleína ("Isolation of a human single chain antibody fragment against oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity") (Biochem. 43 (2004) 2871-2878; J. Mol. Biol. 368 (2007) 1132-1144). Smith *et al.* informan de efectos de la inmunoglobulina intravenosa sobre la agregación de alfa-sinucleína y la neurotoxicidad ("Effects of intravenous immunoglobulin on alpha-synuclein aggregation and neurotoxicity", Int. Immunopharmacol. 14 (2012) 550-557). Se informa de la selección de alfa-sinucleína intracelular y extracelular como estrategia terapéutica en la enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías ("Targeting intracellular and extracellular alpha-synuclein as a therapeutic strategy in Parkinson's Disease and other synucleinopathies") por Vekrelis, K. y Stefanis, L. (Expert. Opin. Ther. Targets 16 (2012) 421-432).

La eliminación asistida por anticuerpos de la sinucleinopatía cerebral en ratones transgénicos respectivos se demostró en un modelo de inmunización activa (Masliah, E., *et al.*, Neuron 46 (2005) 857-868) y pasiva (Masliah, E., *et al.*, PLoS One 6 (2011) e19338). Se informó de que la unión de alfa-sinucleína extracelular por anticuerpos específicos previene la transmisión de agregados de célula a célula ("Binding of extracellular alpha-synuclein by specific antibodies prevents cell-to-cell aggregate transmission") por Bae, E-J., *et al.* (J. Neurosci. 32 (2012) 13454-13469).

Se informa del uso de mimotopos de epítomos de alfa-sinucleína para tratar enfermedades por cuerpos de Lewy ("Use of mimotopes of alpha-synuclein epitopes for treating Lewy body diseases") en el documento WO 2011/020133. En el documento WO 2007/011907 se informa de anticuerpos de alfa-sinucleína y procedimientos relacionados con los mismos ("Alpha-synuclein antibodies and methods related thereto"). Se informa de que la fusión a una secuencia de reselección proteasómica altamente cargada incrementa la expresión citoplasmática soluble y la eficacia de diversos intracuerpos anti-sinucleína ("Fusion to a highly charged proteasomal retargeting sequence increases soluble cytoplasmic expression and efficacy of diverse anti-synuclein intrabodies") por Joshi *et al.* (MABS 4 (2012) 686-693). Emadi *et al.* (J. Mol. Biol. 368 (2007) 1132-1144) informan del aislamiento de un fragmento de anticuerpo monocatenario humano frente a alfa-sinucleína oligomérica que inhibe la agregación y previene la toxicidad inducida por alfa-sinucleína ("Isolation of a human single chain antibody fragment against

oligomeric alpha-synuclein that inhibits aggregation and prevents alpha-synuclein-induced toxicity"). Se informa de la detección de formas oligoméricas morfológicamente distintas de alfa-sinucleína ("Detecting of morphologically distinct oligomeric forms of alpha-synuclein") por Emadi *et al.* (J. Biol. Chem. 284 (2009) 11048-11058). Zhou *et al.* (Mol. Ther. 10 (2004) 1023-1031) informan de que un intracuerpo de Fv monocatenario humano bloquea los efectos celulares anómalos de la alfa-sinucleína sobreexpresada ("a human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein"). Se informa de que los anticuerpos frente a alfa-sinucleína reducen la oligomerización en células vivas ("Antibodies against alpha-synuclein reduce oligomerization in living cells") por Nasstrom *et al.* (PLoS One 6 (2011) e27230). Se informa de anticuerpos de unión a protofibrillas y su uso en procedimientos terapéuticos y diagnósticos para la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y otras alfa-sinucleinopatías ("Protofibril-binding antibodies and their use in therapeutic and diagnostic methods for Parkinson's Disease, dementia with Lewy bodies and other alpha-synucleinopathies") en el documento WO 2011/104696. Se informa del aislamiento de anticuerpos recombinantes frente a morfologías proteicas específicas usando microscopía de fuerza atómica y tecnologías de presentación en fagos ("Isolating recombinant antibodies against specific protein morphologies using atomic force microscopy and phage display technologies") por Barkhordarian *et al.* (Prot. Eng. Des. Select. 19 (2006) 497-502). Kvam *et al.* (PLoS One 4 (2009) e5727) informan de que la selección conformacional de proteínas de poliglutamina fibrilar en células vivas intensifica la agregación y citotoxicidad ("Conformational targeting of fibrillar polyglutamine proteins in live cells escalates aggregation and cytotoxicity").

El documento WO 2007/012061 informó de agentes y procedimientos para el tratamiento de enfermedades asociadas con enfermedades sinucleinopática, incluyendo cuerpos de Lewy de alfa-sinucleína en el cerebro de un paciente. Dichos procedimientos implican administrar agentes que inducen una respuesta inmunógena beneficiosa frente al cuerpo de Lewy. Los procedimientos son útiles en particular para el tratamiento profiláctico y terapéutico de la enfermedad de Parkinson.

Waxman, E.A., *et al.*, informó de la caracterización de anticuerpos que detectan selectivamente [alfa]-sinucleína en inclusiones patológicas ("Characterization of antibodies that selectively detect [alpha]-synuclein in pathological inclusions", Acta Neuropath. 116 (2008) 37-46). Syn 303 es un anticuerpo monoclonal contra alfa-sinucleína del isotipo humano IgG1 y reacciona con sinucleína humana, de ratón y de rata (por identidad de secuencia) y se ha producido contra la alfa-sinucleína oxidada.

El documento WO 2007/021255 informó de procedimientos para detectar alfa-sinucleína y también identificó epítopos preferentes de alfa sinucleína para su uso en dicha detección, y proporciona anticuerpos que se unen específicamente a dichos epítopos.

SUMARIO

La invención se define por las reivindicaciones.

La invención proporciona anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana y procedimientos de uso de los mismos.

El anti-alfa-sinucleína humana de la invención es un anticuerpo que comprende en la cadena pesada las HVR de SEQ ID NO: 21, 22 y 17 y en la cadena ligera las HVR de SEQ ID NO: 23 a 25.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo que se une específicamente a alfa-sinucleína humana en el que la alfa-sinucleína humana tiene un residuo de metionina N terminal libre.

El término "residuo de metionina N terminal libre" indica un residuo de metionina en un polipéptido que se localiza en el extremo N del polipéptido y que no se modifica excepto por el enlace amida con el que se conjuga con el resto del polipéptido. Un residuo de metionina N terminal libre de este tipo es en un modo de realización un residuo de metionina no modificado. Un residuo de metionina N terminal libre de este tipo tiene en un modo de realización un grupo amino libre. La alfa-sinucleína humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

En un modo de realización, el anticuerpo se une específicamente a la alfa-sinucleína humana y de ratón en la que la alfa-sinucleína humana y de ratón tienen un residuo de metionina N terminal libre.

En un modo de realización, la alfa-sinucleína es alfa-sinucleína monomérica.

En un modo de realización, la alfa-sinucleína es alfa-sinucleína monomérica y oligomérica.

El anticuerpo se ha obtenido humanizando un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 26 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 27.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado y comprende en el dominio variable de la cadena pesada las HVR de SEQ ID NO: 21, 22 y 17 y en el dominio variable de la cadena ligera las HVR de SEQ ID NO: 23 a 25.

El anticuerpo es un anticuerpo humanizado y el dominio variable de la cadena pesada se deriva de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 26 y el dominio variable de la cadena ligera se deriva de un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 27.

5 En un modo de realización de todos los aspectos previos, el anticuerpo se conjuga con un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica.

10 En un modo de realización, el módulo lanzadera de barrera hematoencefálica es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a LRP1, LRP8, receptor de transferrina humana o receptor del factor de crecimiento insulínico humano.

En un modo de realización de todos los aspectos previos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

15 En un modo de realización de todos los aspectos previos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En un modo de realización de todos los aspectos previos, el anticuerpo es

20 a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1, o

b) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4, o

25 c) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G,

d) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G,

30 e) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva, o

35 f) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, caracterizado por que

40 a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que

i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 17,

45 ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal puede estar presente o ausente, y

iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,

50 b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

55 ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, caracterizado por que

60 a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo comprendiendo cada una en sentido N a C terminal un dominio variable de la cadena pesada, una región constante de la cadena pesada, un conector peptídico y un fragmento de anticuerpo scFab o scFv, que se une específicamente al receptor de transferrina humana, en el que

65 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 17,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal puede estar presente o ausente, y

5 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,

b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

10 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana.

15 Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, caracterizado por que

a) el anticuerpo comprende una primera cadena pesada de anticuerpo que comprende en sentido N a C terminal un dominio variable de la cadena pesada, una región constante de la cadena pesada, un conector peptídico y un fragmento de anticuerpo scFab o scFv, que se une específicamente al receptor de transferrina humana, en el que

20 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 17,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal puede estar presente o ausente,

25 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G, y

iv) la región constante comprende los cambios aminoacídicos T366W y S354C o bien los cambios aminoacídicos T366S, L368A, Y407V e Y349C,

30 b) el anticuerpo comprende una segunda cadena pesada de anticuerpo que comprende en sentido N a C terminal un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que

35 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 17,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal puede estar presente o ausente,

40 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G, y

iv) la región constante comprende los cambios aminoacídicos T366W y S354C si la primera cadena pesada de anticuerpo comprende los cambios aminoacídicos T366S, L368A, Y407V e Y349C o la región constante comprende los cambios aminoacídicos T366S, L368A, Y407V e Y349C si la primera cadena pesada de anticuerpo comprende los cambios aminoacídicos T366W y S354C,

45 c) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

50 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana.

55 En un modo de realización, el fragmento de anticuerpo, que se une específicamente al receptor de transferrina humana, comprende un dominio variable de la cadena pesada que es una forma humanizada del dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 56 y un dominio variable de la cadena ligera que es una forma humanizada del dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 57.

60 En un modo de realización de todos los aspectos previos, el anticuerpo

i) inhibe la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neuroglíocitos humanos, y/o

65 ii) inhibe la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, y/o

iii) reduce la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en células neuronales humanas, y/o

- iv) se une específicamente a alfa-sinucleína que tiene un residuo de metionina N terminal libre y no se une específicamente a alfa-sinucleína que tiene un residuo de metionina N terminal modificado.
- 5 En un modo de realización de todos los aspectos y modos de realización, la célula neuronal humana es una línea celular derivada de mesencéfalo humano que sobreexpresa v-myc controlada por tetraciclina. En un modo de realización de todos los aspectos y modos de realización, las células neuronales humanas son células mesencefálicas humanas de Lund (LUHMES).
- 10 En un modo de realización, la actividad caspasa es la actividad caspasa 3 y/o caspasa 7.
- En un modo de realización, el anticuerpo es para su uso en el tratamiento de sinucleinopatías.
- En un modo de realización, el anticuerpo es para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 15 En un modo de realización, el anticuerpo tiene una función efectora inactiva. En un modo de realización, el anticuerpo no tiene función efectora.
- En un modo de realización, el anticuerpo tiene una afinidad de unión por alfa-sinucleína humana monomérica de menos de 10^{-09} M y más de 10^{-07} M.
- 20 En un modo de realización, el anticuerpo se une específicamente a alfa-sinucleína humana monomérica y oligomérica.
- 25 En un modo de realización, el anticuerpo se une específicamente a alfa-sinucleína humana fibrilar y no se une a la alfa-sinucleína humana no fibrilar
- En un modo de realización, el anticuerpo se conjuga con un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica.
- 30 En un modo de realización, el módulo lanzadera de barrera hematoencefálica es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a LRP1, LRP8, receptor de transferrina humana o receptor del factor de crecimiento insulínico humano.
- En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 35 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.
- En un modo de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a la alfa-sinucleína humana e
- 40 i) inhibe la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neuroglíocitos humanos, y/o
- ii) inhibe la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, y/o
- 45 iii) reduce la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en células neuronales humanas.
- En un modo de realización, el anticuerpo es
- 50 a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1, o
- b) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4, o
- c) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G,
- 55 d) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G,
- e) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva, o
- 60 f) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva.
- 65 Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, caracterizado por que

a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que

5 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 17,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal puede estar presente o ausente, y

10 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,

b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

15 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,

20 y

c) el anticuerpo

i) inhibe la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neuroglíocitos humanos, y/o

25 ii) inhibe la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, y/o

30 iii) reduce la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en células neuronales humanas.

Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, caracterizado por que

35 a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo comprendiendo cada una en sentido N a C terminal un dominio variable de la cadena pesada, una región constante de la cadena pesada, un conector peptídico y un fragmento de anticuerpo scFab o scFv, que se une específicamente al receptor de transferrina humana, en el que

40 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 17,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal puede estar presente o ausente, y

45 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,

b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

50 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,

55 y

c) el anticuerpo

i) inhibe la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neuroglíocitos humanos, y/o

60 ii) inhibe la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, y/o

iii) reduce la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en células neuronales humanas.

65 Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, caracterizado por que

a) el anticuerpo comprende una primera cadena pesada de anticuerpo que comprende en sentido N a C terminal un dominio variable de la cadena pesada, una región constante de la cadena pesada, un conector peptídico y un fragmento de anticuerpo scFab o scFv, que se une específicamente al receptor de transferrina humana, en el que

i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 17,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal puede estar presente o ausente,

iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G, y

iv) la región constante comprende los cambios aminoacídicos T366W y S354C o bien los cambios aminoacídicos T366S, L368A, Y407V e Y349C,

b) el anticuerpo comprende una segunda cadena pesada de anticuerpo que comprende en sentido N a C terminal un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que

i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 17,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal puede estar presente o ausente,

iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G, y

iv) la región constante comprende los cambios aminoacídicos T366W y S354C si la primera cadena pesada de anticuerpo comprende los cambios aminoacídicos T366S, L368A, Y407V e Y349C o la región constante comprende los cambios aminoacídicos T366S, L368A, Y407V e Y349C si la primera cadena pesada de anticuerpo comprende los cambios aminoacídicos T366W y S354C,

c) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,

y

d) el anticuerpo

i) inhibe la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neurogliocitos humanos, y/o

ii) inhibe la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neurogliocitos, y/o

iii) reduce la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en células neuronales humanas.

En un modo de realización, el fragmento de anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que es una forma humanizada del dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 56 y un dominio variable de la cadena ligera que es una forma humanizada del dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 57.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo como se informa en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un modo de realización, la formulación farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el anticuerpo como se informa en el presente documento para su uso como medicamento.

Un aspecto como se informa en el presente documento es el anticuerpo como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

En un modo de realización, el medicamento es para inhibir la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neuroglíocitos humanos.

5 En un modo de realización, el medicamento es para inhibir la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos.

En un modo de realización, el medicamento es para reducir la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en células neuronales o neuroglíocitos.

10 Los anticuerpos como se informa en el presente documento se pueden usar en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Sin quedar vinculado a esta teoría, los anticuerpos inhiben la propagación de alfa-sinucleína oligomérica tóxica, o inhiben la absorción de alfa-sinucleína oligomérica tóxica por neuronas y neuroglíocitos, o reducen la neuroinflamación.

15 Con los anticuerpos como se informa en el presente documento se puede ver afectada la inhibición/reducción de la progresión de la sinucleinopatía y neuropatología.

Los anticuerpos como se informa en el presente documento se pueden usar para proteger frente al desarrollo de la enfermedad de Parkinson o incluso usar para detener la progresión de la enfermedad de Parkinson.

20 En un modo de realización, el anticuerpo como se informa en el presente documento i) se une a alfa-sinucleína en cortes cerebrales de ratones transgénicos para alfa-sinucleína y pacientes con enfermedad de Parkinson; y/o marcadores para alfa-sinucleína en células LUHMES.

25 Los anticuerpos como se informa en el presente documento se pueden usar para el tratamiento de una sinucleinopatía. Algunas sinucleinopatías son neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral de tipo 1 (NBIA1), fallo autonómico puro, síndrome de Down, complejo de Guam y varios trastornos por cuerpos de Lewy, tales como enfermedad difusa por cuerpos de Lewy (EDCL), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (vCLEA), determinadas formas de enfermedad de Gaucher y demencia de la enfermedad de Parkinson (DEP).

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **Figura 1:** especificidad de unión dependiente de la concentración del anticuerpo anti-alfa-sinucleína 0017; carril: 1) preparación de alfa-sinucleína fibrilar, 2) oligómeros de alfa-sinucleína mutante triple-prolina, 3) oligómeros de alfa-sinucleína de tipo A, 4) oligómeros de alfa-sinucleína de tipo C.

40 **Figura 2:** especificidad de unión dependiente de la concentración del anticuerpo anti-alfa-sinucleína 0018; carril: 1) preparación de alfa-sinucleína fibrilar, 2) oligómeros de alfa-sinucleína mutante triple-prolina, 3) oligómeros de alfa-sinucleína de tipo A, 4) oligómeros de alfa-sinucleína de tipo C.

45 **Figura 3:** especificidad de unión dependiente de la concentración del anticuerpo anti-alfa-sinucleína 0081; carril: 1) preparación de alfa-sinucleína fibrilar, 2) oligómeros de alfa-sinucleína mutante triple-prolina, 3) oligómeros de alfa-sinucleína de tipo A, 4) oligómeros de alfa-sinucleína de tipo C.

Figura 4: tinción de alfa-sinucleína en el tronco encefálico de un ratón transgénico para alfa-sinucleína [A30P]; cortes cerebrales sagitales de 10 µm recién congelados; 40 aumentos; todas las imágenes en condiciones de iluminación idénticas; las puntas de flecha indican inclusiones similares a neuritas de Lewy.

50 **Figura 5:** tinción de los anticuerpos 0017 y 0018 en la corteza cerebral humana de un paciente con enfermedad de Parkinson (A), un paciente con enfermedad de Alzheimer con enfermedad de Parkinson concomitante (B) y parálisis supranuclear progresiva (PSP, tauopatía) (C); flecha: inclusiones similares a cuerpos de Lewy; punta de flecha: inclusiones similares a neuritas de Lewy.

55 **Figura 6:** marcaje de la patología de alfa-sinucleína cerebral en ratones transgénicos A30P mutantes de alfa-sinucleína tras inyección periférica aguda de mAb específicos (2x60 mg/kg de anticuerpo o PBS durante 5 d) en ratones transgénicos A30P mutantes de alfa-sinucleína de 15 meses; se tiñeron cortes cerebrales sagitales de 20 µm recién congelados con conjugado anticuerpo anti-IgG1 murina-AF555 o con el conjugado anticuerpo anti-IgG1 murina-AF555 y el respectivo anticuerpo anti-alfa-sinucleína; 40 aumentos de la región del tronco encefálico; todas las imágenes con iluminación comparable; flecha: inclusiones similares a cuerpos de Lewy; punta de flecha: inclusiones similares a neuritas de Lewy.

60 **Figura 7:** toxicidad celular de medios acondicionados de alfa-sinucleína recombinante de células SHSY5Y en células LUHMES; (A) anticuerpo 0017; (B) anticuerpo 0018; (C) anticuerpo 12F4 (referencia).

65 **Figura 8:** tratamiento de células LUHMES con medios acondicionados de células SHSY5Y que expresan alfa-

sinucleína de forma recombinante; tratamiento de 3 días en células LUHMES recién plaqueadas con a) medio de control = medio de diferenciación para células LUHMES y b) medio acondicionado = medio de diferenciación LUHMES obtenido después de 6 días de células SHSY5Y que expresan alfa-sinucleína de forma recombinante.

5 **Figura 9:** los anticuerpos 0017 y 0018 pueden inmunoagotar los oligómeros de alfa-sinucleína de medios extracelulares y de este modo estos anticuerpos reducen la toxicidad de los oligómeros de alfa-sinucleína.

Figura 10: datos brutos de la transición de fusión (círculos blancos, 40 °C-valores más altos) y ajustes correspondientes (líneas continuas) como se determina de acuerdo con el ejemplo 11.

10 **Figura 11:** marcaje de la patología, vasculatura y parénquima de alfa-sinucleína cerebral en ratones transgénicos A30P mutantes de alfa-sinucleína tras inyección periférica aguda de un conjugado anticuerpo anti-alfa sinucleína-módulo lanzadera de barrera hematoencefálica.

15 **Figura 12:** análisis de microscopía confocal de criocortes analizados inmunohistoquímicamente de cortes cerebrales de paciente con enfermedad de Parkinson (configuración idéntica para todas las imágenes): (A) anticuerpo 0017, (B) anticuerpo 0018, (C) anticuerpo de referencia 12F4.

20 **Figura 13:** cartografía de epítomos por CelluSpots™ del anticuerpo 0018.

Figura 14: unión de alfa-sinucleína monomérica (N terminal libre (1) y con marca His N terminal (2)) y dimérica (3) al anticuerpo 0018. Los resultados mostrados son una valoración de 5 concentraciones.

1: monómero, extremo N libre, 4,2 mg/ml, nunca descongelado;

25 2: monómero, extremo N con marca His, 4,8 mg/ml;

3: dímero, extremo N libre, 1,6 mg/ml.

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES

Una "región estructural humana aceptora" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios aminoacídicos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región estructural consenso humana.

45 "Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar en general por la constante de disociación (Kd). Se puede medir la afinidad por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen en lo que sigue.

55 Un anticuerpo "madurado en afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Los términos "anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana" y "un anticuerpo que se une a alfa-sinucleína humana" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a alfa-sinucleína humana con afinidad suficiente de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a alfa-sinucleína humana. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana a una proteína alfa-sinucleína no humana no relacionada es menor de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a alfa-sinucleína humana como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoanálisis (RIA).

65 El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos

multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

5 Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

10 Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que tiene interacciones de unión con los mismos residuos que el anticuerpo de referencia en el antígeno. La interacción de unión se puede determinar usando resonancia de plasmón superficial y antígeno mutado o análisis de estructura de rayos X del complejo anticuerpo-antígeno.

15 El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

20 La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

25 Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con la clase de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

30 Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

35 El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) y a veces el dipéptido lisina-glicina C terminal (Gly446Lys447) de la región Fc pueden o no estar presentes. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

45 La "región estructural" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

50 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

55 Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas" que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

65 Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos aminoacídicos que aparecen más comúnmente en una selección de secuencias estructurales de VL o VH de inmunoglobulina

humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, vol. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos aminoacídicos de HVR no humanas y residuos aminoacídicos de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos de contacto con antígeno ("contactos con antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3).

Las HVR en el presente documento incluyen

(a) los bucles hipervariables que se producen en los residuos aminoacídicos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);

(b) las CDR que se producen en los residuos aminoacídicos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), publicación NIH 91-3242.);

(c) los contactos con antígeno que se producen en los residuos aminoacídicos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)); y

(d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluyendo los residuos aminoacídicos de HVR46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos del dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas tales como un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domésticos (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o 99 % de pureza como se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para la evaluación de la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman, S. *et al.*, J. Chromatogr. B848 (2007) 79-87.

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes,

por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes en general en cantidades insignificantes. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiera la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

"Anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se unen con disulfuro. Del extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, del extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos aminoacídicos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa de ordenador ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación.

5 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

10 El término "alfa-sinucleína humana", como se usa en el presente documento, se refiere a alfa-sinucleína humana natural (UniProt P37840). El término engloba alfa-sinucleína humana no procesada "de longitud completa" así como cualquier forma de alfa-sinucleína humana que resulta del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de alfa-sinucleína humana, por ejemplo, mutantes, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de alfa-sinucleína humana se muestra en SEQ ID NO: 40.

15 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

25 El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen en general estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt, T.J. *et al.*, Kuby Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véanse, por ejemplo, Portolano, S. *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).

35 El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan de forma funcional. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

40

II. COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el hallazgo de que los anticuerpos como se informa en el presente documento se pueden usar para reducir/eliminar la toxicidad inducida por alfa-sinucleína en células neuronales y neuroglíocitos en el cerebro. En determinados aspectos, se proporcionan anticuerpos que se unen a alfa-sinucleína humana. Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de sinucleinopatía y neuropatía, en especial enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer con enfermedad de Parkinson concomitante.

50 A. Anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana ejemplares

Los anticuerpos como se informa en el presente documento se han obtenido aplicando una metodología de inmunización deliberada y selección intencional de anticuerpos con propiedades de unión específicas.

55 Al principio, se han inmunizado conejos con una mezcla de diversos conjuntos y agregados de alfa-sinucleína recombinante. Los clones de linfocitos B aislados se han caracterizado por ELISA y se han seleccionado los mejores aglutinantes. En la siguiente etapa, los anticuerpos se han caracterizado por cartografía de epitopos usando la metodología de matriz peptídica y por determinación de su selectividad hacia alfa-sinucleína recombinante monomérica y oligomérica, por ejemplo, usando inmunoelectrotransferencia. También se ha determinado la unión de los anticuerpos a alfa-sinucleína recombinante y alfa-sinucleína fisiológica en células neuronales humanas y a alfa-sinucleína patológica en cortes cerebrales de ratones transgénicos para alfa-sinucleína humana y pacientes con enfermedad de Parkinson. En base a los datos explicados anteriormente, se seleccionaron los candidatos y se ha determinado la unión *in vivo* aguda a alfa-sinucleína patológica después de inyección periférica. Los aglutinantes más eficaces se seleccionaron después de esto. Con el aglutinante más eficaz seleccionado, se determinará la eliminación de la patología de alfa-sinucleína y/o la detención de la progresión de la patología de alfa-sinucleína en ratones transgénicos Thy1-(A30P) α SYN.

65

El anticuerpo 0017 tiene un amplio perfil de unión específica de alfa-sinucleína, es decir, este anticuerpo se une a alfa-sinucleína humana monomérica y agregada (oligomérica). En la figura 1 se muestra la unión dependiente de la concentración del anticuerpo 0017 hacia formas monoméricas y múltiples agregadas de alfa-sinucleína humana.

5 El anticuerpo 0017 es un anticuerpo quimérico con dominios variables de un anticuerpo de conejo 233 seleccionado por el procedimiento como se explica anteriormente y regiones constantes murinas.

Un anticuerpo preferente es el anticuerpo 0018. Este anticuerpo tiene un perfil de unión dependiente de la agregación de alfa-sinucleína, es decir, este anticuerpo se une a alfa-sinucleína humana monomérica, dimérica y oligomérica, con lo que la unión a alfa-sinucleína monomérica humana y de ratón disminuye si se modifica el residuo de metionina N terminal, por ejemplo, por acetilación o biotilación, o está ausente. En la figura 2 se muestra la unión dependiente de la concentración del anticuerpo 0018 hacia formas agregadas de forma diferente de alfa-sinucleína humana. El carácter de unión a oligómero se hace evidente por debajo de la concentración de anticuerpo de 0,5 µg/ml. El anticuerpo 0018 es un anticuerpo quimérico con dominios variables de un anticuerpo de conejo 064 seleccionado por el procedimiento como se explica anteriormente y regiones constantes murinas.

10

15

Tras usar péptidos modificados de forma N terminal para la determinación del sitio de unión del anticuerpo 0018 en alfa-sinucleína humana, no se pudo detectar ninguna unión. Por lo tanto, el análisis de epítomos del anticuerpo 0018 se llevó a cabo por medio de una colección de fragmentos peptídicos inmovilizados coincidentes (longitud: 15 aminoácidos, desplazamiento: 1 aminoácido) correspondientes a las secuencias del péptido de α -sinucleína (1-140), β -sinucleína (60-134), γ -sinucleína (60-127) y α -sinucleína N-acetilada (1-15), y empleando un procedimiento de detección basado en ELISA (véase el ejemplo 14 y la figura 13).

20

Se ha descubierto que el anticuerpo 0018 se une a un péptido de alfa-sinucleína monomérico corto (15 aminoácidos de longitud) presentado en la matriz peptídica. El anticuerpo 0018 reconoce un epítopo en el extremo más N de la alfa-sinucleína. El aminoácido metionina N terminal (M, MET) es esencial para la unión, ya que retirar (o bloquear) la misma elimina completamente la unión del anticuerpo 0018. Además, cuando el residuo aminoacídico metionina N terminal se tapa por N-acetilación, no se puede observar ninguna unión. Esto se confirma por análisis de resonancia de plasmón superficial (véase la figura 14).

25

30

El anticuerpo anti-alfa sinucleína 0081 muestra un patrón de reactividad dependiente de la dosis que recuerda al anticuerpo 0018 con igual reducción de inmunorreactividad para todas las formas de alfa-sinucleína en la transferencia (figura 3).

35

En la figura 4 se muestra el diferente comportamiento de tinción de los anticuerpos 0017 y 0018 y el anticuerpo de referencia 12F4 en cortes cerebrales sagitales de ratón transgénico A30P mutante de alfa-sinucleína.

En la figura 5 se muestra el diferente comportamiento de tinción de los anticuerpos 0017 y 0018 en corteza cerebral humana de un paciente con enfermedad de Parkinson (A), un paciente con enfermedad de Alzheimer con enfermedad de Parkinson concomitante (B) y parálisis supranuclear progresiva (C). La aplicación del anticuerpo 0017 dio como resultado una tinción parenquimatosa difusa, así como de cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy. El anticuerpo 0018 muestra una tinción parenquimatosa más débil y principalmente tiñe cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy. Por lo tanto, los anticuerpos 0017 y 0018 muestran un patrón de tinción diferente para agregados de alfa-sinucleína en cortes cerebrales de pacientes con enfermedad de Parkinson.

40

45

En la figura 6 se muestra el marcaje de la patología de alfa-sinucleína cerebral en ratones transgénicos A30P mutantes de alfa-sinucleína tras la inyección periférica aguda de mAb específicos. Se aplicó anticuerpo anti-alfa sinucleína (2x60 mg/kg durante 5 d) o PBS a ratones transgénicos A30P mutantes de alfa-sinucleína de 15 meses. Se tiñeron cortes cerebrales sagitales de 20 µm recién congelados con conjugado anticuerpo anti-IgG1 murina-AF555 o con el conjugado anticuerpo anti-IgG1 murina-AF555 y el respectivo anticuerpo anti-alfa-sinucleína.

50

De la figura 7 se puede observar que los anticuerpos 0017 y 0018 pueden inmunoagotar los oligómeros de alfa-sinucleína de medios extracelulares y de este modo estos anticuerpos reducen la toxicidad de los oligómeros de alfa-sinucleína.

55

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a alfa-sinucleína humana. En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana:

- se une a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y se une a alfa-sinucleína monomérica pero no fibrilar, o

60

se une al mismo epítopo que un anticuerpo que tiene un par de dominios variables de SEQ ID NO: 26 y 27 o SEQ ID NO: 38 y 39 y se une a alfa-sinucleína fibrilar pero no a alfa-sinucleína monomérica,

- inhibe la toxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neuroglíocitos,

65

- inhibe la transmisión de célula a célula de la agregación de alfa-sinucleína,
- reduce la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína (por ejemplo, en células LUHMES).

5 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende
 (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (b) HVR-H2, que comprende la
 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ
 ID NO: 17; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (e) HVR-L2, que
 10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de
 aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-alfa sinucleína se humaniza. En un modo
 de realización, un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana comprende HVR como en cualquiera de los modos de
 realización anteriores, y comprende además una región estructural humana aceptora, por ejemplo, una región
 15 estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana.

En otro modo de realización, VH o VL contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras),
 inserciones o deleciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana
 que comprende esa secuencia conserva la capacidad para unirse a alfa-sinucleína humana.

20 En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo N terminal libre
 (residuo de metionina N terminal libre) dentro de un fragmento de alfa-sinucleína humana que consiste en los
 aminoácidos 1-15 de SEQ ID NO: 40.

25 En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a alfa-sinucleína humana que tiene un residuo
 de metionina N terminal libre y que se une a un epítipo conformacional dentro de los residuos 1 a 15 y 188-195
 de alfa-sinucleína humana.

30 En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana de acuerdo con cualquiera de los
 modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o
 humano. En un modo de realización, un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana es un fragmento de anticuerpo,
 por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otro modo de realización, el anticuerpo es
 un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4 intacto u otra clase o isotipo de
 anticuerpo como se define en el presente documento.

35 En otro aspecto, un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana de acuerdo con cualquiera de los modos de realización
 anteriores puede incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, como se
 describe en las secciones 1-5 a continuación:

40 **1. Afinidad de anticuerpos**

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una
 constante de disociación (Kd) de ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, o entre 1 nM y 100 nM (por ejemplo, 10^{-7} M o menos,
 por ejemplo, de 10^{-7} M a 10^{-9} M).

45 En un modo de realización, Kd se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En un modo de
 realización, se realiza un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, se mide
 la afinidad de unión en solución de Fab por el antígeno equilibrando Fab con una concentración mínima de
 antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando a
 50 continuación el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen Y. *et*
al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de
 múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de
 captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquea con seroalbúmina
 bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una
 55 placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla [¹²⁵I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones seriadas de un
 Fab de interés (por ejemplo, consecuente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta L.G. *et*
al., Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599). A continuación, se incubaba el Fab de interés durante la noche; sin embargo,
 la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para
 garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su
 60 incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación se retira la solución y se lava
 la placa ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se
 añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y se cuentan las placas en un contador
 gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que dan menos
 de o igual a un 20 % de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

65 De acuerdo con otro modo de realización, se mide Kd usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial

BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En un modo de realización, se activan los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de su inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{as}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de Langmuir de unión uno a uno sencillo (programa informático de evaluación de BIACORE® versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{dis}/k_{as} (véase, por ejemplo, Chen, Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Si la tasa de asociación excede $10^6 M^{-1}s^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces, se puede determinar la tasa de asociación usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación=295 nm; emisión=340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv y otros fragmentos descritos a continuación. Para un análisis de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, A., en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315; véanse también los documentos WO 93/16185; US 5.571.894 y US 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítopos de unión al receptor de rescate y que tienen un incremento en la semivida *in vivo* véase el documento US 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Holliger, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson, P.J., *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de un dominio único es un anticuerpo de un dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, el documento US 6.248.516).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en el documento US 4.816.567; y en Morrison, S.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "con cambio de clase" en el que se ha cambiado la clase o subclase con respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en humanos, mientras conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o porciones de las mismas), se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos modos de realización, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de preparación de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann, I., *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; los documentos US 5.821.337, US 7.527.791, US 6.982.321 y US 7.087.409; Kashmiri, S.V., *et al.*, *Methods* 36 (2005) 25-34 (que describen el injerto en la región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua, W.F. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 43-60 (que describen el "reordenamiento de FR"); y Osbourn, J. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 61-68; y Klimka, A. *et al.*, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (que describen el enfoque de "selección guiada" para el reordenamiento de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims, M.J. *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véanse, por ejemplo, Carter, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; y Presta, L.G. *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véanse, por ejemplo, Baca, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 y Rosok, M.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

4. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es para la alfa-sinucleína humana y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítomos diferentes de alfa-sinucleína humana. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan alfa-sinucleína humana. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véanse Milstein, C. y Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540, documento WO 93/08829 y Traunecker, A., *et al.*, *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659) y genomanipulación "botón en ojal" (véase, por ejemplo, documento US 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticular dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, documento US 4.676.980, y Brennan, M. *et al.*, *Science* 229 (1985) 81-83); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny, S.A. *et al.*, *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Holliger, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448); y usar dímeros de Fv monocatenarios (scFv) (véase, por ejemplo, Gruber, M. *et al.*, *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374); y preparar anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt, A. *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69).

Los anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo "anticuerpos pulpo", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a alfa-sinucleína humana, así como otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793.

5. Variantes de anticuerpo

En determinados modos de realización, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En determinados modos de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones aminoacídicas. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, conservación/mejora de unión a antígeno, disminución en inmunogenicidad, o mejora en ADCC o CDC.

TABLA1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones conservadoras
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras conllevarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se puede seleccionar para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe en Cunningham, B.C. y Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085. En este procedimiento, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) se identifican y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con

antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicional, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden dirigir o eliminar como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

b) Variantes de glucosilación

En determinados modos de realización se altera un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o delección de sitios de glucosilación en un anticuerpo se puede lograr convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se crean o se retiran uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico ramificado que se une en general por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc (véase, por ejemplo, Wright, A. y Morrison, S.L., TIBTECH15 (1997) 26-32). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura oligosacárida biantenarica. En algunos modos de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura carbohidratada que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, con relación a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizada en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también se puede localizar aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia insignificantes en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una mejora en la función ADCC. Véanse, por ejemplo, el documento US 2003/0157108; el documento US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "carente de fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A., *et al.*, J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N., *et al.*, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 carentes de fucosilación de proteínas (Ripka, J. *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; documento US 2003/0157108; y documento WO 2004/056312, en especial en el ejemplo 11) y líneas celulares con inactivación génica, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con inactivación génica (véanse, por ejemplo, Yamane-Ohnuki, N. *et al.*, Biotech. Bioeng., 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94 ([2006] 680-688; y documento WO 2003/085107).

Se proporcionan además variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se biseca por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una reducción en la fucosilación y/o una mejora en la función ADCC. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2003/011878; US 6.602.684; y US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una mejora en la función CDC. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

c) Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización, se pueden introducir una o más modificaciones aminoacídicas en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región

Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones aminoacídicas.

5 En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que le convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar
10 ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (de ahí que probablemente carezca de actividad ADCC), pero conserve su capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492. Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro*
15 para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en el documento US 5.500.362 (véanse, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7059-7063; y Hellstrom, I. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1499-1502); documento US 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayos no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos (NK). De forma alternativa, o adicional, se puede evaluar *in vivo* la actividad ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes, R. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 652-656. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se
25 puede unir a C1q y, de ahí que carezca de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S., *et al.*, *Blood* 101 (2003) 1045-1052; y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103 (2004) 2738-2743). También se pueden realizar determinaciones de unión a FcRn y eliminación/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, *Int. Immunol.* 18 (2006) 1759-1769).

Los anticuerpos con una reducción en la función efectora incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (documento US 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (documento US 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con una mejora o reducción en la unión a FcR. (Véanse, por ejemplo, los documentos US 6.737.056, WO 2004/056312, y Shields, R.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604)

En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunos modos de realización, se realizan alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una alteración (es decir, una mejora o bien una disminución) en la unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en los documentos US 6.194.551, WO 99/51642, y Idusogie, E.E. *et al.*, *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184.

Se describen anticuerpos con un incremento en las semividas y una mejora en la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer, R.L., *et al.*, *J. Immunol.* 117 (1976) 587-593, y Kim, J.K., *et al.*, *J. Immunol.* 24 (1994) 2429-2434) en el documento US 2005/0014934. Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen las de sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (documento US 7.371.826).

Véanse también Duncan, A.R. y Winter, G., *Nature* 322 (1988) 738-740; documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Variantes de anticuerpo genomanipulado con cisteína

65 En determinados modos de realización, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En

modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoc conjugado, como se describe además en el presente documento. En determinados modos de realización, uno cualquiera o más de los siguientes residuos se pueden sustituir con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos genomanipulados con cisteína se pueden generar como se describe, por ejemplo, en el documento US 7.521.541.

10 e) Derivados de anticuerpos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar además para que contenga restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de propilpropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar en base a consideraciones incluyendo, pero sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se van a mejorar, ya sea si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro modo de realización se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteínico que se pueden calentar de forma selectiva por exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan células normales, pero que calientan el resto no proteínico hasta una temperatura a la que las células próximas al anticuerpo-resto no proteínico se destruyen.

35 f) Fusiones con un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica

Los anticuerpos monoclonales tienen un gran potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurológicas o del sistema nervioso central (SNC), pero su paso al cerebro está restringido por la barrera hematoencefálica (BHE). Estudios anteriores han demostrado que un porcentaje muy pequeño (aproximadamente un 0,1 %) de una IgG que circula en la circulación sanguínea cruza a través de la BHE al SNC (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52 (1974) 1158-1164), donde la concentración en el SNC del anticuerpo puede ser insuficiente para permitir un efecto fuerte.

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar además para contener uno o más módulos lanzadera de barrera hematoencefálica que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles.

El uno o más módulos lanzadera de barrera hematoencefálica se pueden fusionar a cualquier extremo de la cadena ligera o pesada. En un modo de realización preferente, el módulo lanzadera de barrera hematoencefálica se fusiona al extremo C de la cadena pesada.

El extremo C de la cadena pesada puede ser un extremo C completo que termina con los residuos aminoácidos PGK. El extremo C de la cadena pesada puede ser un extremo C acortado en el que se han retirado uno o dos de los residuos aminoácidos C terminales. En un modo de realización preferente, el extremo C de la cadena pesada es un extremo C acortado que termina en PG.

El uno o más módulos lanzadera de barrera hematoencefálica se pueden fusionar a la respectiva cadena de anticuerpo directamente o bien por medio de un péptido conector. En un modo de realización preferente, el péptido conector tiene la secuencia de aminoácidos GGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41).

El módulo lanzadera de barrera hematoencefálica puede ser un fragmento scFv de anticuerpo. En un modo de realización, el módulo lanzadera de barrera hematoencefálica es un scFv que comprende en orden N a C terminal un dominio variable de la cadena ligera-un dominio constante de la cadena ligera-un péptido conector-un dominio variable de la cadena pesada-el dominio constante de la cadena pesada 1.

En un modo de realización preferente, el módulo lanzadera de barrera hematoencefálica es el fragmento scFv del

anticuerpo anti-receptor de transferrina 8D3 con un péptido conector (G4S)₆ o una variante humanizada del mismo.

El término variante humanizada del mismo indica una molécula que se ha obtenido injertando las CDR del anticuerpo 8D3 murino en una región estructural humana con la introducción opcional de una a tres mutaciones independientemente entre sí en cada una de las regiones estructurales (FR) y/o las regiones hipervariables (HVR).

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana que comprende un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, dos conectores peptídicos y dos entidades de unión monovalentes que se unen a un receptor de barrera hematoencefálica, en el que el conector acopla el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana a las entidades de unión monovalentes que se unen al receptor de barrera hematoencefálica.

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana que comprende un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, un conector peptídico y una entidad de unión monovalente que se une a un receptor de barrera hematoencefálica, en el que el conector acopla el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana a la entidad de unión monovalente que se une al receptor de barrera hematoencefálica.

En un modo de realización, la entidad de unión monovalente que se une al receptor de barrera hematoencefálica se selecciona del grupo que consiste en proteínas, polipéptidos y péptidos.

En un modo de realización, la entidad de unión monovalente que se une al receptor de barrera hematoencefálica comprende una molécula seleccionada del grupo que consiste en un ligando del receptor de barrera hematoencefálica, un scFv, un Fv, un scFab, un VHH, en un modo de realización preferente un scFv o un scFab.

En un modo de realización, el receptor de barrera hematoencefálica se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina, receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico, proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 8, proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 y factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina. En un modo de realización preferente, el receptor de barrera hematoencefálica es el receptor de transferrina.

En un modo de realización, la entidad de unión monovalente que se une al receptor de barrera hematoencefálica comprende un scFab o un scFv dirigido al receptor de transferrina, más particular un scFab o scFv que reconoce un epítipo en el receptor de transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 y 54.

En un modo de realización, la entidad de unión monovalente que se une al receptor de barrera hematoencefálica se acopla al extremo C terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana por el conector.

En un modo de realización, el conector peptídico es una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 15 aminoácidos, más preferentemente con una longitud de 18 a 25 aminoácidos.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana es un anticuerpo de longitud completa, en un modo de realización preferente una IgG de longitud completa. El término "anticuerpo de longitud completa" indica un anticuerpo que consiste en dos polipéptidos de la cadena ligera del anticuerpo y dos polipéptidos de la cadena pesada del anticuerpo, en el que en los dos polipéptidos de la cadena pesada del anticuerpo el residuo de lisina (K) C terminal puede estar presente o no.

En un modo de realización preferente, el polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana comprende un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana de IgG de longitud completa como entidad efectora cerebral, un conector de la secuencia **GGSGGGSGGGSGGGGS** (SEQ ID NO: 41) y un scFab como entidad de unión monovalente que se une al receptor de transferrina humana como receptor hematoencefálico, en el que el scFab se acopla por el conector al extremo C terminal (de la parte Fc) de una de las cadenas pesadas del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana de longitud completa, y en el que el scFab reconoce un epítipo en el receptor de transferrina humana comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 y 54.

En un modo de realización preferente, el polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana comprende un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana de IgG de longitud completa como entidad efectora cerebral, un conector de la secuencia **GGSGGGSGGGSGGGGS** (SEQ ID NO: 41) y un scFab como entidad de unión monovalente que se une al receptor de transferrina humana como receptor hematoencefálico, en el que el scFv se acopla por el conector al extremo C terminal (de la parte Fc) de una de las cadenas pesadas del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana de longitud completa, y en el que el scFab reconoce un epítipo en el receptor de transferrina humana comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 y 54.

En un modo de realización, la primera cadena pesada del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana comprende un primer módulo de dimerización y la segunda cadena pesada del anticuerpo comprende un segundo módulo de

dimerización que permite la heterodimerización de las dos cadenas pesadas.

En un modo de realización, el primer módulo de dimerización de la primera cadena pesada del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana es una cadena pesada de botón y el módulo de dimerización de la segunda cadena pesada del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana es una cadena pesada de ojal (de acuerdo con estrategia de botones en ojales).

El polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana como se informa en el presente documento se puede usar como medicamento, en particular se puede usar para el tratamiento de un trastorno neurológico tal como, por ejemplo, enfermedad de Parkinson.

El polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana como se informa en el presente documento se puede usar para transportar el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana (entidad efectora cerebral) a través de la barrera hematoencefálica.

En un modo de realización, la cadena pesada del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana que se acopla en su extremo C terminal de la región Fc al scFab como entidad de unión monovalente que se une al receptor de transferrina humana tiene la siguiente estructura en sentido N a C terminal:

- cadena pesada de IgG,
- conector peptídico que acopla el extremo C terminal de la región Fc de la cadena pesada de IgG al extremo N terminal del dominio VL del scFab, en un modo de realización preferente, el conector peptídico tiene la secuencia de aminoácidos **GGSGGGSGGGSGGGGS** (SEQ ID NO: 41),
- dominio variable de la cadena ligera (VL) y dominio C-kappa de la cadena ligera del scFab,
- conector peptídico que acopla el extremo C terminal del dominio C-kappa de la cadena ligera del scFab al extremo N terminal del dominio VH del scFab, en un modo de realización preferente el conector peptídico tiene la secuencia de aminoácidos (G₄S)₆GG (SEQ ID NO: 55),
- dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo scFab y dominio CH1 de la cadena pesada de IgG.

En un modo de realización, la cadena pesada del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana que se acopla en su extremo C terminal de la región Fc al scFv como entidad de unión monovalente que se une al receptor de transferrina humana tiene la siguiente estructura en sentido N a C terminal:

- cadena pesada de IgG,
- conector peptídico que acopla el extremo C terminal de la parte Fc de la cadena pesada de IgG al extremo N terminal del dominio VL del fragmento de anticuerpo scFv, en un modo de realización preferente el conector peptídico es un péptido con la secuencia de aminoácidos **GGSGGGSGGGSGGGGS** (SEQ ID NO: 41),
- dominio variable de la cadena ligera (VL),
- conector peptídico que acopla el extremo C terminal del dominio variable de la cadena ligera al extremo N terminal del dominio VH del scFv, en un modo de realización preferente, el conector peptídico es un péptido con la secuencia de aminoácidos (G₄S)₆GG (SEQ ID NO: 55),
- dominio variable de la cadena pesada (VH) del fragmento de anticuerpo scFv.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de fusión para transportar una entidad efectora cerebral a través de la barrera hematoencefálica que comprende una entidad Ig CH2-CH3, un conector peptídico y un scFab o scFv dirigido a un receptor de barrera hematoencefálica, en el que el scFab o scFv se acopla a un extremo C terminal de la entidad Ig CH2-CH3 por el conector peptídico.

En un modo de realización, el módulo lanzadera de barrera hematoencefálica/el scFab o scFv dirigido a un receptor de barrera hematoencefálica se deriva de un anticuerpo anti-receptor de transferrina humanizado 8D3 (véase, por ejemplo, Boado, R.J. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 102 (2009) 1251-1258). El dominio variable de la cadena pesada murina tiene la secuencia de aminoácidos de

```
EVQLVESGGG LVQPGNSLTL SCVASGFTFS NYGMHWIRQA PPKGLEWIAM
IYYDSSKMNY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LEMNSLRSED TAMYYCAVPT
SHYVVDVWGQ GVSVTVSS
```

(SEQ ID NO: 56).

El dominio variable de la cadena ligera murina (variante 1) tiene la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPAS LSASLEEIVT ITCQASQDIG NWLAWYQQKP GKSPQLLIYG
 ATSLADGVPS RFSGSRSGTQ FSLKISRQVQ EDIGIYYCLQ AYNTPWTFGG
 5 GTKLELK

(SEQ ID NO: 57), Y

el dominio variable de la cadena ligera murina (variante 2) tiene la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPAS LSASLEEIVT ITCQASQDIG NWLAWYQQKP GKSPQLLIYG
 ATSLADGVPS RFSGSRSGTQ FSLKISRQVQ EDIGIYYCLQ AYNTPWTFGG
 10 GTKVEIK

(SEQ ID NO: 58).

15 **Un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica**

En un aspecto, el polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana comprende exactamente un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica, en el que el módulo lanzadera de barrera hematoencefálica comprende los dominios variables humanizados del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana murino 8D3, con lo que el módulo lanzadera de barrera hematoencefálica que comprende los dominios variables humanizados del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana murino 8D3 transporta el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana a través de la barrera hematoencefálica. Los dominios variables del anticuerpo anti-receptor de transferrina humana 8D3 tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 y 57.

25 **Uno o dos módulos lanzadera de barrera hematoencefálica**

En un aspecto, el polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana comprende uno o dos módulos de lanzadera de barrera hematoencefálica, en el que el módulo lanzadera de barrera hematoencefálica deriva de un anticuerpo que se une con baja afinidad a un receptor de barrera hematoencefálica (R-BHE), con lo que el módulo lanzadera de barrera hematoencefálica derivado de un anticuerpo que se une con baja afinidad a un receptor de barrera hematoencefálica transporta el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana a través de la barrera hematoencefálica.

En otro aspecto, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor de IGF), proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 8 (LRP8), proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 (LRP1) y factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). En otro aspecto de este tipo, el R-BHE es un R-BHE humano. En un aspecto de este tipo, el R-BHE es TfR. En otro aspecto de este tipo, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la actividad TfR. En otro aspecto de este tipo, el R-BHE es TfR y el anticuerpo no inhibe la unión de TfR a transferrina.

En otro aspecto, el anticuerpo no daña la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos naturales. En otro aspecto de este tipo, el anticuerpo se une específicamente al receptor de transferrina humana (RTFh) de tal manera que no inhibe la unión del RTFh a transferrina humana.

En otro aspecto, el anticuerpo anti-R-BHE tiene una CI_{50} para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro aspecto de este tipo, la CI_{50} es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro aspecto de este tipo, la CI_{50} es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro aspecto, el anticuerpo tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μ M. En otro aspecto de este tipo, el anticuerpo, cuando se acopla al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μ M. En otro aspecto de este tipo, el anticuerpo, cuando se acopla al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μ M. En un aspecto, la afinidad del anticuerpo anti-R-BHE o del polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana por el R-BHE se mide usando análisis Scatchard. En otro aspecto, la afinidad del anticuerpo anti-R-BHE o del polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana por el R-BHE se mide usando análisis BIACORE. En otro aspecto, la afinidad del anticuerpo anti-R-BHE o del polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana por el R-BHE se mide usando un ELISA de competencia.

60 **Uso de los polipéptidos de fusión de anticuerpo que contienen lanzadera de barrera hematoencefálica**

En otro modo de realización, en el presente documento se proporciona un procedimiento de incremento de la exposición del SNC a un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, en el que el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana se acopla a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une con baja afinidad a un R-BHE, incrementando de este modo la exposición del SNC al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana. En otro aspecto, el incremento en la exposición del SNC al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana se mide con relación a la exposición del SNC de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana acoplado con un anticuerpo típico que no tiene una afinidad reducida por el R-BHE. En otro aspecto, el incremento en la exposición del SNC al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana se mide como una proporción de la cantidad del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana encontrado en el SNC con relación a la cantidad encontrada en el suero después de la administración. En otro aspecto de este tipo, el incremento en la exposición del SNC da como resultado una proporción mayor de un 0,1 %. En otro aspecto, el incremento en la exposición del SNC al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana se mide en relación con la exposición del SNC del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana en ausencia de un anticuerpo anti-R-BHE acoplado. En otro aspecto, el incremento en la exposición del SNC al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana se mide por formación de imágenes. En otro aspecto, el incremento en la exposición del SNC al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana se mide por una lectura indirecta tal como una modificación de uno o más síntomas fisiológicos.

Un procedimiento para incrementar la retención en el SNC de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana administrado a un sujeto, en el que el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana se acopla a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se une con baja afinidad a un R-BHE, de modo que se incrementa la retención en el SNC del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana.

En otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento de optimización de la farmacocinética y/o farmacodinámica de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana para que sea eficaz en el SNC de un sujeto, en el que el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana se acopla a un anticuerpo o anticuerpo fragmento, que se une con baja afinidad a un R-BHE, con lo que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se selecciona de modo que su afinidad por el R-BHE después del acoplamiento al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana dé como resultado una cantidad de transporte del anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugado con el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana a través del BHE que optimiza la farmacocinética y/o farmacodinámica del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana en el SNC.

En otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno neurológico en un mamífero que comprende tratar al mamífero con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que se une a un R-BHE y que se acopla a un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, en el que el anticuerpo se ha seleccionado para tener una baja afinidad por el R-BHE y de este modo mejora la captación del SNC del anticuerpo y el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana acoplado. En un modo de realización, el tratamiento da como resultado la reducción o eliminación de los síntomas del trastorno. En otro aspecto, el tratamiento da como resultado una mejora del trastorno neurológico.

En un modo de realización de todos los aspectos previos, el anticuerpo anti-R-BHE tiene una CI_{50} para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro modo de realización de este tipo, la CI_{50} es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro modo de realización de este tipo, la CI_{50} es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro modo de realización de este tipo, la CI_{50} es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro modo de realización, el anticuerpo tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μ M. En otro modo de realización, el anticuerpo, cuando se acopla al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μ M. En otro modo de realización, el anticuerpo, cuando se acopla al anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μ M. En un modo de realización, la afinidad del anticuerpo anti-R-BHE o del polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana por el R-BHE se mide usando análisis Scatchard. En otro modo de realización, la afinidad del anticuerpo anti-R-BHE o del polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana por el R-BHE se mide usando análisis BIACORE. En otro modo de realización, la afinidad del anticuerpo anti-R-BHE o del polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana por el R-BHE se mide usando un ELISA de competencia.

En otro modo de realización, el polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana está marcado. En otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento anti-R-BHE no daña la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos naturales. En otro modo de realización, el anticuerpo anti-R-BHE se une específicamente a RTFh de tal manera que no inhibe la unión del RTFh a transferrina humana. En otro modo de realización, el polipéptido de fusión de anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana se administra a un mamífero. En otro modo de realización, el mamífero es un ser humano. En otro modo de realización, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro modo de realización, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), apoplejía, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión cerebral traumática.

B. Composiciones y procedimientos recombinantes

Los anticuerpos se pueden producir usando composiciones y procedimientos recombinantes, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otro modo de realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En un modo de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariontas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523. (Véase también Charlton, K.A., en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*.) Después de la expresión, se puede aislar el anticuerpo de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de procariontas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras con vías de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gemgross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; y Li, H. *et al.*, *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar conjuntamente con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.959.177, US 6.040.498, US 6.420.548, US 7.125.978 y US 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para cultivar en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células HEK293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L. *et al.*, *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P. *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; células MRC5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub, G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar para o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, por procedimientos conocidos, tales como ELISA, alphaLISA, inmunoelectrotransferencia, matriz de anticuerpos o de fase inversa, etc.

En un ensayo ELISA o alphaLISA ejemplar, la alfa-sinucleína en solución (sobrenadante celular, lisados celulares o tisulares, líquidos corporales, etc.) se une por un anticuerpo de captura, que se une específicamente a un primer epítipo en alfa-sinucleína o alfa-sinucleína en una determinada conformación y un anticuerpo de detección acoplado a una entidad de detección, que se une específicamente a un segundo epítipo o conformación de alfa-sinucleína. La lectura se basa en la entidad de detección (quimioluminiscencia, fluorescencia, luminiscencia inducida por transferencia de energía, etc.). En algunos casos, se puede usar el mismo anticuerpo en el mismo ensayo como anticuerpo de captura y detección para detectar formas agregadas de alfa-sinucleína (véase, por ejemplo, Tokuda, T. *et al.*, *Neurology* 75 (2010) 1766-1772).

En el caso de matriz de anticuerpos, se colocan anticuerpos sobre chips de vidrio o nitrocelulosa. Se bloquean los portaobjetos y se incuban con una solución que contiene alfa-sinucleína, se lavan para retirar los anticuerpos no unidos y se detectan los anticuerpos unidos con un anticuerpo secundario correspondiente marcado con fluorescencia. Se mide la señal de fluorescencia con un escáner para portaobjetos de fluorescencia. De forma similar, para una matriz de fase inversa se colocan alfa-sinucleína recombinante, sobrenadante celular, lisados celulares o tisulares, líquidos corporales, etc., sobre chips de vidrio o nitrocelulosa. Se bloquean los portaobjetos y se incuban las matrices individuales con un anticuerpo frente a un epítipo específico en alfa-sinucleína. Se separan por lavado los anticuerpos no unidos y se detectan los anticuerpos unidos con un anticuerpo secundario correspondiente marcado con fluorescencia. Se mide la señal de fluorescencia por un escáner para portaobjetos de fluorescencia (Dernick, G., *et al.*, *J. Lipid Res.* 52 (2011) 2323-2331).

En el ejemplo de inmunoelectrotransferencia, la alfa-sinucleína recombinante agregada o la alfa-sinucleína derivada del sobrenadante celular, lisados celulares o tisulares, líquidos corporales, etc. se separa por peso molecular en SDS-PAGE o condiciones de gel natural y se transfiere sobre una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Después del bloqueo, se incuba la membrana con anticuerpos específicos para la secuencia de aminoácidos o conformaciones de alfa-sinucleína. Después de esto, se lava la membrana para retirar el anticuerpo no unido. Se detectan los anticuerpos unidos por los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a entidades de detección por quimioluminiscencia o fluorescencia u otros medios de detección. Los anticuerpos específicos para las secuencias de aminoácidos de alfa-sinucleína se unirán a la alfa-sinucleína en diversas formas agregadas y por lo tanto pesos moleculares siempre que el epítipo no se enmascare por la agregación. Por otra parte, los anticuerpos específicos de conformación detectarán solo determinadas formas agregadas de alfa-sinucleína que revelarán solo bandas a pesos moleculares específicos (véase, por ejemplo, Towbin, H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350-4353; Burnette, W.N., *Anal. Biochem.* 112 (1981) 195-203).

En otro aspecto, se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con el anticuerpo 0017, anticuerpo 0018 o anticuerpo 0081 para unirse a alfa-sinucleína humana. En determinados modos de realización, un anticuerpo competidor de este tipo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que se une por un anticuerpo como se informa en el presente documento tal como el anticuerpo 0017, anticuerpo 0018 y anticuerpo 0081. Los procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo se proporcionan en Morris, G.E. (ed.), *Epitope Mapping Protocols*, en: *Methods in Molecular Biology*, vl. 66, Humana Press, Totowa, NJ (1996).

En un ensayo de competencia ejemplar, se incuba alfa-sinucleína humana inmovilizada en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a alfa-sinucleína humana (por ejemplo, el anticuerpo 0017, anticuerpo 0018 o anticuerpo 0081) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo para unirse a alfa-sinucleína humana. Como control, se incuba alfa-sinucleína humana inmovilizada en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a alfa-sinucleína humana, se retira el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado con alfa-sinucleína humana inmovilizada. Si se reduce sustancialmente la cantidad de marcador asociado con alfa-sinucleína humana inmovilizada en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por unirse a alfa-sinucleína humana (véase, por ejemplo, Harlow, E. y Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988)).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, protección frente a/reducción de/inhibición de citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína, y/o protección frente a/reducción de/inhibición de transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica, y/o reducción de actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en células neuronales humanas. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En determinados modos de realización, se somete a prueba un anticuerpo de la invención para determinar dicha actividad biológica.

La actividad biológica protectora se puede evaluar añadiendo medio acondicionado que contiene alfa-sinucleína secretada, lo que provoca la muerte celular en células neuronales receptoras. Esta toxicidad se puede invertir añadiendo anticuerpos protectores como se describe en el presente documento. La naturaleza tóxica de alfa-sinucleína secretada se ha establecido previamente (Emmanouilidou, E., *et al.*, J. Neurosci., 30 (2010) 6838-6851).

D. Procedimientos y composiciones para diagnóstico y detección

En determinados modos de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de alfa-sinucleína humana en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejido cerebral.

En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de detección de la presencia de alfa-sinucleína humana en una muestra biológica. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana a alfa-sinucleína humana, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana y alfa-sinucleína humana. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En un modo de realización, se usa un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana para seleccionar sujetos elegibles para tratamiento con un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana, por ejemplo, donde alfa-sinucleína humana es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que se pueden diagnosticar usando un anticuerpo de la invención incluyen neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral de tipo 1 (NBIA1), fallo autonómico puro, síndrome de Down, complejo de Guam y varios trastornos por cuerpos de Lewy, tales como enfermedad difusa por cuerpos de Lewy (EDCL), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (vCLEA), determinadas formas de enfermedad de Gaucher y demencia de la enfermedad de Parkinson (DEP).

En determinados modos de realización, se proporcionan anticuerpos anti-alfa-sinucleína marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodenso, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (US 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalacindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

E. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo

peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glucoproteínas hialuronidasas activas a pH neutro solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas hialuronidasas a pH-20 solubles humanas, tales como rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.).

5 Determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rhuPH20, se describen en los documentos US 2005/0260186 y US 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares se describen en el documento US 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en los documentos US 6.171.586 y WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además [[enumerar los fármacos que se podrían combinar con el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana]]. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Se pueden atrapar ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son en general estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

F. Procedimientos y composiciones terapéuticas

Cualquiera de los anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana proporcionados en el presente documento se puede usar en procedimientos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana para su uso como medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana para su uso en un procedimiento de tratamiento. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene enfermedad de Parkinson que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En otros modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana para su uso en inhibir de la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neurogliocitos humanos, o inhibir la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neurogliocitos, o reducir la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana para su uso en un procedimiento de inhibir la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neurogliocitos humanos, o inhibir la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neurogliocitos, o reducir la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana para inhibir la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neurogliocitos humanos, o inhibir la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neurogliocitos, o reducir la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es preferentemente un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana en la fabricación o preparación de un medicamento. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En otro modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento de

tratamiento de la enfermedad de Parkinson, que comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad de Parkinson una cantidad eficaz del medicamento. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En otro modo de realización, el medicamento es para inhibir la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neuroglíocitos humanos, o para inhibir la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, o para reducir la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína. En otro modo de realización, el medicamento es para su uso en un procedimiento de inhibir la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neuroglíocitos humanos, o inhibir la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, o reducir la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inhibir la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas humanas y células neuroglíocitos, o para inhibir la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, o para reducir la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o bien en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, se puede coadministrar un anticuerpo de la invención con al menos un agente terapéutico adicional.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o formulaciones separadas) y la administración separada, caso en el que la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes de, simultáneamente y/o después de la administración del agente o agentes terapéuticos adicionales. En un modo de realización, la administración del anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana y la administración de un agente terapéutico adicional se produce en aproximadamente un mes, o en aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos momentos, administración en bolo e infusión intermitente.

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de forma consecuente con las buenas prácticas médicas. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo no lo necesita, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier ruta que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución de la enfermedad, si se administra anticuerpo con propósitos preventivos o terapéuticos, tratamiento previo, anamnesis del paciente y respuesta al anticuerpo y el criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,5 mg/kg - 10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento en general se

5 mantendría hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación
ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por
tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o
10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por
ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente recibe de aproximadamente
dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar
una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras
pautas de dosificación. La progresión de este tratamiento se sigue fácilmente por técnicas y ensayos
convencionales. Se entiende que se puede llevar a cabo cualquiera de las formulaciones o procedimientos
terapéuticos anteriores usando un inmunocombinado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-
alfa-sinucleína humana.

III. Artículos de fabricación

15 En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el
tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación
comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los
recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los
recipientes se pueden formar de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene
una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o
diagnosticar la afección y que puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una
bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al
menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La ficha técnica o prospecto del
envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación
puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición
comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo,
en el que la composición comprende otro agente citotóxico o terapéutico de otro modo. El artículo de fabricación
en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indique que
las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicional, el artículo
de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón
farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada
con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde
un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

35 Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunocombinado de la
invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana.

IV. EJEMPLOS

40 Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general
proporcionada anteriormente.

Materiales y procedimientos

45 Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning:
A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Se usaron los
reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50

Síntesis de genes y oligonucleótidos

Se prepararon los segmentos génicos deseados por síntesis química en Geneart GmbH (Ratisbona, Alemania).
Los fragmentos génicos sintetizados se clonaron en un plásmido de *E. coli* para su propagación/amplificación. Las
secuencias de ADN de fragmentos génicos subclonados se verificaron por secuenciación de ADN. De forma
alternativa, se ensamblaron fragmentos cortos de ADN sintético hibridando oligonucleótidos sintetizados
químicamente o por medio de PCR. Los oligonucleótidos respectivos se prepararon por metabion GmbH (Planegg-
Martinsried, Alemania).

60 Reactivos

Todos los productos químicos, anticuerpos y kits comerciales se usaron como se proporcionaron de acuerdo con
el protocolo del fabricante, si no se establece de otro modo.

65 Clones celulares

anticuerpo 0017 = ASYN-233HC_110-IV = aSyn.S019.006A08
 anticuerpo 0018 = ASYN-064HC_110-II = aSyn.S003.006A11
 anticuerpo 0081 = ASYN-235HC_110-IV = aSyn.S019.005A08
 anticuerpo 0070 = anticuerpo 0017 + módulo lanzadera de barrera hematoencefálica
 anticuerpo 0076 = anticuerpo 0018 + módulo lanzadera de barrera hematoencefálica

Ejemplo 1

Preparación del antígeno

Materiales

Proteínas:

- alfa-sinucleína natural humana liofilizada (partes alícuotas de 100 µg, 200 µg o 500 µg);
- alfa-sinucleína TP mutante humana (8,2 mg/ml, dializada en HEPES 50 mM/NaCl 100 mM)

Tampones y soluciones (almacenados a temperatura ambiente y protegidos de la exposición directa a la luz solar):

- reserva PB (5x): tampón fosfato 250 mM, pH 7,0 (filtrado a 0,22 µm)
- reserva de EtOH: etanol absoluto calidad proanálisis (EMSURE) (Merck; n.º cat. 1.00989.1000)
- agua de calidad para HPLC (LiChrosolv, Merck)
- HEPES 50 mM/NaCl 100 mM, pH 7,4 (filtrado a 0,22 µm filtrado)
- TBS (Tris 50 mM/NaCl 100 mM) pH 7,0 (filtrado a 0,22 µm)
- reactivo de suministro de proteínas BioPORTER (Genlantis, n.º cat. BP502424)

Preparación de oligómeros A1

Para referencia, véanse Danzer, K.M., *et al.*, J. Neurosci. 27 (2007) 9220-9232, y Danzer, K.M., *et al.*, J. Neurochem. 111 (2009) 192-203.

Se solubilizó alfa-sinucleína liofilizada en agua para HPLC para obtener una solución de aproximadamente 70 µM en alfa-sinucleína (100 µl por 100 µg de proteína). Se sonicó la solución durante 30 s en sonicador de baño de agua usando un dispositivo flotante de tubo. Después de esto, se añadieron 500 µl de agua de calidad para HPLC, 200 µl de PB 250 mM, pH 7,0, 200 µl de EtOH absoluto proanálisis. Se agitó con vórtex la mezcla a velocidad máxima durante 10 s. Posteriormente se generó una solución de alfa-sinucleína de 100 µg/ml en PB 50 mM pH 7,0/etanol al 20 %. Para la muestra de referencia, se mezclaron los mismos tampones en ausencia de alfa-sinucleína. Se agitó la solución durante 4 h a temperatura ambiente en un nutador. Después de agitar, se congelaron las soluciones en hielo seco para su liofilización inmediata. Se realizó la liofilización durante la noche a temperatura ambiente en rotación constante (por ejemplo, en un Speedvac). Se resuspendió el liofilizado en 0,5 ml de PB 50 mM, pH 7,0 con etanol al 10 %. Se evaporó el etanol a 20-21 °C durante 24 h en la campana de gases con tapa abierta (Eppendorf Thermomixer 5436, velocidad 5). Después de esto, se cerró la tapa y se continuó agitando a temperatura ambiente durante 6 días. Se concentraron los oligómeros A1 hasta 1 mg/ml con Vivaspin 500 (corte de 30 kD) y se agruparon para la inmunización. Para el almacenamiento prolongado, se mantuvieron los oligómeros a -80 °C. Se realizó el control de calidad para la formación de oligómeros apropiada por SDS-PAGE y ME.

Preparación de oligómeros C1

Para referencia, véanse Danzer, K.M., *et al.*, J. Neurosci. 27 (2007) 9220-9232, y Danzer, K.M., *et al.*, J. Neurochem. 111 (2009) 192-203.

Se solubilizó alfa-sinucleína liofilizada en agua de calidad para HPLC para obtener una solución con una concentración de aproximadamente 70 µM (100 µl por 100 µg de proteína). Se sonicó la solución durante 30 s en un sonicador de baño de agua usando un dispositivo flotante de tubo. Después de esto, se añadieron 500 µl de agua de calidad para HPLC, 200 µl de PB 250 mM, pH 7,0, 200 µl de etanol absoluto proanálisis. Se agitó con vórtex la mezcla a velocidad máxima durante 10 s. Se generaron soluciones de 100 µg/ml de alfa-sinucleína en PB 50 mM pH 7,0/etanol al 20 %. Para las muestras de control, se mezclaron los mismos tampones en ausencia de alfa-sinucleína. Se agitaron las soluciones durante 16 h a temperatura ambiente en un nutador (por ejemplo, durante la noche). Se concentraron los oligómeros C1 hasta 1 mg/ml con Vivaspin 500 (corte de 30 kD) y se

agruparon para la inmunización. Para el almacenamiento prolongado, se mantuvieron los oligómeros a -80 °C. Se realizó el control de calidad para la formación de oligómeros apropiada por SDS-PAGE y ME.

Preparación de oligómeros de alfa-sinucleína mutantes TP

Adaptado de Karpinar, D.P., *et al.*, EMBO J. 28 (2009) 3256-3268.

Se agitaron partes alícuotas de 100 µl de 8,2 mg/ml (aproximadamente 590 mM) de alfa-sinucleína TP en HEPES 50 mM/NaCl 100 mM pH 7,4 con una microbarra agitadora magnética de 2 x 5 mm a 37 °C (200 rpm) durante 6 días. Se realizó el control de calidad para la formación de oligómeros apropiada por SDS-PAGE y ME.

Formación de fibrillas de alfa-sinucleína y mezcla con BioPORTER

Adaptado de Luk, K.C., *et al.*, Biochem. 46 (2007) 12522-12526, y Luk, K.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (2009) 20051-20056.

Se llevó la parte alícuota de alfa-sinucleína liofilizada y a vacío (de -80 °C) a temperatura ambiente (TA) durante 10-15 min sin abrir la bolsa a vacío. Mientras tanto, se precalentó el mezclador del tubo orbital a 37 °C. Después de esto, se abrió la bolsa que contenía los tubos y, en caso necesario, se limpiaron las gotas de agua en el exterior del tubo. Se disolvieron 100 µg de alfa-sinucleína liofilizada en 100 µl de TBS pH 7. Se colocaron los tubos en un mezclador de tubos orbital y se incubaron a 37 °C/1000 rpm durante 96 h. Después de esto, se centrifugó el tubo a velocidad máxima (20.000 g) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Del sobrenadante se retiraron 90 µl. Se resuspendió el sedimento con 90 µl de TBS recién preparado (suponiendo una concentración de aproximadamente 1 mg/ml). Se realizó el control de calidad para la formación de fibrillas apropiada por SDS-PAGE y ME. Para el almacenamiento prolongado, se mantuvo la muestra a -80 °C.

Poco antes de la inmunización, se añadieron 100 µl de fibrillas bien suspendidas de 1 mg/ml a 20 µl de película seca de reactivo BioPORTER y se mezclaron enérgicamente por agitación en vórtex y sonicación con baño de agua. Se incubó la solución durante 10 min a temperatura ambiente antes de usarla para inmunización.

Ejemplo 2

Inmunización de conejos

Se inmunizaron tres conejos blancos New Zealand con una mezcla de oligómeros C1 de alfa-sinucleína, fibrillas de alfa-sinucleína y oligómeros mutantes TP de alfa-sinucleína (400 µg de cada componente para la primera inmunización; 200 µg de cada componente para inmunizaciones consecutivas; véase preparación en el ejemplo 1). Los animales recibieron el inmunógeno, emulsionado con adyuvante de Freund completo, por aplicación intradérmica el día 0, y alternando aplicaciones intramusculares y subcutáneas los días 7, 14, 35, 63 y 91. Se extrajo sangre (10 % de la volemia total estimada) los días 21, 41, 69 y 97. Se preparó suero, que se usó para la determinación del valor por ELISA (véase a continuación). Se aislaron células mononucleares periféricas, que se usaron como fuente de linfocitos B específicos de antígeno en el proceso de clonación de linfocitos B (ejemplos 3 y 4).

Determinación de los valores séricos

Se determinaron valores por separado para cada componente de la mezcla inmunógena. Se inmovilizaron oligómeros C1 de alfa-sinucleína, fibrillas de alfa-sinucleína u oligómeros mutantes TP de alfa-sinucleína en una placa NUNC Maxisorb de 96 pocillos a 0,6 µg/ml, 100 µl/pocillo, en PBS (solución salina tamponada con fosfato), seguido de: bloqueo de la placa con CroteinC al 2 % en PBS, 200 µl/pocillo; aplicación de diluciones en serie de antisueros, por duplicado, en CroteinC al 0,5 % en PBS, 100 µl/pocillo; detección con anticuerpo anti-IgG de conejo de burro conjugado con HRP (conjugado con peroxidasa de rábano picante) (Jackson Immunoresearch) diluido 1:16.000 en CroteinC al 0,5 % en PBS, 100 µl/pocillo. Para todas las etapas, se incubaron placas durante una hora a 37 °C. Entre todas las etapas, se lavaron las placas tres veces con Tween 20 al 0,05 % en PBS. Se desarrolló la señal por adición de BM Blue POD Substrate soluble (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), 100 µl/pocillo, y se detuvo por adición de HCl 1 M, 100 µl/pocillo. Se leyó la absorbancia a 450 nm, frente a 690 nm como referencia. Se definió el valor como la dilución de antisueros dando como resultado una señal semimáxima.

Ejemplo 3

Aislamiento de linfocitos B productores de anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de conejo

Se usaron tres conejos (descritos en el ejemplo 2) como fuente de sangre. Se diluyó sangre completa que contenía EDTA dos veces con 1x PBS (solución salina tamponada con fosfato; PAA, Pasching, Austria) antes de la

centrifugación de densidad usando Lympholyte-Mammal (Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canadá) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se lavaron las PBMC dos veces con 1x PBS.

Medio EL-4 B5

5 RPMI1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) complementado con FCS al 10 % (Hyclone, Logan, UT, EE. UU.), glutamina 2 mM, solución de penicilina/estreptomicina al 1 % (PAA, Pasching, Austria), piruvato de sodio 2 mM, HEPES 10 mM (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) y β -mercaptoetanol 0,05 mM (Gibco, Paisley, Escocia).

Disminución de macrófagos/monocitos

10 Se usaron placas de 6 pocillos estériles (calidad para cultivo celular) para disminuir macrófagos y monocitos a través de adhesión inespecífica. Se llenó cada pocillo al máximo con 4 ml de medio y hasta 6×10^6 PBMC del conejo inmunizado y se dejó que se unieran durante 1 h a 37 °C en la incubadora. Se usaron las células en el sobrenadante (linfocitos de sangre periférica (PBL)) para la etapa de fijación de antígeno.

Recubrimiento de placas

20 Se recubrieron placas de 6 pocillos de cultivo celular estériles se revistieron con una mezcla de dos oligómeros de alfa-sinucleína humana diferentes (oligómero C1 de 1 μ g/ml y oligómero mutante TP de 1 μ g/ml) en tampón carbonato (bicarbonato de sodio 0,1 M, hidrogenocarbonato de sodio 34 mM, pH 9,55) durante la noche a 4 °C. Se lavaron las placas en PBS estéril tres veces antes de su uso.

Enriquecimiento de linfocitos B en oligómeros de alfa-sinucleína humana

25 Se sembraron placas de cultivo tisular de 6 pocillos recubiertas con oligómeros de alfa-sinucleína humana con hasta 6×10^6 PBL por 4 ml de medio y se permitió que se unieran durante 1 h a 37 °C en la incubadora. Después de la etapa de enriquecimiento en los oligómeros de alfa-sinucleína, se retiraron las células no adherentes lavando cuidadosamente los pocillos 1-2 veces con 1x PBS. Se desprendieron las células adherentes restantes por tripsina durante 10 min a 37 °C en la incubadora. Se detuvo la tripsinización con medio EL-4 B5. Se mantuvieron las células en hielo hasta la tinción de inmunofluorescencia.

Tinción de inmunofluorescencia y citometría de flujo

35 Se usó el conjugado de anticuerpo anti-IgG y FITC (AbD Serotec, Düsseldorf, Alemania) para la separación celular individual. Para la tinción superficial, se incubaron células de la etapa de disminución y enriquecimiento con el conjugado de anticuerpo anti-IgG y FITC en PBS y se incubaron durante 45 min en oscuridad a 4 °C. Después de la tinción, se lavaron las PBMC dos veces con PBS helada. Finalmente, se resuspendieron las PBMC en PBS helada y se sometieron de inmediato a los análisis FACS. Se añadió yoduro de propidio en una concentración de 5 μ g/ml (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) antes de los análisis FACS para discriminar entre células muertas y vivas.

40 Se usaron un Becton Dickinson FACSAria equipado con un ordenador y el programa informático FACSDiva (BD Biosciences, EE. UU.) para la separación celular individual.

Cultivo de linfocitos B

45 Se preparó el cultivo de los linfocitos B de conejo por un procedimiento similar al descrito por Zubler *et al.* (J. Exp. Med. 160 (1984) 1170-1183). En resumen, se incubaron linfocitos B de conejo con separación individual en placas de 96 pocillos con 200 μ l/pocillo de medio EL-4 B5 que contenía células Pansorbin (1:100000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), sobrenadante de timocitos de conejo al 5 % (carga 20100908, producción interna) y células de timoma EL-4-B5 murinas irradiadas con rayos gamma ($2,5 \times 10^4$ /pocillo) durante 7 días a 37 °C bajo CO₂ al 5 %. Se retiraron los sobrenadantes del cultivo de linfocitos B para el cribado. En paralelo, se conservó de inmediato el ARNm de las células restantes en 100 μ l de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) y se congelaron los lisados a -80 °C.

Ejemplo 4

Determinación de ácidos nucleicos que codifican el dominio variable del anticuerpo

Amplificación por PCR de dominios V y secuenciación

60 Se preparó ARN total usando el kit de ARN NucleoSpin 8/96 (Macherey&Nagel; n.º cat. 740709.4, 740698) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizaron todas las etapas en un sistema de manipulación de líquidos epMotion 5075 (Eppendorf). Se eluyó el ARN con 60 μ l de agua sin RNasa. Se usaron 6 μ l de ARN para generar ADNc por reacción de transcriptasa inversa usando Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen; n.º

cat. 18080-400) y un cebador Oligo(dT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 4 µl de ADNc para amplificar las regiones variables de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina (VH y VL) con AccuPrime SuperMix (Invitrogen; n.º cat. 12344-040) en un volumen final de 50 µl usando los cebadores rbHCfinal.up (AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGC TGCGCTGGCTTC; SEQ ID NO: 42) y rbHCfinal.do (CCATTGGTG AGGGTGCCCGAG; SEQ ID NO: 43) para la cadena pesada y rbLCfinal.up (CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC; SEQ ID NO: 44) y rbLCfinal.do (CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC; SEQ ID NO: 45) para la cadena ligera. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: inicio en caliente a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 70 °C, 45 s a 68 °C, y una extensión final a 68 °C durante 7 min.

Se cargaron ocho microlitros de la solución de PCR de 50 µl en un 48 E-Gel al 2 % (Invitrogen; n.º cat. G8008-02). Se limpiaron las reacciones de PCR positivas usando el kit NucleoSpin Extract II (Macherey&Nagel; n.º cat. 740609250) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se eluyeron en 50 µl de tampón de elución. Se secuenciaron 12 µl de productos de PCR purificados directamente en ambos sentidos usando rbHCfinal.up y rbHCfinal.do para cadenas pesadas y rbLCfinal.up y rbLCfinal.do para cadenas ligeras.

Ejemplo 5

Humanización de anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana de conejo

Se pueden humanizar los anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana de conejo de acuerdo con técnicas estándar, tales como injerto de CDR.

Ejemplo 6

Generación de vectores de expresión recombinantes

a) Generación de vectores para la expresión de cadenas pesadas de inmunoglobulina usando la región constante de IgG1 de ratón

Se ensambló el gen de fusión que codifica IgG1 de ratón que comprende la región constante de IgG1 de ratón (CH1, bisagra, CH2, CH3) y un dominio VH de anticuerpo anti-alfa-sinucleína derivado de conejo fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VH de anticuerpo específico anti-alfa-sinucleína a un elemento de secuencia que codifica la región constante de IgG1 de ratón.

La región constante de IgG1 de ratón tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```
AKTTPPSVYP LAPGSAAQTN SMVTLGCLVK GYFPEPVTVT WNSGSLSSGV
HTFPAVLQSD LYTLSSSVTV PSSTWPSETV TCNVAHPASS TKVDKKIVPR
DCGCKPCICT VPEVSSVFI F PPKPKDVLTI TLTPKVTCVV VDISKDDPEV
QFSWFVDDVE VHTAQTPRE EQFNSTFRSV SELPIMHQDW LNGKEFKCRV
NSAAFPAPIE KTISKTKGRP KAPQVYTIPP PKEQMAKDKV SLTCMITDFF
PEDITVEWQW NGQPAENYKN TQPIMDTDGS YFVYSKLNVO KSNWEAGNTF
TCSVLHEGLH NHHTEKSLSH SPGK
```

(SEQ ID NO: 46).

El vector de expresión también comprendió un origen de replicación del vector pUC18, lo que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción de la cadena pesada del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales en sentido 5' a 3':

- 45 - el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región no traducida 5' de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- 50 - una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada (VH),
- un ácido nucleico que codifica una región constante de IgG1 de ratón, y
- 55 - la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA BGH).

b) Generación de vectores para la expresión de cadenas ligeras de inmunoglobulina usando la región constante

kappa de Ig de ratón

5 Se ensambló el gen de fusión que codifica la cadena ligera kappa de ratón que comprende la región constante kappa de Ig de ratón (CL-kappa) y un dominio VL (kappa) de anticuerpo anti-alfa-sinucleína derivado de conejo fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VL (kappa) de anticuerpo anti-alfa-sinucleína a un elemento de secuencia que codifica la región constante kappa de Ig de ratón.

La región constante kappa de Ig de ratón tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

10 RADAAPT VSI FPPSSEQ LTS GGASVVC FLN NFYPKD INVK WKIDG SERQN
GVLNSWTDQD SKDSTYSMSS TLT LTKDEYE RHNSYTCEAT HKTSTSPIVK
SFNRNEC

(SEQ ID NO: 47).

15 El vector de expresión también comprendió un origen de replicación del vector pUC18, lo que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción de la cadena ligera kappa del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales en sentido 5' a 3':

- 20 - el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región no traducida 5' de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
25 - un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera (VL),
- un ácido nucleico que codifica una región constante kappa de Ig de ratón, y
30 - la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA BGH).

c) Generación de vectores para la expresión de cadenas ligeras de inmunoglobulina usando la región constante lambda de Ig de ratón

35 Se ensambló el gen de fusión que codifica la cadena ligera lambda de ratón que comprende la región constante lambda de Ig de ratón (CL-lambda) y un dominio VL (lambda) de anticuerpo anti-alfa-sinucleína derivado de conejo fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VL (lambda) de anticuerpo anti-alfa-sinucleína a un elemento de secuencia que codifica la región constante lambda de Ig de ratón.

40 La región constante lambda de Ig de ratón tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

GQPKSSPSVT LFPPSSEEELE TNKATLVCTI TDFYPGVVTV DWKVDGTPVT
QGMETTQPSK QSNNKYMASS YLT L TARAW E RHSSYS CQVT HEGHTVEKSL
SRADCS

(SEQ ID NO: 48).

45 El vector de expresión también comprendió un origen de replicación del vector pUC18, lo que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

50 La unidad de transcripción de la cadena ligera lambda del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales en sentido 5' a 3':

- el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región no traducida 5' de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
55 - una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera (VL),
60 - un ácido nucleico que codifica una región constante lambda de Ig de ratón, y

- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA BGH).

d) Generación de vectores para la expresión de cadenas de inmunoglobulina conjugadas con un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica

5 En el caso de vectores de expresión que codifican construcciones de la cadena pesada de IgG, la parte de IgG de la molécula estaba en una organización genómica, es decir, estaban presentes intrones en el péptido señal, entre los dominios VH y CH1, entre el dominio CH1 y la región bisagra, entre la región bisagra y el dominio CH2, y entre los dominios CH2 y CH3. A esto (C terminal/en el extremo 3') se fusionó un elemento de ADNc que codifica el módulo lanzadera cerebral. Para producir moléculas de anticuerpos que portaran solo un módulo de lanzadera cerebral por molécula de anticuerpo completa, se empleó la tecnología de "botón en ojal".

La cadena pesada de ojal comprende las siguientes mutaciones: T366W.

15 La cadena pesada de botón comprende las siguientes mutaciones: T366S/L368A/Y407V.

Opcionalmente, se puede introducir un enlace disulfuro artificial entre el residuo 354 de la cadena pesada de ojal y el residuo 349 de la cadena pesada de botón. Las mutaciones requeridas adicionalmente son S354C en la cadena pesada de ojal e Y349C en la cadena pesada de botón.

20 En el caso de los vectores de expresión que codifican construcciones de la cadena ligera de Ig, la parte kappa-Ig o lambda-Ig de la molécula estaba en una organización genómica, es decir, estaban presentes intrones en el péptido señal y entre los dominios VL y CL.

25 Además de la unidad/casete de expresión que incluye el gen deseado que se va a expresar, el plásmido de expresión de mamífero básico/estándar contiene

i) Generación de vectores para la expresión de cadenas pesadas de inmunoglobulina que contienen un módulo lanzadera usando la región constante de IgG1 humana con mutación "ojal"

30 Se ensambló el gen de fusión que codifica IgG1 humana que comprende la región constante de IgG1 humana (CH1, bisagra, CH2, CH3) y un dominio VH de anticuerpo anti-alfa-sinucleína derivado de conejo fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VH de anticuerpo anti-alfa-sinucleína a un elemento de secuencia que codifica para la región constante de IgG1 humana que contiene la mutación "ojal". La construcción estaba en una organización genómica, es decir, estaban presentes intrones en el péptido señal, entre los dominios VH y CH1, entre el dominio CH1 y la región bisagra, entre la región bisagra y el dominio CH2, y entre los dominios CH2 y CH3.

La región constante de Ig1 humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

40
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 49).

45 La región constante de ojal de Ig1 humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLWC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 50).

50 El vector de expresión también comprendió un origen de replicación del vector pUC18, lo que permite la replicación

de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción de la cadena pesada del anticuerpo de ojal comprende los siguientes elementos funcionales en sentido 5' a 3':

- 5 - el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (P-CMV),
- una región no traducida 5' de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- 10 - una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada (VH),
- 15 - un ácido nucleico que codifica una región constante de IgG1 humana con mutación de "ojal",
- opcionalmente un ácido nucleico que codifica un conector GS fusionado a un ácido nucleico que codifica un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica, y
- 20 - la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA BGH).

ii) Generación de vectores para la expresión de cadenas pesadas de inmunoglobulina que contienen un módulo lanzadera usando la región constante de IgG1 humana con mutación "botón"

Se ensambló el gen de fusión que codifica IgG1 humana que comprende la región constante de IgG1 humana (CH1, bisagra, CH2, CH3) y un dominio VH de anticuerpo anti-alfa-sinucleína derivado de conejo fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VH de anticuerpo anti-alfa-sinucleína a un elemento de secuencia que codifica para la región constante de IgG1 humana que contiene la mutación "botón". La construcción estaba en una organización genómica, es decir, estaban presentes intrones en el péptido señal, entre los dominios VH y CH1, entre el dominio CH1 y la región bisagra, entre la región bisagra y el dominio CH2, y entre los dominios CH2 y CH3.

La región constante de botón de Ig1 humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLSC
AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW
QQGNVVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
    
```

35 (SEQ ID NO: 51).

El vector de expresión también comprendió un origen de replicación del vector pUC18, lo que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción de la cadena pesada del anticuerpo de botón comprende los siguientes elementos funcionales en sentido 5' a 3':

- 40 - el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (P-CMV),
- 45 - una región no traducida 5' de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- 50 - un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada (VH),
- un ácido nucleico que codifica una región constante de IgG1 humana con mutación de "botón",
- opcionalmente un ácido nucleico que codifica un conector GS fusionado a un ácido nucleico que codifica un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica, y
- 55 - la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA BGH).

iii) Generación de vectores para la expresión de cadenas ligeras kappa de inmunoglobulina usando la región

constante kappa de Ig humana

Se ensambló el gen de fusión que codifica la cadena ligera kappa humana que comprende la región constante kappa de Ig humana (CL-kappa) y un dominio VL (kappa) de anticuerpo anti-alfa-sinucleína derivado de conejo fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VL (kappa) de anticuerpo anti-alfa-sinucleína a un elemento de secuencia que codifica la región constante kappa de Ig humana. La construcción estaba en una organización genómica, es decir, estaban presentes intrones en el péptido señal y entre los dominios VL (kappa) y CL-kappa.

El vector de expresión también comprendió un origen de replicación del vector pUC18, lo que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción de la cadena ligera kappa del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales en sentido 5' a 3':

- el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (P-CMV)
- una región no traducida 5' de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera (VL),
- una región constante kappa de IgG humana,
- opcionalmente un ácido nucleico que codifica un conector GS fusionado a un ácido nucleico que codifica un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA BGH).

iv) Generación de vectores para la expresión de cadenas ligeras lambda de inmunoglobulina usando la región constante lambda de Ig humana

Se ensambló el gen de fusión que codifica la cadena ligera lambda humana que comprende la región constante lambda de Ig humana (CL-lambda) y un dominio VL (lambda) de anticuerpo anti-alfa-sinucleína derivado de conejo fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VL (lambda) de anticuerpo anti-alfa-sinucleína a un elemento de secuencia que codifica la región constante lambda de Ig humana. La construcción estaba en una organización genómica, es decir, estaban presentes intrones en el péptido señal y entre los dominios VL (lambda) y CL-lambda.

El vector de expresión también comprendió un origen de replicación del vector pUC18, lo que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción de la cadena ligera lambda del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales en sentido 5' a 3':

- el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (P-CMV)
- una región no traducida 5' de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera (VL),
- una región constante lambda de IgG humana,
- opcionalmente un ácido nucleico que codifica un conector GS fusionado a un ácido nucleico que codifica un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA BGH).

Ejemplo 7

Producción recombinante de anticuerpos anti-alfa-sinucleína humana

Se produjeron los anticuerpos en células HEK293 transfectadas de forma transitoria (derivadas de la línea de

células de riñón embrionario humano 293) cultivadas en medio F17 (Invitrogen Corp.). Para la transfección de los respectivos vectores como se describe en el ejemplo 6, se usó el reactivo de transfección "293-Free" (Novagen). Se expresaron los anticuerpos y fusiones de anticuerpo-lanzadera de barrera hematoencefálica a partir de plásmidos de expresión individuales. Se realizaron las transfecciones como se especificaba en las instrucciones del fabricante. Se recogieron sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos recombinantes de tres a siete días después de la transfección. Se almacenaron los sobrenadantes a temperatura reducida (por ejemplo, -80 °C) hasta su purificación.

La información general con respecto a la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, en células HEK293 se da en: Meissner, P. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203.

Ejemplo 8

Purificación de anticuerpos recombinantes anti-alfa-sinucleína humana

Se filtraron los sobrenadantes de cultivo que contenían anticuerpos y se purificaron por dos etapas cromatográficas.

Se capturaron los anticuerpos por cromatografía de afinidad usando HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) equilibrada con PBS (KH₂PO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM), pH 7,4. Se retiraron las proteínas no unidas por lavado con tampón de equilibrado, y se recuperó el anticuerpo con tampón de citrato 25 M, pH3,1, que de inmediato después de la elución se ajustó a pH 6,0 con Tris-base 1 M, pH 9,0.

Se usó cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare) como segunda etapa de purificación. Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño en tampón histidina 20 mM, NaCl 0,14 M, pH 6,0. Se concentraron las soluciones que contenían anticuerpo con una unidad de filtro centrífugo Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se almacenaron a -80 °C.

Tabla: rendimientos promedio por litro de sobrenadante de cultivo

anticuerpo	rendimientos promedio por litro de sobrenadante de cultivo
0017	10 mg
0018	9,2 mg
0070	6,1 mg
0076	7,3 mg
0081	15 mg
Lanzadera 12F4	14,3 mg

Ejemplo 9

Caracterización de la especificidad de unión usando resonancia de plasmón superficial

Se aplicaron instrumentos BIAcore 2000, 3000 o T200 (GE Healthcare, BIAcore, Uppsala, Suecia) en todos los procedimientos descritos. Todas las etapas de inmovilización y ensayos de unión se realizaron a 25 °C. Las inmovilizaciones y ensayos de unión se realizaron (si no se menciona en especial) a 5 o 30 µl min⁻¹, respectivamente.

a) Caracterización de la unión de alfa-sinucleína monomérica a anticuerpos monoclonales inmovilizados

Tampones:

Tampón de inmovilización:

Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, polisorbato 20 (P20) al 0,05 % a pH 7,5

Tampón de captura y unión:

Hepes 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 al 0,05 %

Ensayo de unión de α -sinucleína-hexaHis monomérica purificada a anticuerpos monoclonales inmovilizados en el anticuerpo de captura

i) Inmovilización de anti-inmunoglobulina IgG de ratón caprino (anticuerpo de captura)

Se realizó la inmovilización de anti-IgG de ratón caprino (kit de captura de anticuerpo de ratón; n.º cat. BR-1008-38; GE Healthcare, Uppsala, Suecia) en tampón que contenía Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, P20 al 0,05 % a pH 7,5. En la primera etapa se transformaron los grupos carboxilo de la superficie del chip sensor CM5 en los ésteres de succinimida reactivos poniendo en contacto la superficie del sensor siete minutos con una solución de N-etil-N-dimetilaminopropilcarbodiimida (EDC) 0,2 M y N-hidroxisuccinimida 0,05 M (NHS). Después de la activación, se puso en contacto la superficie del sensor 3 min con el anti-IgG de ratón caprino a 30 µg/ml en tampón acetato de sodio 10 mM (pH 5,0). Se inmovilizó la IgG al nivel de aproximadamente 3000 UR (unidades de respuesta). Finalmente, se desactivó el exceso de grupos carboxílicos activados en la superficie con etanolamina (1 M, pH 8,5, 7 min).

ii) Captura de anticuerpos anti-alfa sinucleína

Se capturaron los anticuerpos anti-alfa sinucleína monoclonales (solución 100 nM en tampón de migración) en el anticuerpo IgG inmovilizado hasta que se alcanzó una cantidad de anticuerpo capturado de 200-250 UR. Se usó un canal del chip sensor con anticuerpo anti-murino caprino inmovilizado como canal de referencia.

iii) Experimento de unión de alfa-sinucleína monomérica con una marca hexahistidina N terminal

Se realizó el experimento de unión en un tampón que contenía Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 al 0,05 % a pH 7,5. Se valoró la alfa-sinucleína-hexaHis monomérica purificada hasta 334 nM (5 puntos, factor de dilución de 2) sobre la superficie de anticuerpos anti-alfa sinucleína monoclonales capturados. Después de cada valoración de alfa-sinucleína-hexaHis monomérica purificada, se retiró el complejo de alfa-sinucleína y anticuerpo anti-alfa sinucleína monoclonal del chip con pulsos cortos de una solución de glicina-HCl 10 mM (pH 1,7). Se capturaron nuevos anticuerpos anti-alfa sinucleína monoclonales en la superficie del chip después de esto.

b) Caracterización de anticuerpos anti-alfa sinucleína monoclonales que se unen a alfa-sinucleína monomérica inmovilizada por medio de marca His en un chip NTA (ácido nitrilotriacético)

Tampones:

Tampón de inmovilización:

Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, P20 al 0,05 %, pH 7,5

Tampón de unión:

Hepes 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 al 0,05 %

i) Inmovilización de alfa-sinucleína monomérica purificada en la superficie del sensor NTA

Se realizó la inmovilización de α -sinucleína-hexaHis monomérica (N terminal) en la superficie del sensor NTA (ácido nitrilotriacético) en un tampón de migración que contenía Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, P20 al 0,05 % a pH 7,5. En primer lugar se lavó la superficie del sensor NTA tres veces cada una durante 1 min con EDTA 0,35 M a un flujo de 5 µl/min. Después de esto se cargó la superficie del sensor con iones Ni²⁺ por un contacto de 1 min de la superficie del chip con NiCl₂ 500 µM en tampón de migración y se activó adicionalmente durante 7 min con EDC 0,2 M y solución de NHS 0,05 M. Además, se puso en contacto la alfa-sinucleína marcada con hexaHis en el tampón de migración (<0,1 µg/ml) con la superficie del sensor para lograr una superficie de baja densidad (hasta 5 UR) que permite la detección adicional de la unión monovalente de anticuerpos anti-alfa sinucleína monoclonales a alfa-sinucleína. Finalmente, se desactivaron los grupos restantes de éster activo durante 5 min con Tris 1 M, pH 7,5. Se usó un canal de flujo sin alfa-sinucleína inmovilizada como canal de referencia.

ii) Ensayo de unión con anticuerpos monoclonales con α -sinucleína inmovilizada

Se realizó el ensayo de unión en un tampón que contenía Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 al 0,05 % a pH 7,5. Se analizaron los anticuerpos anti-alfa sinucleína monoclonales a una concentración única de 100 nM para una respuesta de unión Sí/No o se valoraron en tampón de migración hasta una concentración de 100 nM (inyecciones únicas de 5 concentraciones con factor de dilución de 2) para estimar la cinética de unión y afinidad por alfa-sinucleína monomérica. Después del seguimiento de la curva de unión para cada concentración de cada anticuerpo anti-alfa sinucleína, se regeneró la superficie de alfa-sinucleína con dos pulsos cortos de ácido fosfórico 100 mM (2 x 1 min) para separar por lavado el anticuerpo unido y permitir el seguimiento de otra unión de anticuerpo.

c) Caracterización de anticuerpos anti-alfa sinucleína monoclonales que se unen a alfa-sinucleína monomérica inmovilizada en liposomas DOPC:DOPS en sensor L1

Tampones: tampón de inmovilización y de unión:

Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5

5 i) Preparación de liposomas DOPC:DOPS

10 Se evaporaron 25 mg/ml (7:3 (p/p)) de mezcla de lípidos DOPC:DOPS (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina: 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina) en cloroformo en un matraz de vidrio con corriente de argón bajo una campana de vacío para obtener una película lipídica en la pared del matraz. Se hidrató la película lipídica en tampón Hepes (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) para obtener una solución lipídica de tampón 5 mM. Se extruyó la solución lipídica con un Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, EE. UU.) haciendo pasar la solución lipídica 15 veces a través de filtros extrusores de 100 nm para obtener una solución de liposomas. La calidad y el tamaño de los liposomas se demostraron por dispersión de luz dinámica.

15 ii) Inmovilización de α -sinucleína monomérica purificada en liposomas DOPC:DOPS

20 Se realizó la inmovilización de alfa-sinucleína-hexaHis (marca N terminal) en liposomas DOPC:DOPS en un tampón que contenía Hepes 50 mM, NaCl 150 mM a pH 7,5. En primer lugar se lavaron todos los canales de flujo de una superficie del sensor L1 1 min con una solución de Chaps 20 mM para obtener un valor de referencia estable. Se diluyó la solución de liposomas DOPC:DOPS obtenida por extrusión 5 veces en tampón de migración y se cargó en la superficie del sensor de todos los canales de flujo para obtener niveles de inmovilización de aproximadamente 3000 UR. Se bloquearon todos los canales de flujo en la siguiente etapa con solución de BSA (seroalbúmina bovina) a 0,1 mg/ml para reducir la unión inespecífica de alfa-sinucleína en/a la superficie del sensor. Se diluyó la alfa-sinucleína en tampón de migración a una concentración de 5,0 μ g/ml y se inmovilizó en liposomas a baja densidad (<30 UR) en los canales de flujo seleccionados permitiendo la detección de anticuerpos monovalentes que se unen a alfa-sinucleína. Se usó un canal de flujo con liposomas inmovilizados pero sin alfa-sinucleína como canal de referencia.

30 iii) Ensayo de unión con anticuerpos monoclonales a alfa-sinucleína inmovilizada en liposomas DOPC:DOPS

35 En el ensayo de unión, se analizó cada anticuerpo a una concentración única de 100 nM para la respuesta de unión Sí/No o se valoró en tampón de migración sobre canales activos y de referencia hasta una concentración de 100 nM (5 puntos con factor de dilución de 2) para estimar la cinética de unión y afinidad por alfa-sinucleína. Después del seguimiento de la unión de anticuerpo, se regeneró la superficie del sensor durante 1 min con Chaps 20 mM y se equilibró con tampón de migración para la siguiente inmovilización de liposomas.

40 d) Caracterización de anticuerpos anti-alfa sinucleína monoclonales que se unen a fibrillas preformadas de alfa-sinucleína (PFF)

40 Tampones:

Tampón de inmovilización:

45 Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, P20 al 0,05 %, pH 7,5

Tampón de unión:

Hepes 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 al 0,05 %

50 i) Inmovilización de fibrillas preformadas de α -sinucleína en la superficie del sensor NTA

55 Se realizó la inmovilización con marca His de PFF de alfa-sinucleína (que contiene alfa-sinucleína marcada con marca hexaHis N terminal y alfa-sinucleína no marcada en proporción 1:10) en un sensor NTA en tampón de migración que contenía Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, P20 al 0,05 % a pH 7,5. En primer lugar se lavó la superficie del sensor NTA 1 min con una solución de EDTA 0,35 M a un flujo de 5 μ l/min. Después de esto se cargó la superficie del sensor con iones Ni^{2+} por un contacto de 1 min de la superficie del chip con solución de $NiCl_2$ 500 μ M en tampón de migración y se activó adicionalmente durante 7 min con EDC 0,2 M y solución de NHS 0,05 M. Se puso en contacto la solución diluida de PFF de alfa-sinucleína en tampón de migración con la superficie del sensor para lograr diversas densidades de fibrillas en la superficie del sensor (aproximadamente 20 UR, aproximadamente 200 UR y aproximadamente 2000 UR). Se realizó la desactivación de los grupos libres restantes de éster activo durante 5 min con Tris 1 M a pH 7,5. Se usó uno de los canales de flujo, donde no se inmovilizaron fibrillas de alfa-sinucleína, como canal de referencia.

65 ii) Ensayo de unión con anticuerpos monoclonales a PFF inmovilizada

Se realizó el seguimiento de la unión de cada anticuerpo anti-alfa-sinucleína en el experimento de valoración hasta

una concentración de 100 nM (5 puntos, factor de dilución de 2) en los cuatro canales en paralelo. Después del seguimiento de la curva de unión para cada anticuerpo, se regeneró la superficie de PFF de alfa-sinucleína con pulsos cortos (2 x 1 min) de ácido fosfórico 100 mM para separar por lavado el anticuerpo unido.

5 **RESULTADOS:**

La unión de diferentes anticuerpos a alfa-sinucleína como se informa en el presente documento también como fusiones con un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica y de determinados anticuerpos de referencia como se determina con SPR como se describe anteriormente se muestra en la tabla a continuación.

10

Tabla: Unión de anticuerpos anti-alfa-sinucleína a diferentes formas de alfa-sinucleína.

anticuerpo	unión a alfa-sinucleína monomérica		unión a alfa-sinucleína monomérica en liposomas	unión a fibrillas preformadas de alfa-sinucleína
	anticuerpo inmovilizado	sinucleína inmovilizada		
0017	Sí	Sí	Sí	Sí
0018	No	No	No	Sí
0070	no sometido a prueba	Sí	no sometido a prueba	Sí
0076	no sometido a prueba	No	no sometido a prueba	Sí
0081	no sometido a prueba	No	no sometido a prueba	Sí
sc211 (referencia)	Sí	Sí	Sí	Sí
12F4 (referencia)	No	No	No	Sí
Lanzadera 12F4 (referencia)	no sometido a prueba	Sí	no sometido a prueba	Sí
4B12 (referencia)	Sí	Sí	Sí	Sí
syn1 (referencia)	Sí	Sí	Sí	Sí

15 - el anticuerpo 0070 es la fusión lanzadera de barrera hematoencefálica del anticuerpo 0017 con el scFv del anticuerpo anti-receptor de transferrina 8D3;

- el anticuerpo 0076 es la fusión lanzadera de barrera hematoencefálica del anticuerpo 0018 con el scFv del anticuerpo anti-receptor de transferrina 8D3.

20 **Ejemplo 10**

Análisis de inmunohistoquímica y ensayos de citotoxicidad

Análisis de inmunohistoquímica de cortes cerebrales de EP

25

Se tiñeron criocortes (10 µm) de cerebro de paciente con enfermedad de Parkinson humano con de 5,0 µg/ml de IgG primaria del anticuerpo 0017, anticuerpo 0018 o anticuerpo 0057 (Fc murino) y se contratiñeron con de 5,0 µg/ml de anticuerpo anti-alfa-sinucleína de conejo (Cell Signaling; n.º cat. 2628S).

30

Como anticuerpos secundarios, se usaron el anticuerpo anti-IgG de ratón caprino conjugado con Alexa Fluor 488 (H+L) (Invitrogen, n.º cat. A11001) y el anticuerpo anti-IgG de conejo caprino conjugado con Alexa Fluor 594 (H+L) (de adsorción cruzada alta, Invitrogen, n.º cat. A11037).

35

Se obtuvieron imágenes de las muestras en un microscopio confocal LEICA (SP5x) usando una lente de 63x 1,2 AN, zoom 1,6x, estenopeico a 1,0 UA.

Se excitó Alexa 488 a 497 nm (10 % WLL); emisión a 505-571 nm (98 % HyD)

Se excitó Alexa 594 a 590 nm (8 % WLL); emisión a 596-680 nm (92 % HyD). Se promediaron las imágenes con

un promedio de línea de 5x.

Para los resultados, véase la figura 12.

5 Modelo de célula funcional de células neuronales humanas (LUHMES) para la protección de la toxicidad mediada por alfa sinucleína por anticuerpos terapéuticos

10 Se diferenciaron células LUHMES durante 5 días en placas de 384 pocillos como se describe en detalle a continuación. 24 h después de la siembra, se añadieron a las placas sobrenadantes de cultivo celular acondicionado de células SHSY5Y que crecían en medios de diferenciación LUHMES a las placas a una dilución 1:1 para inducir toxicidad de alfa-sinucleína mediada por exosomas. Los cultivos de control recibieron medios de diferenciación LUHMES. Se añadieron los anticuerpos que se van a someter a prueba conjuntamente con los medios SHSY5Y acondicionados a una concentración final de 10 µg/ml. Se determinó la viabilidad celular después de 4 días adicionales por el ensayo CellTiterGlo (Promega, n.º cat. REF G7571). Los valores de viabilidad se muestran como recuentos de CPS.

15 Procedimientos de cultivo celular

- 20 - Recubrimiento, medio y aditivos:
- Poli-L-Ornitina: Sigma-Aldrich, n.º cat. P-3655-100 mg
- Fibronectina (solución): Sigma-Aldrich, n.º cat. F-1141-5 mg
- 25 - DMEM/F-12 avanzado: Gibco/Invitrogen, n.º cat. 12634-010
- N-2: Gibco/Invitrogen, n.º cat. 17502048 o PAA F005-004
- L-glutamina: Sigma-Aldrich, n.º cat. G7513
- 30 - FGF: R&D Systems, n.º cat. 4114-TC (1 mg)
- GDNF: R&D Systems, n.º cat. 212-GD (50 µg)
- 35 - Tetraciclina: Sigma-Aldrich, n.º cat. T-7660
- cAMP: Sigma-Aldrich, n.º cat. D0627

40 Cultivo y diferenciación de LUHMES:

Recubrimiento (todas las placas y matraces han de ser Nunclon):

Recubrimiento	5 ml	7 ml	10 ml	14 ml	20 ml
Milli Q H ₂ O	4,75 ml	6,65 ml	9,5 ml	13,3 ml	19 ml
PLO (1 mg/ml)	250 µl	350 µl	500 µl	700 µl	1000 µl
Fibronectina (1 mg/ml)	5 µl	7 µl	10 µl	14 µl	20 l

45 Se llenó la solución de recubrimiento en placas y matraces (matraz T75: 7 ml; matraz T175: 14 ml; placa de 96 pocillos: 50 µl por pocillo, placa de 24 pocillos: 250 µl por pocillo, placa de 12 pocillos: 500 µl por pocillo, placa de 6 pocillos: 1 ml por pocillo). Se incubaron las placas y matraces durante al menos 3 h (o durante la noche) a 37 °C. Después de la incubación, se aspiró la solución de recubrimiento. Se lavaron los matraces dos veces con agua Milli Q. Antes del uso, se secaron las placas y matraces bajo la mesa de flujo laminar.

50 Medio de proliferación:

Medio de proliferación	10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
Advanced DMEM/F12	9,8 ml	19,6 ml	29,4 ml	39,2 ml	49 ml
L-Gln (200 mM)	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl
N2 (100x)	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl
FGF (160 µg/ml)	2,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl	12,5 µl

Medio de diferenciación:

Medio de diferenciación	10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
Advanced DMEM/F12	9,7 ml	19,4 ml	29,1 ml	38,8 ml	48,5 ml
L-Gln (200 mM)	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl
N2 (100x)	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl
cAMP (100 mM)	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl
Tetraciclina (1 mg/ml)	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl
GDNF (20 µg/ml)	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl

Subcultivo:

5 Se dividieron células que se cultivaron en un matraz de 75 cm² en medio de proliferación cuando alcanzaron una confluencia de un 80 %. En primer lugar, se lavaron las células dos veces con 10 ml de PBS. A continuación se añadieron 4 ml de ATV-tripsina (antes se mezclan 2 ml de la solución madre de 2 x ATV-tripsina con 2 ml de PBS). Se incubaron las células durante 3 min a 37 °C. Cuando se separaron las células, se añadieron 21 ml de medio Advanced DMEM/F12 sin aditivos. Se centrifugó la suspensión celular en un tubo Falcon de 50 ml a 300 x g durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 ml de medio Advanced DMEM/F12 sin aditivos. Se contaron las células en una cámara Neubauer.

15 Para el subcultivo, se dividieron las células después de 2, 3 o 4 d. Si el objetivo es dos días, se sembraron 2*10⁶ células (división 1:5) en un matraz de 75 cm². Para un cultivo de 3 días, son suficientes 1*10⁶ células (división 1:10) y para un cultivo de cuatro días, 500.000 células (división 1:20). Se sembraron las células en un matraz de 75 cm² que contenía 10 ml de medio de proliferación.

Diferenciación previa:

20 La diferenciación previa de células LUHMES tuvo lugar en un matraz de 175 cm². Después se sembraron 6*10⁶ células en 20 ml de medio de proliferación. Después de 24 h de fijación y proliferación, se intercambió el medio. Se reemplazó el medio de proliferación por medio de diferenciación. Después de 48 h adicionales se finalizó la diferenciación previa.

25 Se sembraron las células en placas de múltiples pocillos. Después se aspiró el medio. Se lavaron las células dos veces con 10 ml de PBS. Después de esto se añadieron 8 ml de ATV-tripsina (se mezclaron 4 ml de la solución madre de 2 x ATV-tripsina con 4 ml de PBS). Se incubaron las células durante de 3 a 5 min a 37 °C. Se añadieron 42 ml de Advanced DMEM/F12 sin aditivos. Se centrifugó la suspensión celular en un tubo Falcon de 50 ml a 300 x g durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 10 ml de medio de diferenciación. Se contaron las células en una cámara Neubauer.

Diferenciación:

35 Se llevó a cabo otra diferenciación en placas de cultivo celular recubiertas.

Placa de cultivo celular	6 pocillos	12 pocillos	24 pocillos	48 pocillos	96 pocillos
Área de crecimiento [cm ²]	9,6	3,5	1,9	1,1	0,33
Volumen de medio	2 ml	1 ml	500 µl	300 µl	100 µl
Número de células por pocillo [*1000]	1000	500	200-250	100-150	30-50

40 Se diluyeron las células con medio de diferenciación y se sembraron con el volumen apropiado de medio de diferenciación en las placas de cultivo celular. Después de 72 h adicionales se completa la diferenciación. Para los resultados véanse las figuras 7 y 9.

Ejemplo 11

Estabilidad térmica

45 Se determinaron los puntos de desnaturalización (puntos de fusión, T_f) de los anticuerpos anti-alfa-sinucleína monoclonales (2 µM) por un ensayo de desplazamiento térmico usando Sypro Orange como fluoróforo indicador.

Se ajustaron las transiciones de fusión con una ecuación sigmoidea de Boltzmann y se definió el punto de inflexión

a la amplitud de señal semimáxima como la temperatura de fusión T_f , donde se desnaturaliza la mitad del anticuerpo (figura 10). Se determinaron los valores de T_f entre 60 °C y 75 °C.

Tabla: puntos de fusión (T_f) de anticuerpos anti-alfa-sinucleína seleccionados

5

mAb	T_f [°C]		
	Tampón His	DPBS	TBS
0017	69,7	73,6	73,0
0018	69,2	71,9	71,8
0057	63,9	66,6	65,7

Ejemplo 12

Cartografía de epítomos

10

Se realizó la cartografía de epítomos en micromatrices peptídicas PepStar™ personalizadas, proporcionadas por JPT Peptide Technologies. Las secuencias de péptidos tuvieron una longitud de 15 residuos aminoácidos y se diseñaron para cubrir la secuencia completa de alfa-sinucleína humana (número de acceso UniProt: P37840). Los péptidos adyacentes tuvieron una secuencia coincidente de 11 aminoácidos. Los péptidos adicionales comprenden secuencias con sitios conocidos de mutaciones de alfa-sinucleína pertinentes de enfermedad (A30P, A53T, E57K) y secuencias para evaluar la reactividad cruzada para alfa-sinucleína de roedor. Además, se colocaron 12 péptidos/proteínas que sirven como controles para determinar la reactividad y especificidad de anticuerpos primarios y secundarios. Las proteínas fueron las siguientes: seroalbúmina bovina, IgG humana, IgG de conejo, IgG de ratón, proteína tau humana, alfa-sinucleína humana, beta-sinucleína humana, gamma-sinucleína humana, IgM humana, IgM de ratón, péptido de fosfotirosina, alfa-sinucleína triple-prolina mutada humana (A30P, A56P, A76P).

15

20

Se realizó la cartografía de epítomos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla: datos de anticuerpos anti-alfa-sinucleína seleccionados de acuerdo con la cartografía de péptidos.

25

anticuerpo	epítomo
0017	aa97-111: KDQLGKNEEGAPQEG aa101-15: GKNEEGAPQEGILED epítomo lineal, no se prevé reactividad cruzada de especies e isoformas
0018	no se detectan péptidos, detección de sinucleína TP
12F4 (anticuerpo de referencia)	no se detectan péptidos, detección de sinucleína TP
syn211 (anticuerpo de referencia)	aa113-127: LEDMPVDPDNEAYEM aa117-131: PVDPDNEAYEMPSEE detección de sinucleína TP

Ejemplo 13

Marcaje *in vivo* breve de la patología de alfa-sinucleína por conjugados anticuerpo anti-alfa sinucleína-módulo lanzadera de barrera hematoencefálica

30

Diseño de estudio

A tres grupos de ratones transgénicos Thy1-(A30P)alfa-sinucleína de 15 meses (ratones Kahle; n=3 por grupo) y controles naturales (n=1 por grupo) se les inyectaron tres conjugados anticuerpo anti-alfa sinucleína-módulo lanzadera de barrera hematoencefálica diferentes:

35

40

- anticuerpo 0070 -> conjugado anticuerpo 0017-scFab8D3
- anticuerpo 0076 -> conjugado anticuerpo 0018-scFab8D3
- referencia -> conjugado 12F4-scFab8D3

Se incluyeron un ratón transgénico y un ratón natural como control no inyectado. El estudio englobó un total de 14 ratones.

45

Tinción/detección de mAb-lanzadera cerebral unido en el tejido cerebral

5 La ocupación diana en el cerebro se detectó con un anticuerpo anti-hulgG marcado con AF555 en cortes cerebrales en criótomo de 20 µm (4 por ratón; fijados con acetona fijada, bloqueados con NGS). Se realizó una tinción conjunta: vasos sanguíneos (anti-podocalixina, AF647); DAPI.

Resultado

10 Parénquima del tronco encefálico: varía de grandes estructuras acumuladas neuríticas/alfa-sinucleína a tinción puntiforme difusa similar a una tinción sináptica.

La patología neurítica (= el rasgo característico patológico principal en este modelo de ratón) se restringe al tronco encefálico y es altamente variable de un ratón a otro.

15 Todo el cerebro y también en ratones no transgénicos: principalmente tinción punteada; similar a una tinción sináptica.

Véase la figura 11.

20 **Ejemplo 14****Síntesis y cartografía de epítomos por CelluSpots™**

25 La matriz peptídica para análisis de epítomos del anticuerpo 0018 se preparó empleando la tecnología Intavis CelluSpots™. En este enfoque, se sintetizaron péptidos con un sintetizador automatizado (Intavis MultiPep RS) en discos de celulosa modificados que se disuelven después de la síntesis. A continuación se colocaron las soluciones de los péptidos individuales que permanecen unidos covalentemente a la celulosa macromolecular sobre portaobjetos de microscopio recubiertos. Se llevó a cabo la síntesis por CelluSpots™ por etapas utilizando química de 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) en discos de celulosa aminomodificados en una placa de síntesis de 384 pocillos. En cada ciclo de acoplamiento, se activaron los correspondientes aminoácidos con una solución de DIC/HOBt en DMF. Entre las etapas de acoplamiento, se taparon los grupos amino sin reaccionar (es decir, libres) con una mezcla de anhídrido acético, diisopropiletilamina y 1-hidroxibenzotriazol. Tras la terminación de la síntesis, se transfirieron los discos de celulosa a una placa de 96 pocillos y se trataron con una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), diclorometano, triisopropilsilano (TIS) y agua para desprotección de la cadena lateral. 35 Después de la retirada de la solución de escisión, se disuelven los péptidos unidos a celulosa con una mezcla de TFA, TFMSA (ácido trifluoroetanosulfónico), TIS y agua, se precipitan con éter diisopropílico y se resuspenden en DMSO. Se colocaron posteriormente estas soluciones peptídicas sobre placas Intavis CelluSpots™ usando un robot situador en portaobjetos Intavis.

40 Para el análisis de epítomos, se lavaron los portaobjetos preparados con etanol y después de esto con TBS (solución salina tamponada con TRIS; Tris 50 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 8) antes de que se llevara a cabo una etapa de bloqueo durante 16 horas a 4 °C con 5 ml 10x reactivo de bloqueo Western (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), 2,5 g de sacarosa en TBS, Tween-20 al 0,1 %. Después de lavar con TBS-T (TBS+Tween-20 al 0,1 %), se incubaron los portaobjetos con una solución (1 µg/ml) del anticuerpo 0018 en TBS 45 que comprendía Tween-20 al 0,1 % a temperatura ambiente durante 2 horas. Después del lavado, se incubaron los portaobjetos para la detección con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:20000 en TBS-T) seguido de incubación con sustrato DAB (3,3'-diaminobencidina)/tampón peróxido (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se cuantificaron SPOT positivos para ELISA y a través de asignación de las correspondientes secuencias peptídicas, se identificaron los 50 epítomos de unión a anticuerpo.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para los propósitos de claridad de comprensión, no se deben interpretar las descripciones y ejemplos como limitantes del alcance de la invención.

55

ES 2 821 904 T3

<400> 9

Val Ile Tyr Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 10

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRL1

<400> 10

10 Gln Ala Ser Gln Asn Val Tyr Gly Asp Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> CDRL2

<400> 11

Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

20 <210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRL3

25 <400> 12

Gln Gly Glu Phe Leu Cys Thr Thr Ser Asp Cys Phe Thr
1 5 10

<210> 13

<211> 115

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada

<400> 13

ES 2 821 904 T3

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

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

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

Val Ile Tyr Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Val Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp
85 90 95

Gly Thr Asp Lys Thr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Leu
115

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera

<400> 14

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

Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Tyr Gly Asp Asn
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Glu Phe Leu Cys Thr
85 90 95

Thr Ser Asp Cys Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gly Val Val Val Arg
100 105 110

10

<210> 15

<211> 3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDRH1

 5 <400> 15

Arg Tyr Ala
 1

 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDRH2

 <400> 16

Asn Ser Ser Gly Ala
 1 5

 15 <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> CDRH3

 <400> 17

Trp Thr Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Phe Gln Gly Phe Asn Ile
 1 5 10

 <210> 18
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDRL1

 <400> 18

Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asp Leu Ala
 30 1 5

 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> CDRL2

 <400> 19

Arg Ala Ser Lys Leu Ala
 1 5

ES 2 821 904 T3

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> CDRL3

<400> 20

Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Met Gly Ala
1 5 10

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDRH1

15 <400> 21

Arg Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CDRH2

<400> 22

Val Ile Asn Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

25 <210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> CDRL1

<400> 23

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> CDRL2

<400> 24

Arg Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 25
<211> 12
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDRL3

<400> 25

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Met Gly Ala
1 5 10

10 <210> 26
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> dominio variable de la cadena pesada

<400> 26

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

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

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

Val Ile Asn Ser Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Glu Thr Ser Thr Thr Val Glu Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Thr
85 90 95

Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Phe Gln Gly Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
115

20 <210> 27
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> dominio variable de la cadena ligera

25 <400> 27

ES 2 821 904 T3

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn
20 25 30

Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln
65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp
85 90 95

Ala Asp Met Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRH1

<400> 28

Arg Asp Thr Met Ile

1 5

10 <210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CDRH2

<400> 29

Ser Ile Tyr Thr Asp Ser Gly Asn Thr Trp

1 5 10

<210> 30

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRH3

<400> 30

Asn Phe Ser Val

25 1

ES 2 821 904 T3

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> CDRL1

<400> 31

Val Tyr Asn Ser Asp Arg
1 5

<210> 32
10 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDRL2

15 <400> 32

Val Ser Lys Leu Ala
1 5

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDRL3

<400> 33

Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Ser Ser Ala Glu Cys
1 5 10

25 <210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> CDRH2

<400> 34

Ser Ile Tyr Thr Asp Ser Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 13
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDRL1

<400> 35

Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Ser Asp Arg Leu Ala
 1 5 10

<210> 36

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRL2

<400> 36

Asp Val Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

10

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> CDRL3

<400> 37

Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Ser Ser Ala Glu Cys Asn Val
 1 5 10

20

<210> 38

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada

25

<400> 38

ES 2 821 904 T3

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asp Thr
20 25 30

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

Ser Ile Tyr Thr Asp Ser Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg
65 70 75 80

Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95

Asn Phe Ser Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
100 105 110

<210> 39

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera

<400> 39

Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Gly
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Ser Asp
20 25 30

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Met Arg Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Ser
85 90 95

10 Ser Ala Glu Cys Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 40

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 40

ES 2 821 904 T3

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
35 40 45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65 70 75 80

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

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

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

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

<210> 41
<211> 18
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido conector

<400> 41

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

10 Gly Ser

<210> 42
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> rbHCfinal.up

<400> 42
aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc

37

20 <210> 43
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> rbHCfinal.do

	<400> 43		
	ccattggtga ggggtgcccg g		21
	<210> 44		
	<211> 34		
5	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> rbLCfinal.up		
	<400> 44		
10	aagcttgcca ccatggacay gagggccccc actc		34
	<210> 45		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> rbLCfinal.do		
	<400> 45		
	cagagtrctg ctgaggttgt aggtac		26
	<210> 46		
20	<211> 324		
	<212> PRT		
	<213> Mus musculus		
	<400> 46		

ES 2 821 904 T3

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
 100 105 110

Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
 115 120 125

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
 130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
 145 150 155 160

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 165 170 175

Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
 180 185 190

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro

ES 2 821 904 T3

<213> Mus musculus

<400> 48

Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro
35 40 45

Val Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

Lys Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu
65 70 75 80

Arg His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val
85 90 95

Glu Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
100 105

<210> 49

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 49

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

ES 2 821 904 T3

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
 Lys 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 Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu 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

<210> 50
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 821 904 T3

<220>

<223> región constante de ojal de Ig1 humana

<400> 50

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

Lys 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

ES 2 821 904 T3

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 Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp 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

<210> 51

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> región constante de botón de Ig1 humana

<400> 51

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

ES 2 821 904 T3

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

Lys 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 Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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

<210> 52

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de receptor de transferrina humana

ES 2 821 904 T3

<400> 52

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

<210> 53

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de receptor de transferrina humana

<400> 53

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

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> fragmento de receptor de transferrina humana

<400> 54

Gln Ser Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro Glu Gly Tyr
 1 5 10 15

20 <210> 55

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector peptídico

25 <400> 55

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

30 <210> 56

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

ES 2 821 904 T3

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

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

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

Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Val Pro Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Val
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 57

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

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Val
65 70 75 80

Glu Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante L104V y L106I de SEQ ID NO: 57

ES 2 821 904 T3

<400> 58

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

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp
20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Arg Val Gln Val
65 70 75 80

Glu Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana que comprende
- 5 (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;
- 10 (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
- (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;
- (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; y
- 15 (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.
2. El anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-alfa-sinucleína es humanizado.
- 20 3. El anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana comprende además una región estructural humana aceptora.
4. El anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que
- 25 a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que
- 30 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 17,
- ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal puede estar presente o ausente, y
- 35 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,
- b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que
- 40 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,
- ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,
- 45 y
- c) el anticuerpo
- i) inhibe la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neuroglíocitos humanos, y/o
- 50 ii) inhibe la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, y/o
- iii) reduce la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en células mesencefálicas humanas de Lund (LHUMES), en el que la numeración en la región Fc está de acuerdo con el índice EU de Kabat.
- 55 5. El anticuerpo anti-alfa-sinucleína humana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que
- 60 a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo comprendiendo cada una en sentido N a C terminal un dominio variable de la cadena pesada, una región constante de la cadena pesada, un conector peptídico y un fragmento de anticuerpo scFab o scFv, que se une específicamente al receptor de transferrina humana, en el que
- 65 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 17,
- ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal puede

estar presente o ausente, y

iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,

5 b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25,

10 ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,

y

15 c) el anticuerpo

i) inhibe la citotoxicidad inducida por alfa-sinucleína en neuronas y neuroglíocitos humanos, y/o

20 ii) inhibe la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, y/o

iii) reduce la actividad caspasa inducida por alfa-sinucleína en células LHUMES,

25 en el que la numeración en la región Fc está de acuerdo con el índice EU de Kabat.

6. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 7. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como medicamento.

8. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Figura 1

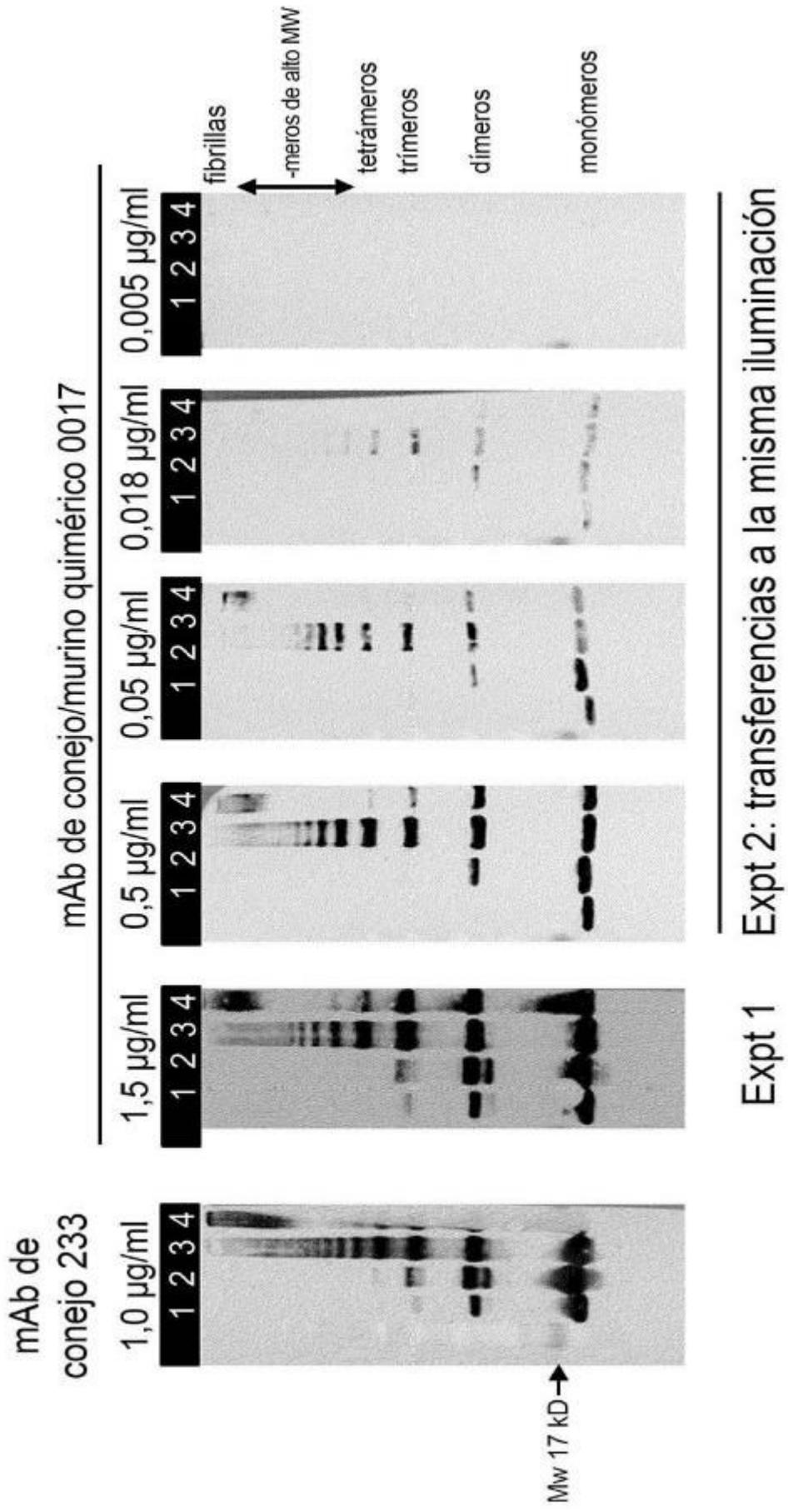


Figura 2

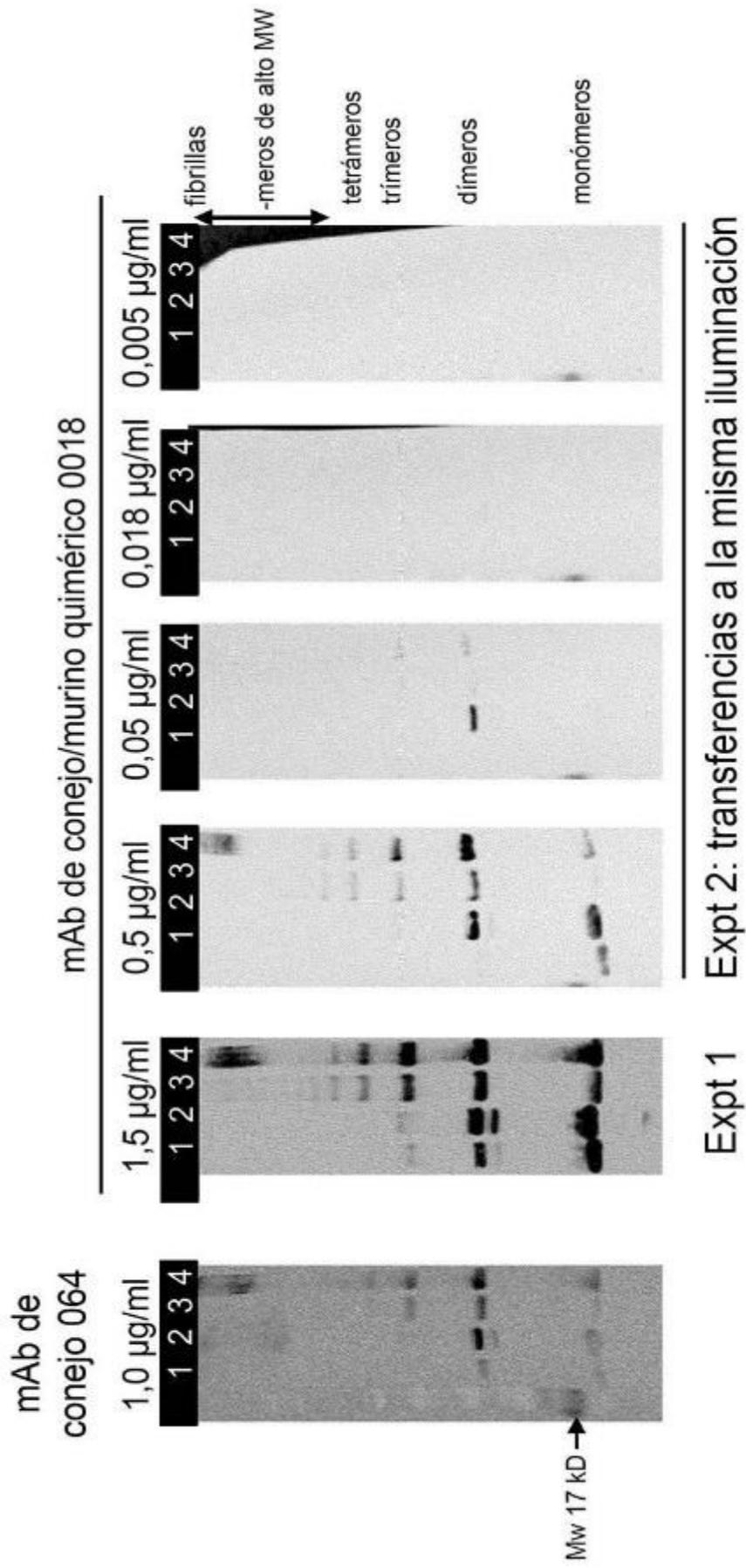


Figura 3

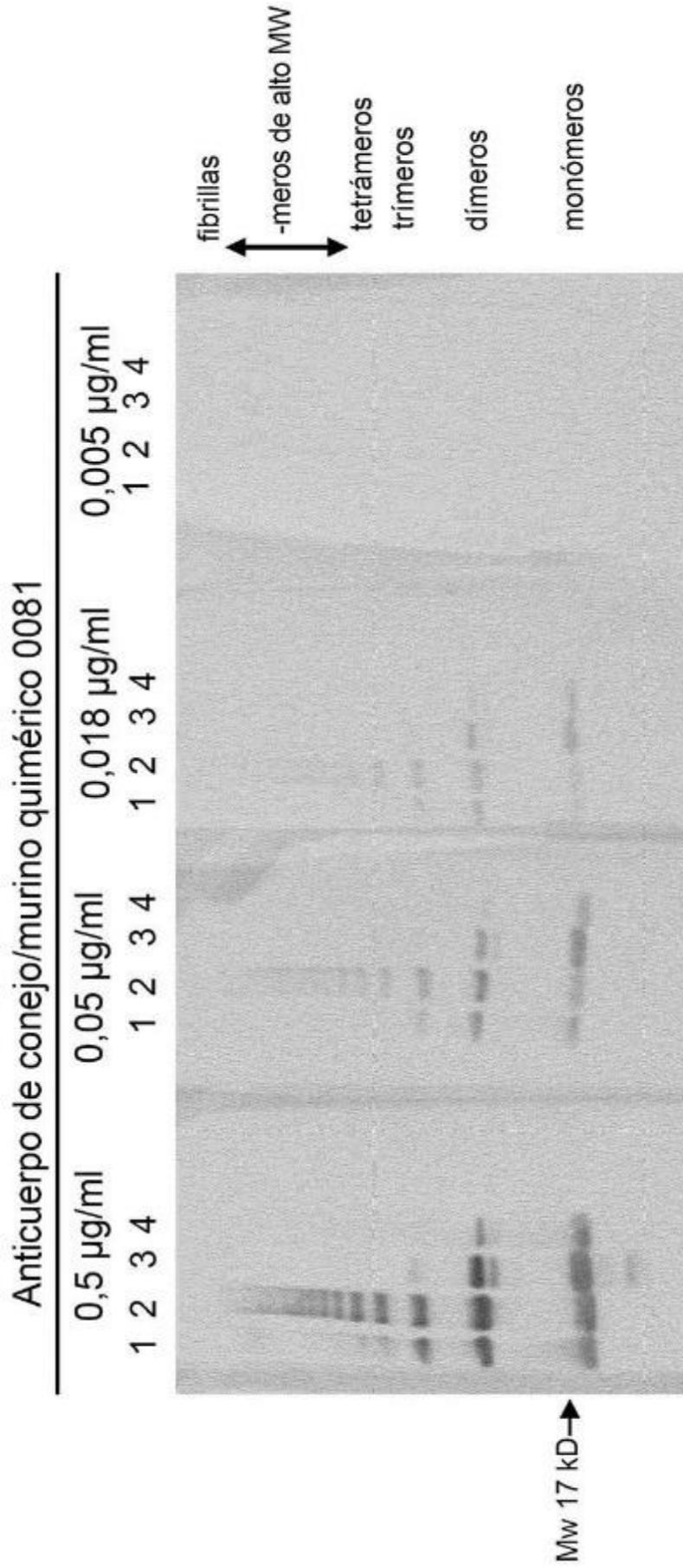


Figura 4

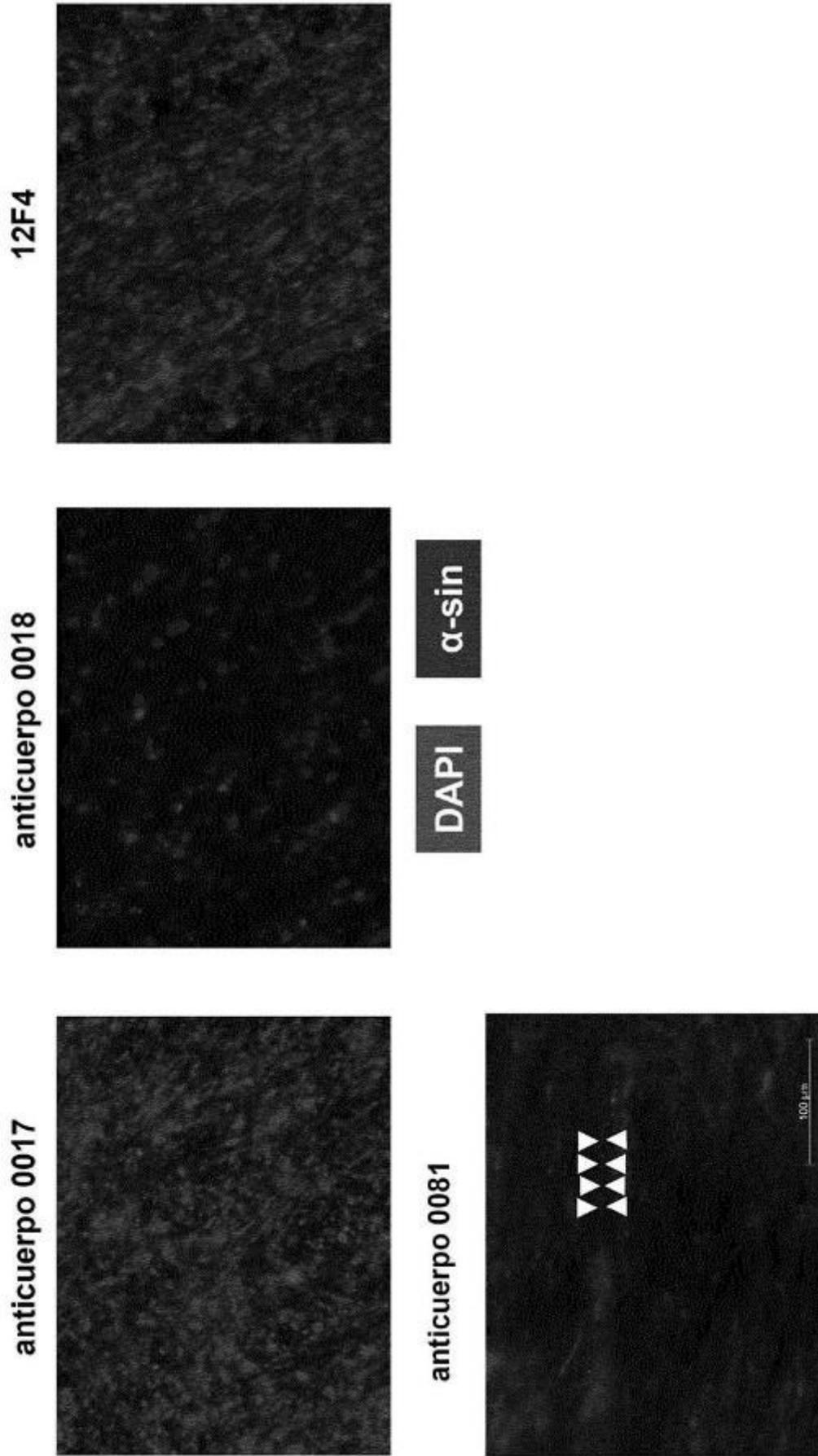


Figura 5

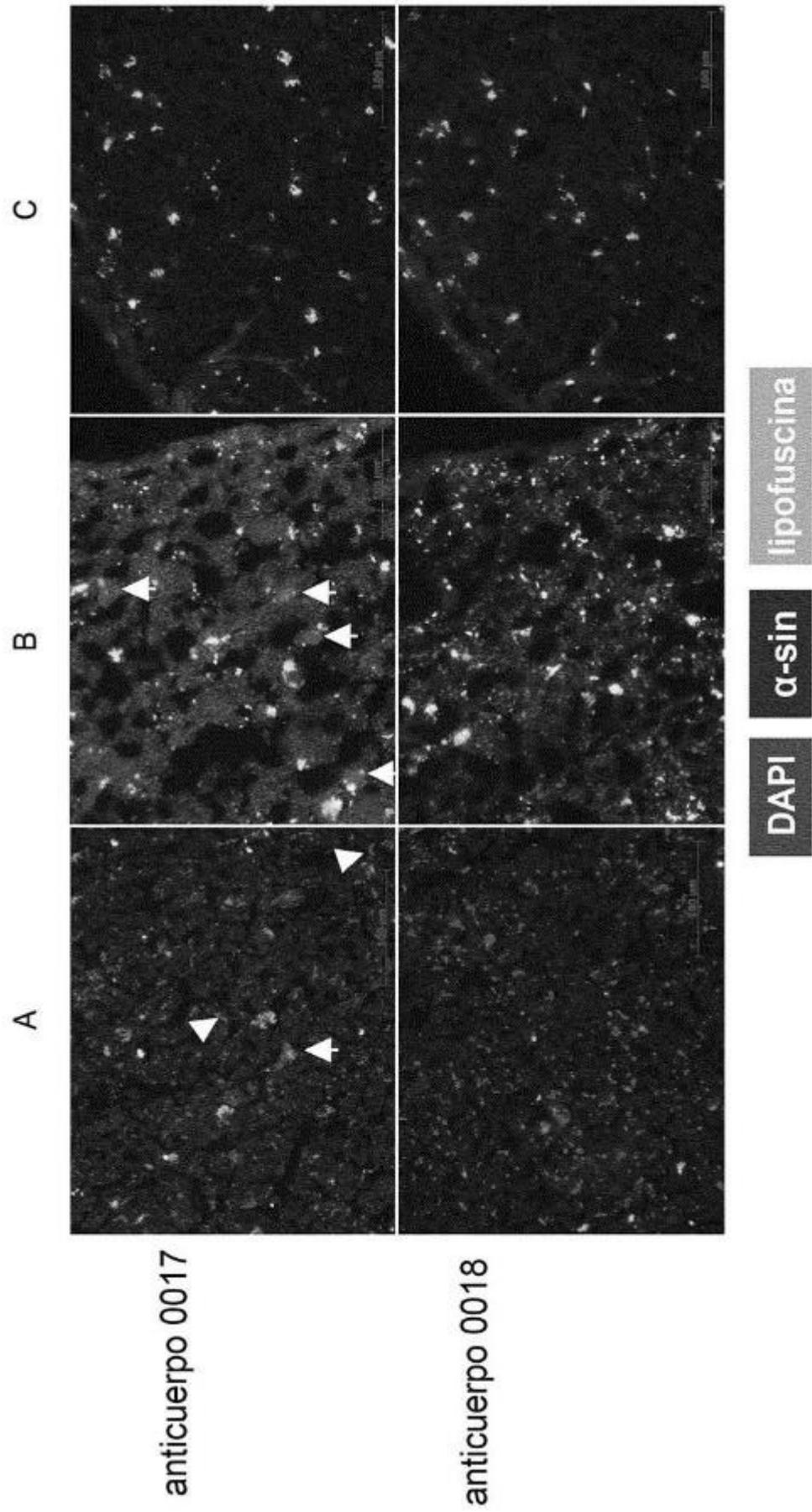


Figura 6

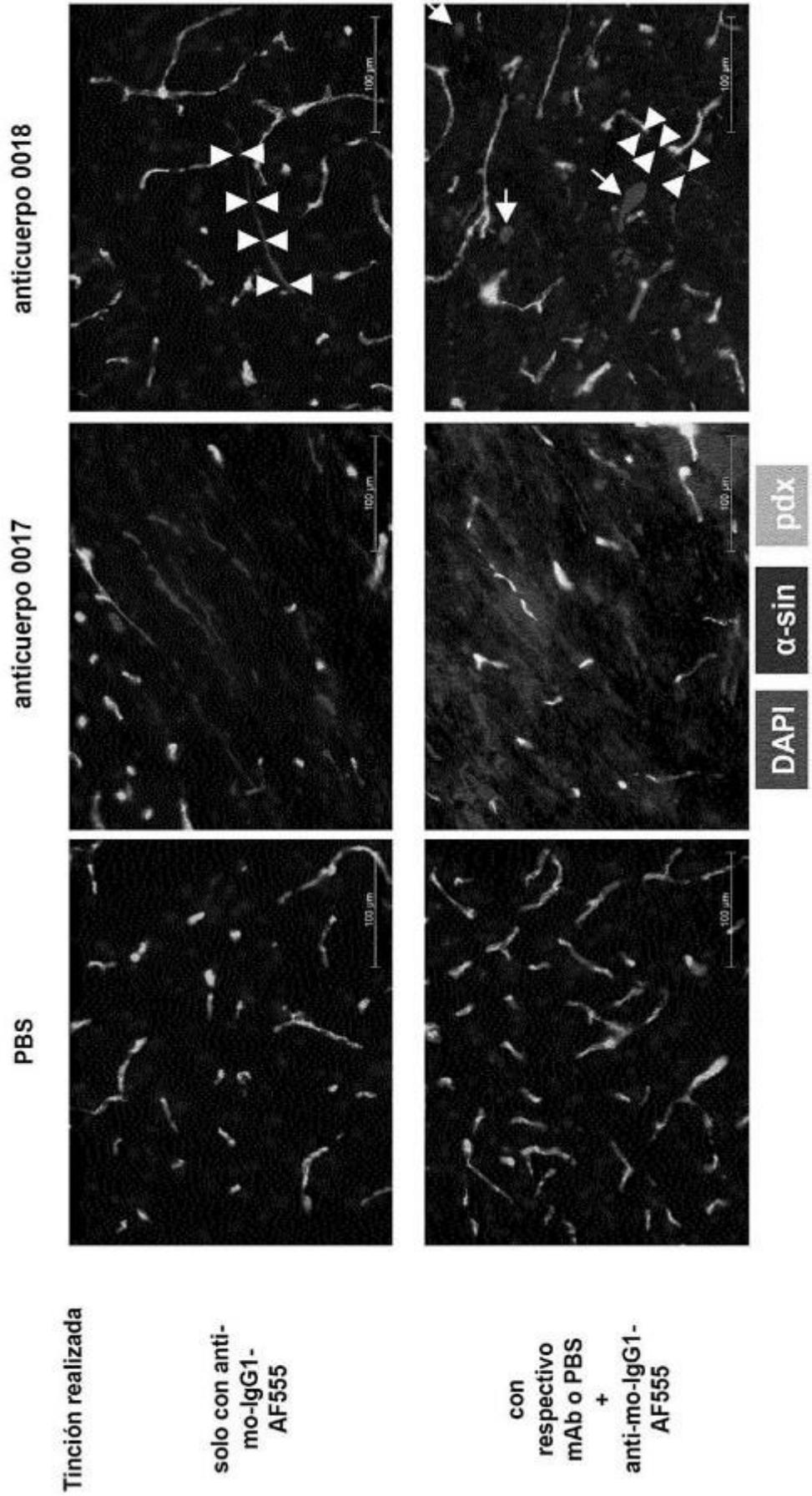
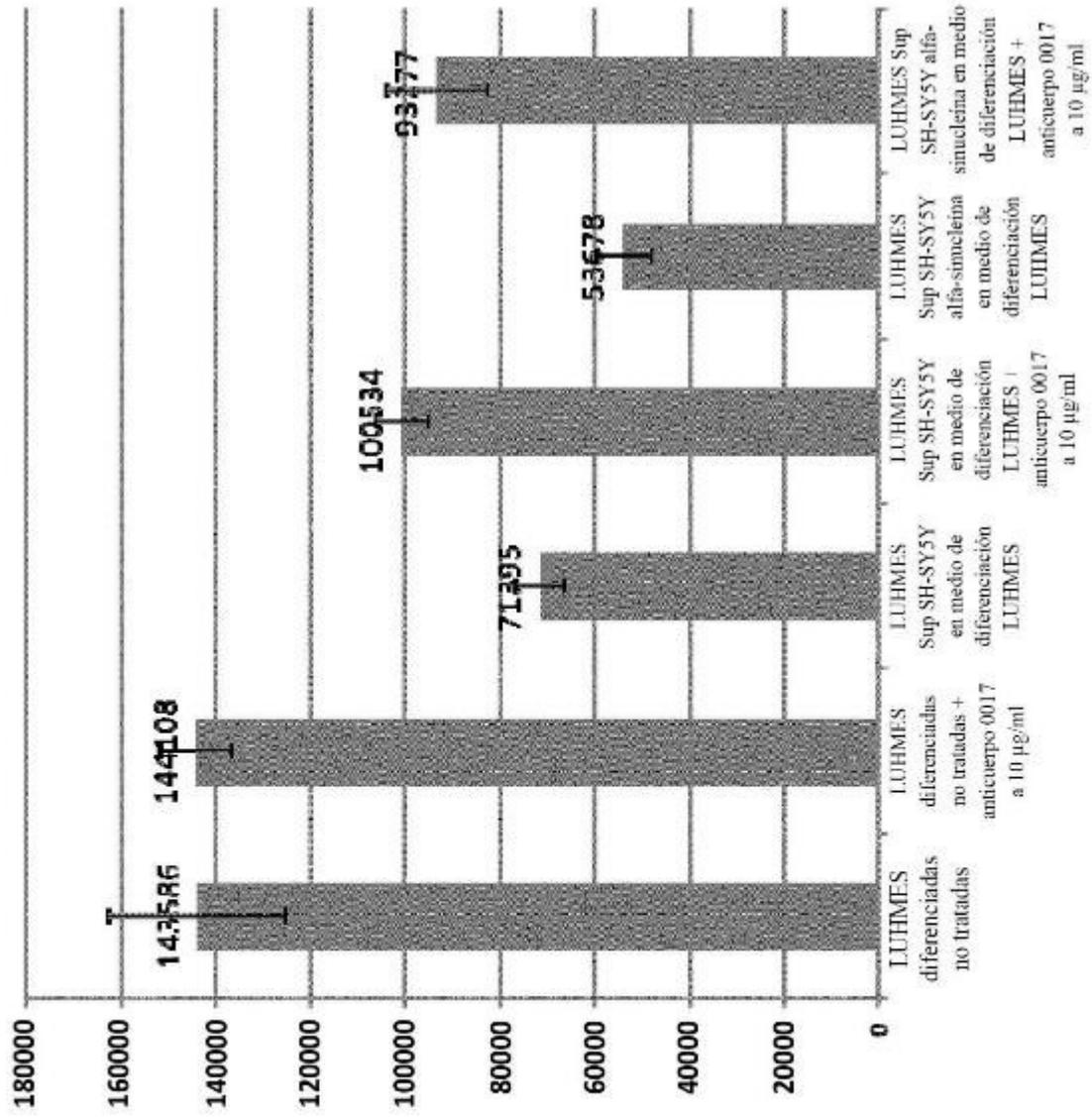
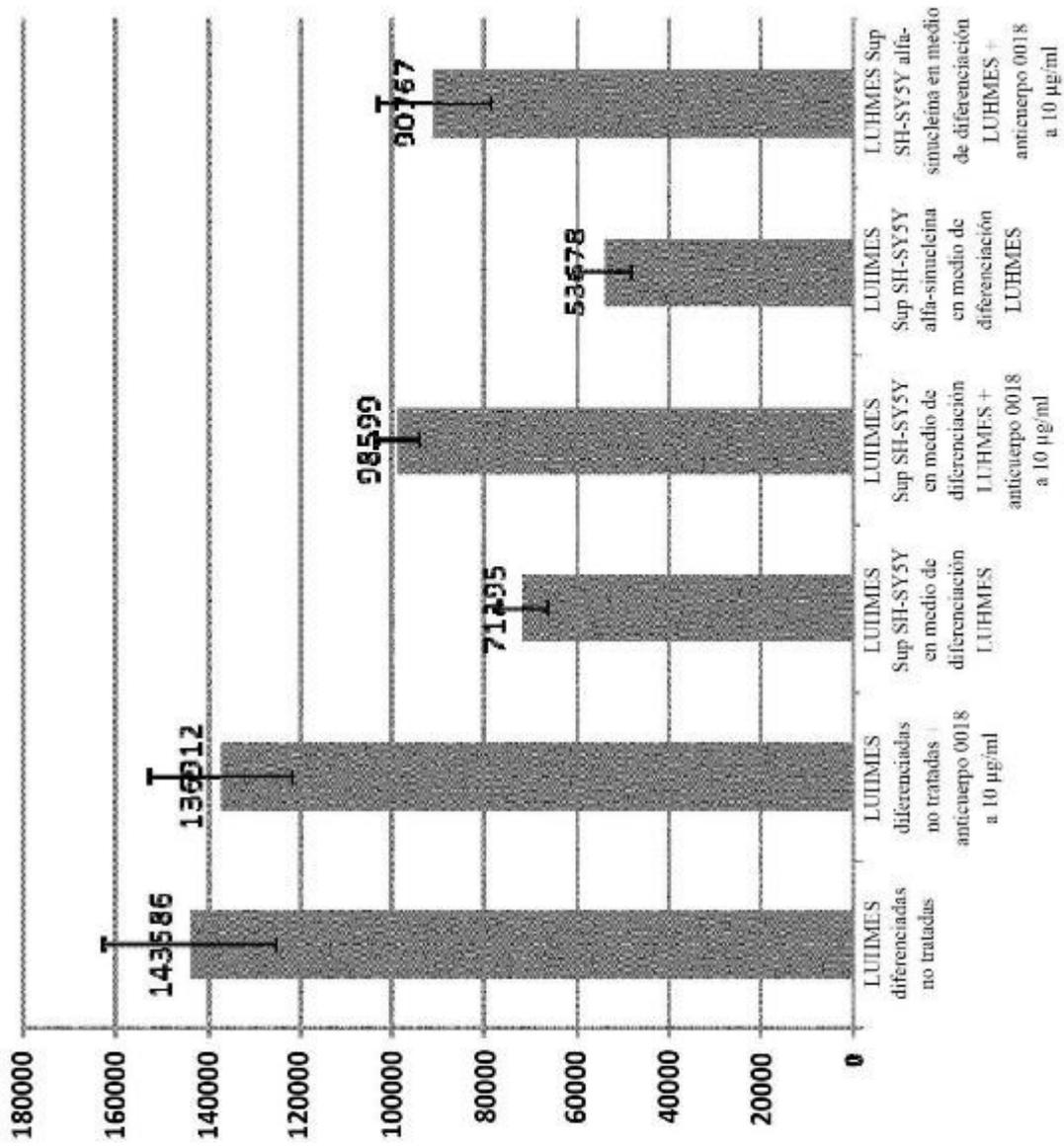


Figura 7

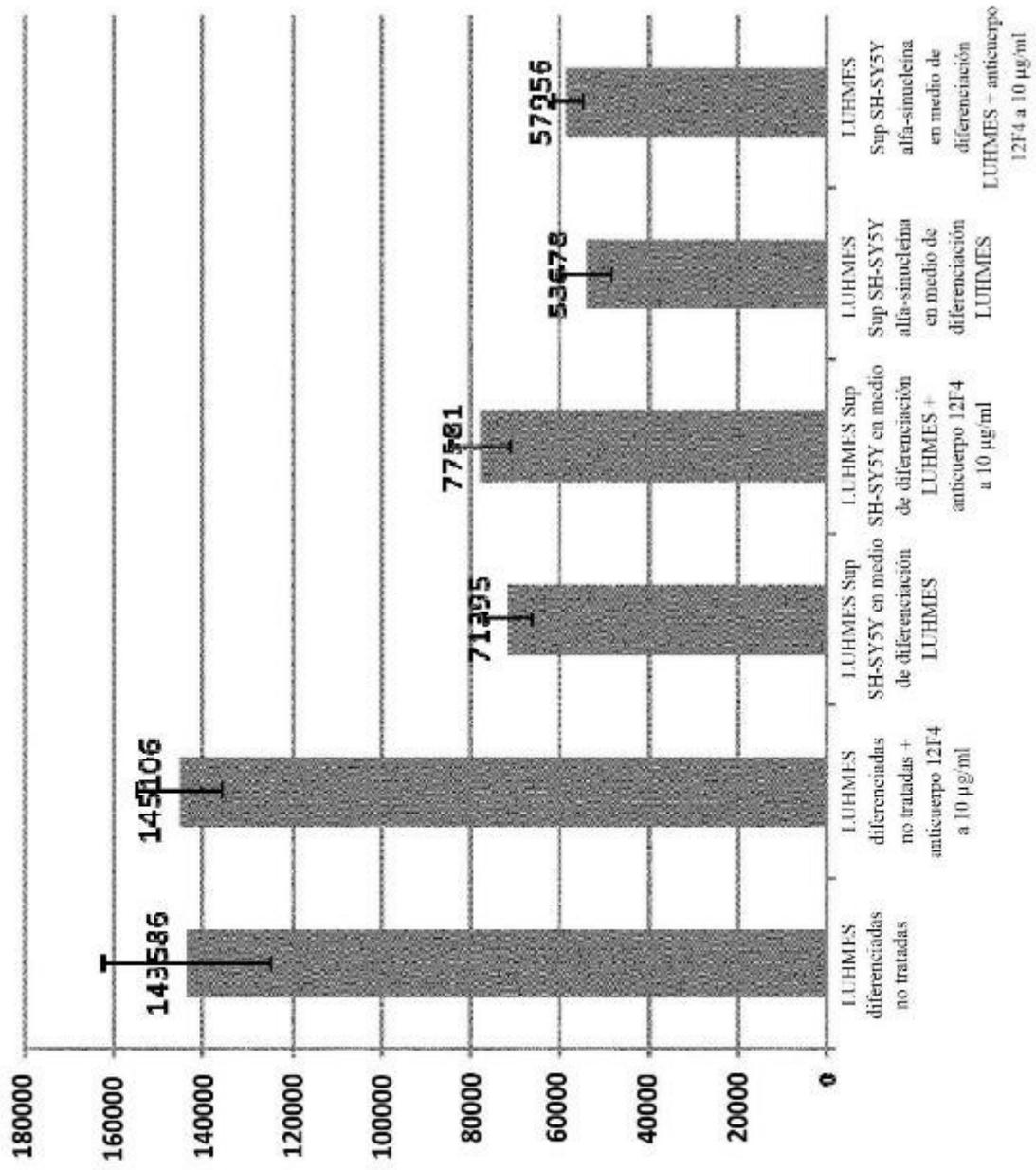
(A) anticuerpo 0017



(B) anticuerpo 0018



(C) anticuerpo 12F4



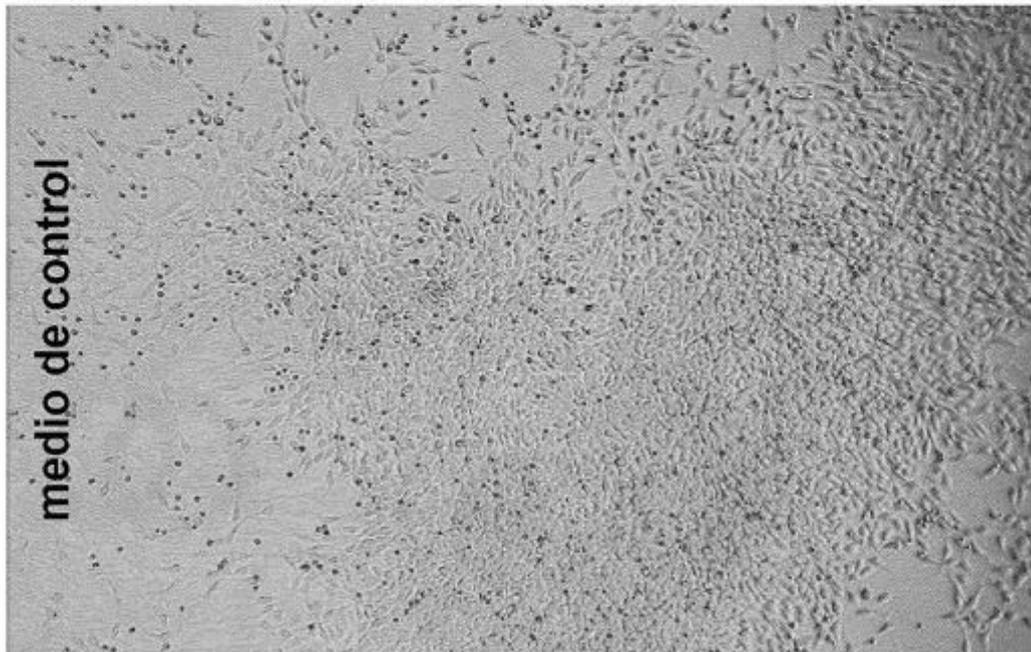
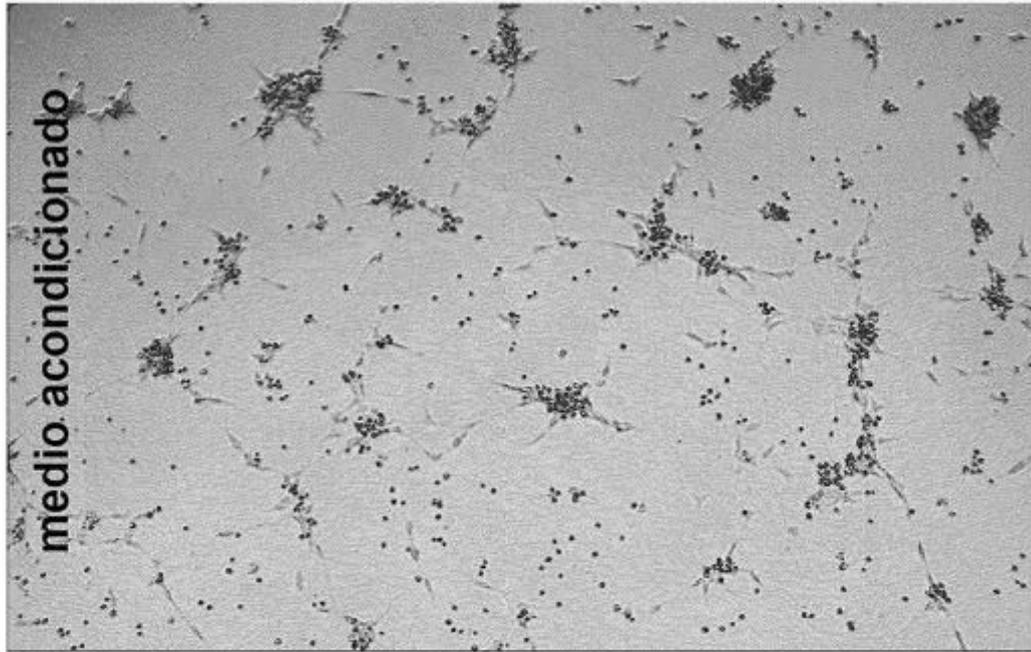
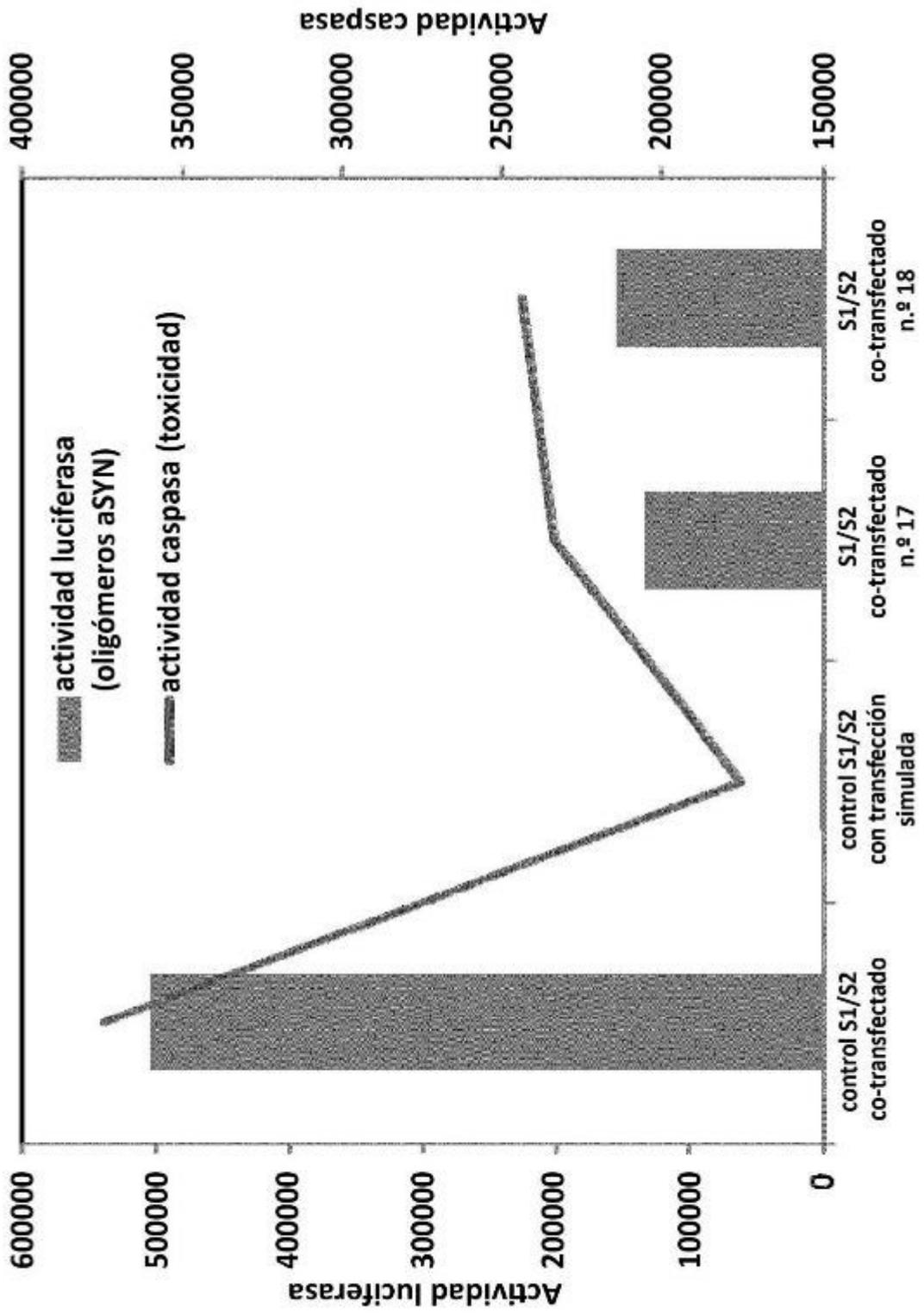


Figura 8

Figura 9



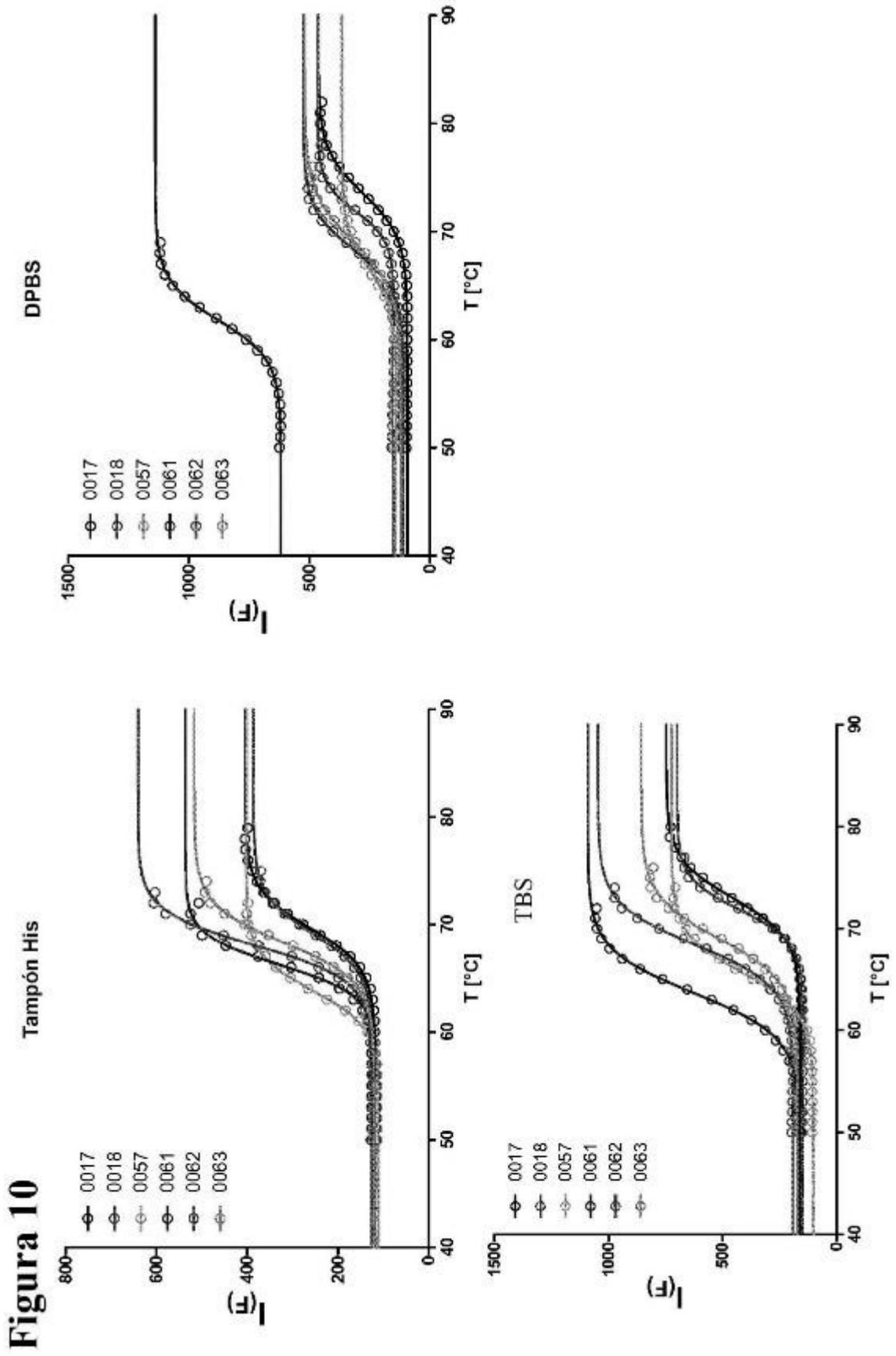
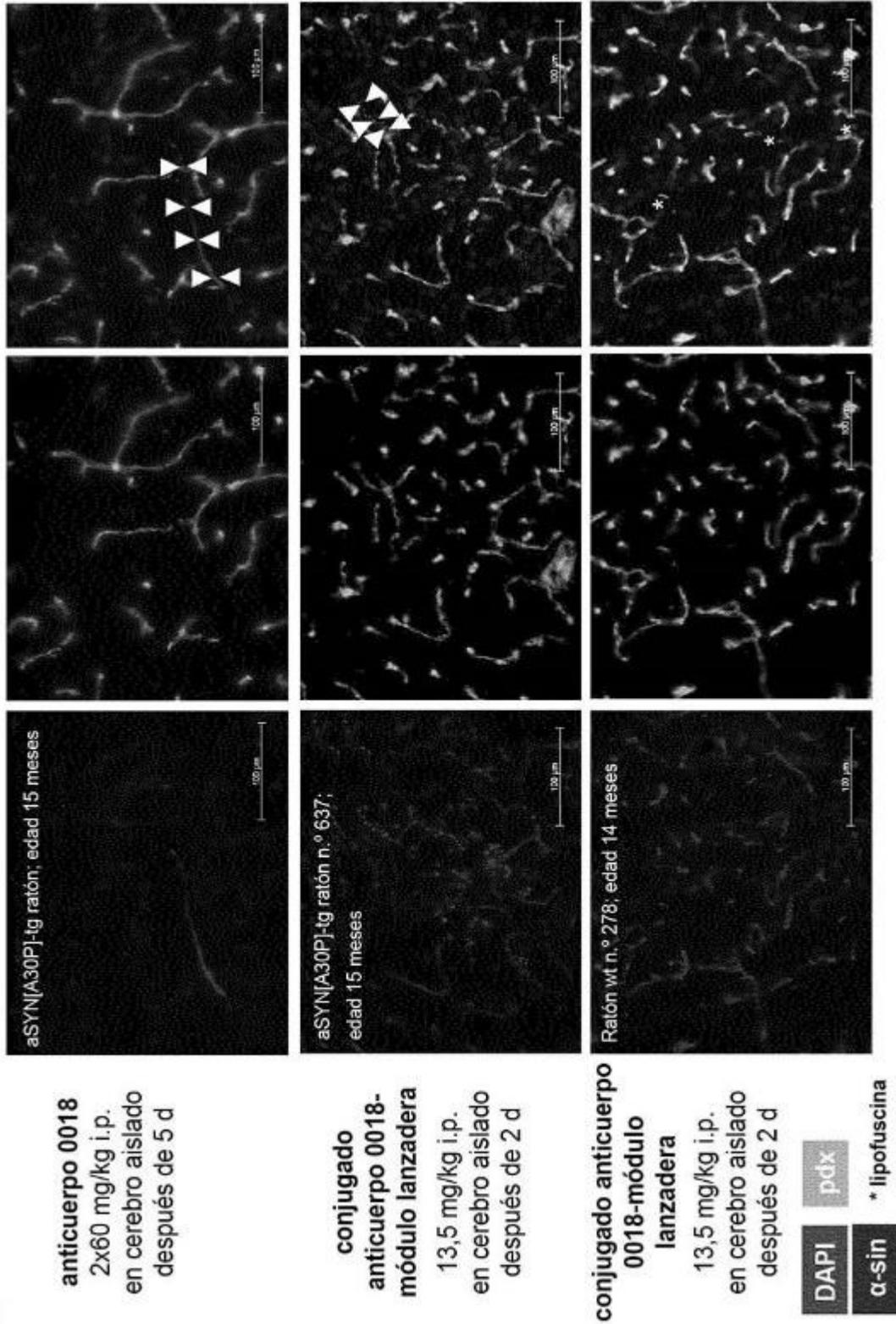


Figura 10

Figura 11



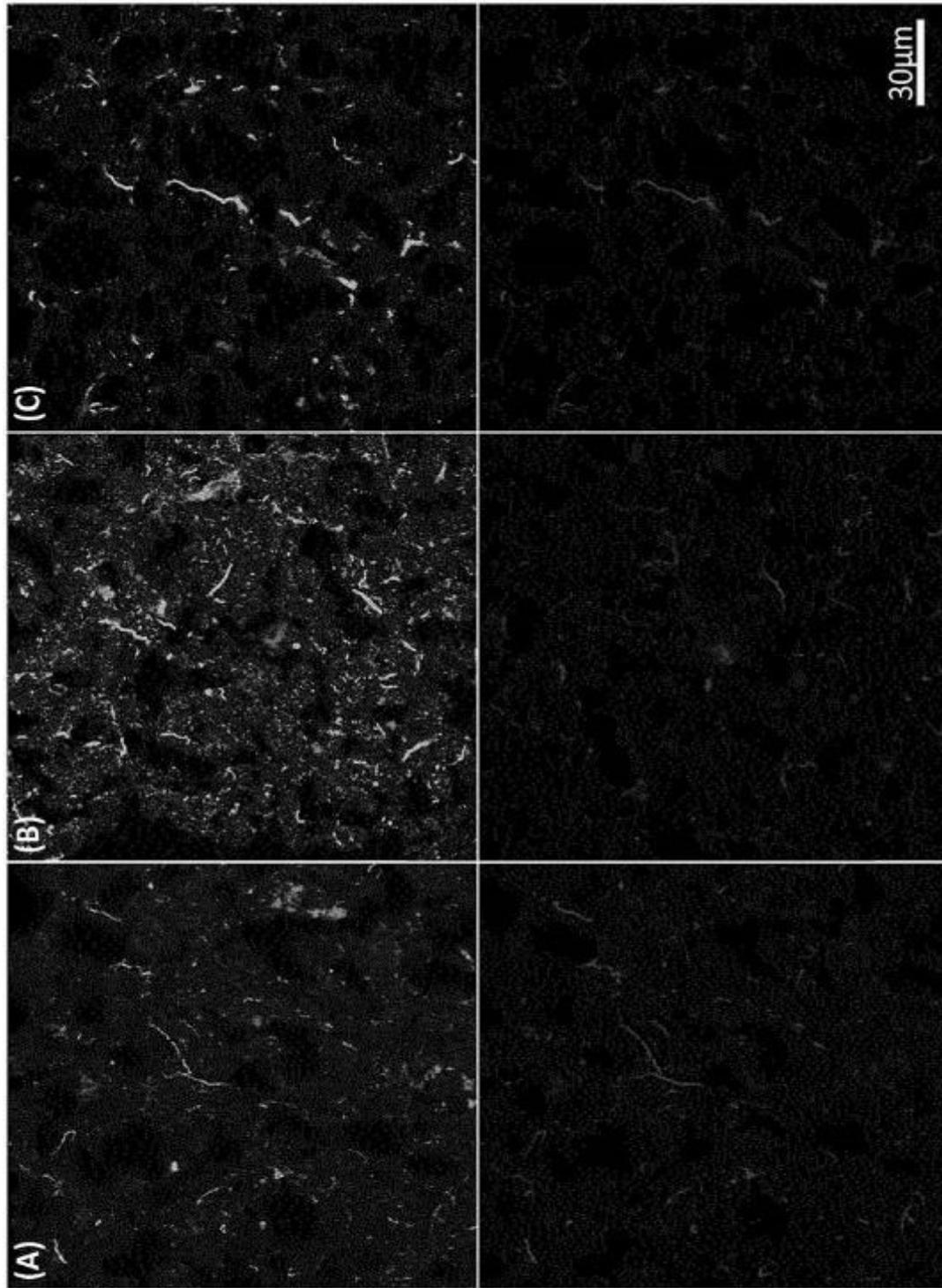


Figura 12

Figura 13

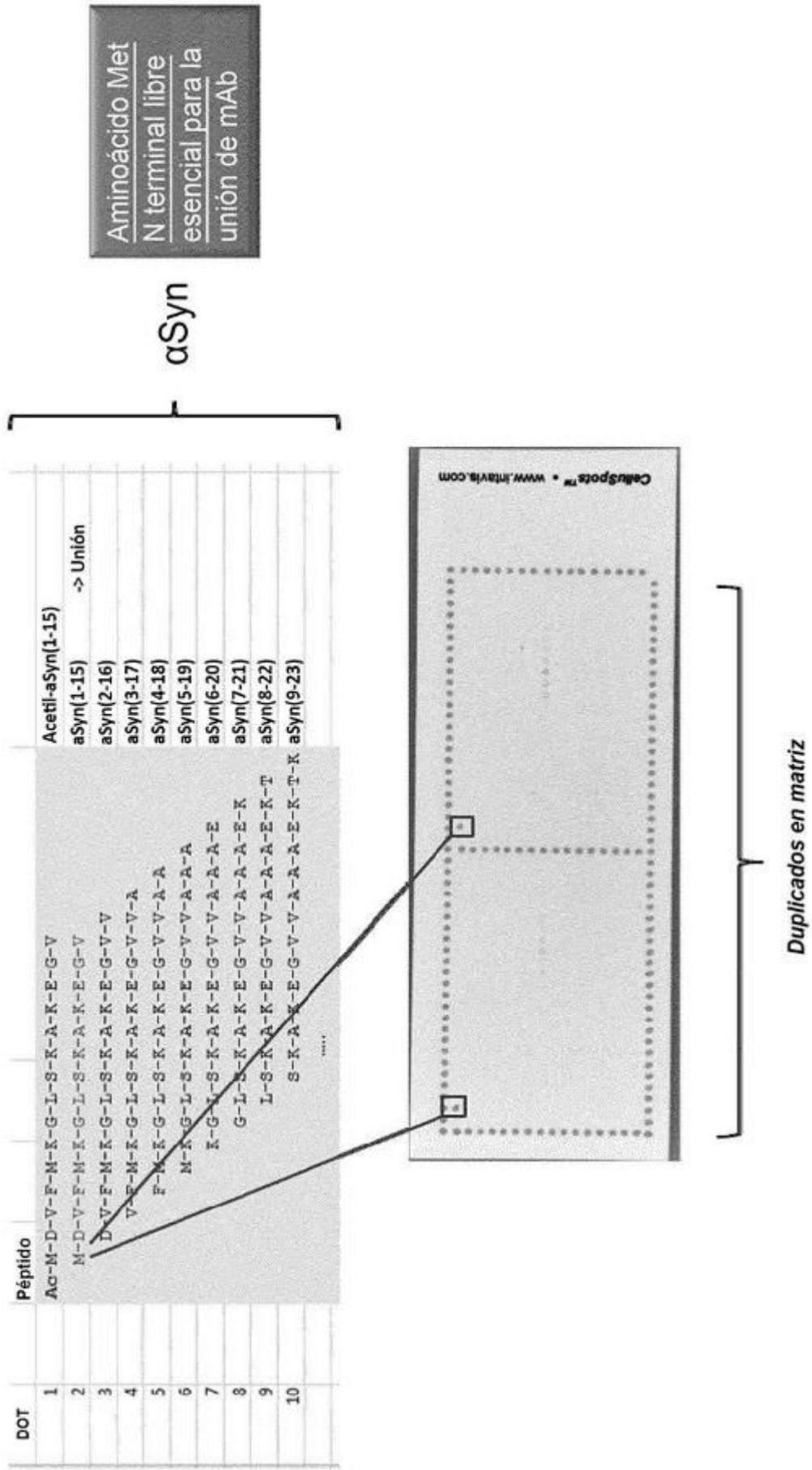


Figura 14

