

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos a la alfa-sinucleína y usos de los mismos

Referencia cruzada a solicitud relacionada

5 Esta solicitud reclama el beneficio de la prioridad de la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62/344,746, presentada el 2 de junio de 2016. La solicitud anterior se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Listado de secuencias

10 La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 30 de mayo de 2017, se denomina 1848081-0002-091-W01_SL.txt y tiene un tamaño de 48,099 bytes.

Antecedentes

15 La presente invención se refiere a anticuerpos contra α -sinucleína y a su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades, en particular alfa-sinucleinopatías, y más particularmente enfermedad de Parkinson (EP).

20 Las alfa-sinucleinopatías, también conocidas como enfermedades del cuerpo de Lewy (LBD), son una familia de enfermedades neurodegenerativas que tienen en su núcleo alfa-sinucleína como el sello patológico clave (Jellinger, Mov Disord (2003), 18 Suppl 6: S2-12 y Spillantini y Goedert, Ann N Y Acad Sci (2000), 920: 16-27; ambos se incorporan aquí como referencia). Las alfa-sinucleinopatías incluyen la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la atrofia de sistemas múltiples (ASM).

La EP es un trastorno del movimiento relacionado con la edad que progresa lentamente y afecta a más del 1% de las personas mayores de 65 años. La EP es la segunda condición neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer.

25 Una patología distintiva definitoria de las alfa-sinucleinopatías son los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy, que son inclusiones insolubles de proteínas agregadas que se encuentran dentro de las neuronas del cerebro reveladas en el examen histopatológico postmortem.

30 La presencia de patología de Lewy y la pérdida neuronal en regiones cerebrales no motoras como el cerebro anterior basal, el sistema mesopontino, la amígdala, el neocórtex, el núcleo motor dorsal del nervio vago, los bulbos olfatorios, el locus coeruleus y el tronco del encéfalo, pueden causar deficiencias cognitivas y demencia, hiposmia, afectaciones del sueño, incluido el trastorno del comportamiento del sueño (RBD) con movimientos rápidos de los ojos, trastornos del estado de ánimo que incluyen depresión y ansiedad, disfunción autonómica que incluye problemas cardiovasculares y gastrointestinales como estreñimiento, fatiga y somnolencia. Algunos de estos síntomas no motores parecen caracterizar la fase premotora o prodrómica de la enfermedad (Kalia et al. Lancet (2015), 386 (9996): 896-912; incorporada aquí como referencia).

40 La presencia de la patología de Lewy y la pérdida neuronal en las regiones cerebrales motoras, incluyendo más notoriamente la muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, puede causar temblor en reposo, rigidez, bradicinesia e inestabilidad postural (Spillantini y Goedert, Ann N Y Acad Sci (2000), 920: 16-27; incorporado aquí como referencia).

45 La proteína alfa-sinucleína (también llamada " α -sinucleína" o " α -syn") es el principal componente estructural de los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy. La alfa-sinucleína es una pequeña proteína ácida compuesta por 140 aminoácidos (14 kDa). La alfa-sinucleína natural de tipo silvestre tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 como se describe

en el número de acceso P37840 de UniProtKB. A menos que sea evidente en el contexto, la referencia a alfa-sinucleína o sus fragmentos incluye la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre humano natural indicada anteriormente y sus variantes alélicas humanas, en particular las asociadas con la enfermedad de cuerpos de Lewy (por ejemplo, E46K, A30P, H50Q), G51D y A53T, donde la primera letra indica el aminoácido en la SEQ ID NO: 1, el número es la posición del codón en la SEQ ID NO: 1 y la segunda letra es el aminoácido en la variante alélica). Dichas variantes pueden estar presentes opcionalmente de forma individual o en cualquier combinación. Las mutaciones inducidas E83Q, A90V, A76T, que mejoran la agregación de alfa-sinucleína, también pueden estar presentes individualmente o en combinación entre ellas y/o con las variantes alélicas humanas E46K, A30P, H50Q, G51D y A53T. A nivel estructural, la alfa-sinucleína contiene tres regiones distintas: un dominio anfipático de hélice alfa N-terminal que tiene propiedades de unión a lípidos y membranas (residuos 1-60), un dominio de unión a amiloide hidrófobo central que codifica el componente no beta amiloide (NAC) de placas (residuos 61-95) y una cola C-terminal ácida rica en prolina (residuos 96-140). Se cree que los residuos 71-82 del dominio NAC son clave para las propiedades de agregación/fibrilación de la alfa-sinucleína al permitir que la proteína cambie de una estructura de bobina aleatoria a una estructura de lámina beta (Bisaglia et al. FASEB J (2009), 23(2): 329-40; incorporado aquí como referencia). Aunque el dominio C-terminal está libre de una estructura secundaria significativa, contiene un sitio de fosforilación clave en el residuo Ser129 y varios residuos de tirosina que están nitrados en inclusiones de alfa-sinucleína citosólica. También existen formas truncadas N-terminales y C-terminales de alfa-sinucleína. Las modificaciones postraduccionales a la proteína pueden afectar la agregación y toxicidad de la alfa-sinucleína (Oueslati et al. Prog Brain Res (2010), 183: 115-45; incorporada aquí como referencia).

La alfa-sinucleína es abundante en el sistema nervioso central (SNC)/cerebro, donde se encuentra tanto en las neuronas como en la glía intracelularmente y también en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Mollenhauer et al. J Neural Transm (2012), 119(7): 739-46; incorporado aquí como referencia) y el líquido intersticial (ISF) que baña y rodea las células del cerebro (Emmanouilidou et al. PLoS One (2011), 6(7): e22225; incorporado aquí por referencia). La alfa-sinucleína es una proteína sináptica que se expresa predominantemente en las neuronas del neocórtex, el hipocampo, la sustancia negra, el tálamo y el cerebelo (Iwai et al. Neuron (1995), 14: 467-475; incorporado aquí como referencia). En condiciones fisiológicas, está ubicado en terminales sinápticos neuronales y está regulado por incremento en los terminales presinápticos durante el reordenamiento sináptico relacionado con la adquisición (Fortin et al. J Neurosci (2005), 25: 10913-10921; incorporado aquí como referencia).

Los estudios in vitro han demostrado que los monómeros alfa-sinucleína pueden constituir el punto de partida para el proceso de agregación. El monómero puede agregarse a una variedad de pequeñas especies oligoméricas que luego son estabilizadas por las interacciones de la lámina beta, formando protofibrillas que pueden polimerizar en estructuras fibrilares insolubles que recuerdan a las identificadas en los cuerpos de Lewy (Cremades et al. Cell (2012), 149(5): 1048-59; incorporado aquí como referencia).

Bajo condiciones patológicas, la agregación aberrante de alfa-sinucleína puede ser clave para los cambios patológicos observados en las alfa-sinucleinopatías (Lashuel et al. Nature (2002), 418: 291; y Tsigelny et al. FEBS Journal (2007), 274: 1862-1877; ambos de los cuales se incorporan aquí como referencia). Los estudios in vitro e in vivo han demostrado que los efectos neurotóxicos de la alfa-sinucleína parecen ser provocados por pequeños conformadores oligoméricos solubles o protofibrillas (Winner et al. Proc Natl Acad Sci USA (2011), 108(10): 4194-9 y Danzer et al., J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32; ambos se incorporan aquí como referencia). Mientras que los agregados fibrilares de alfa-sinucleína son característicos de la EP, las formas oligoméricas de la alfa-sinucleína son las especies tóxicas (Danzer et al. J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32; Lashuel et al. Nature (2002), 418: 291 y

Winner et al., Proc Natl Acad Sci USA (2011), 108: 4194-4199; cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia).

5 Los oligómeros de alfa-sinucleína pueden liberarse en el entorno extracelular y ser absorbidos por las células vecinas mediante un mecanismo de “propagación” (Angot y Brundin, Parkinsonism Relat Disord (2009), 15 Suppl 3: S143-147; Desplats et al., Proc Natl Acad Sci USA (2009), 106: 13010-13015 y Lee et al., J Biol Chem (2010), 285: 9262-9272; cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia). Los agregados de alfa-sinucleína pueden propagar el mal plegado a través de un mecanismo de propagación similar a un prión (Lee et al. Nat Rev Neurol (2010), 6: 702-706; Luk et al. J Exp Med (2012), 209 (5): 975-86; y Luk et al. Science (2012), 338 (6109): 949-53; cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia). La alfa-sinucleína puede, por lo tanto, inducir la neurodegeneración, ya sea por la toxicidad o propagación de los oligómeros y la propagación de tipo priónico.

15 Ahora está bien establecido y aceptado que las células, incluidas las neuronas, pueden segregar diversas formas de alfa-sinucleína (monómeros, oligómeros, agregados) en condiciones normales y también en condiciones de estrés celular, la secreción de formas monoméricas y agregadas de alfa-sinucleína es elevada bajo condiciones de estrés celular, y mediante esta liberación de alfa-sinucleína en el medio extracelular, las formas patológicas transmisibles de alfa-sinucleína pueden propagarse entre neuronas (Recasens y Dehay, Front Neuroanat (2014), 8: 159; incorporadas aquí como referencia).

20 Los efectos de la alfa-sinucleína en la EP pueden extenderse más allá del daño inmediato a las células neuronales vulnerables. Como la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, también se observa una respuesta celular proinflamatoria (Lee et al. J Biol Chem (2010), 285: 9262-9272; incorporada aquí como referencia). La alfa-sinucleína circulante y/o los astrocitos activados pueden activar la microglía, lo que lleva a una mayor generación de especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y producción de citoquinas, y exacerba aún más la neurodegeneración (Lee et al. J Biol Chem (2010), 285: 9262-9272; incorporado aquí como referencia).

30 Una variedad de diferentes modelos experimentales ha demostrado la transmisión de célula a célula de alfa-sinucleína en células cultivadas, o la difusión y propagación in vivo de patologías de alfa-sinucleína. La patología del cuerpo de Lewy se ha observado en injertos neuronales mesencefálicos embrionarios más de 10 años después de que los injertos fueron trasplantados terapéuticamente en el cuerpo estriado de pacientes con EP. Específicamente, las neuronas injertadas contenían una serie de inclusiones parecidas al cuerpo de Lewy que se tiñeron positivamente para la alfa-sinucleína, lo que indica que se había producido una transmisión de huésped a injerto de la patología de la alfa-sinucleína (Li et al. Nat Med (2008), 14(5): 501-3 y Kordower et al., Nat Med (2008), 14(5): 504-6; ambos se incorporan aquí como referencia).

40 Además, las fibrillas de alfa-sinucleína recombinantes preformadas y los oligómeros de alfa-sinucleína pueden ser internalizados por células cultivadas y neuronas, y se ha demostrado la transferencia directa de alfa-sinucleína de las células del donante a las células receptoras con la formación de inclusiones de alfa-sinucleína similares a la patología de Lewy. (Danzer et al. J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32; Volpicelli-Daley et al. Neuron (2011), 72(1): 57-71; y Luk et al. Proc Natl Acad Sci USA (2009), 106(47): 20051-6; cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia). La inyección de fibrillas de alfa-sinucleína sintética preformadas o material que contiene alfa-sinucleína de cuerpo de Lewy extraído de los cerebros de ratones transgénicos de alfa-sinucleína envejecidos en los cerebros de ratones receptores asintomáticos promueve la formación de una patología de cuerpo de Lewy en las neuronas del huésped de los animales receptores junto con neurodegeneración y déficits neurológicos (Luk et al. J Exp Med (2012), 209(5): 975-86; y Luk et al. Science (2012), 338(6109): 949-53; ambos que se incorporan aquí como referencia). La alfa-sinucleína que contiene extractos de cuerpos de Lewy aislados de cerebros de EP inoculados en la sustancia

negra o el estriado de monos macacos y ratones es rápidamente absorbida por las células huésped (dentro de las 24 horas) seguida de una pérdida más lenta de los terminales dopaminérgicos del cuerpo estriado, con una pérdida de células evidente después de más de un año (Recasens et al. *Ann Neurol* (2014), 75(3): 351-62; incorporado aquí como referencia).

5 De manera similar, la inoculación de ratones con homogenados cerebrales derivados de pacientes con las sinucleinopatías DLB o MSA desencadena la patología de tipo Lewy alfa-sinucleína en los ratones huéspedes (Watts y otros, *Proc Natl Acad Sci USA* (2013), 110(48): 19555-60; y Masuda-Suzukake et al. *Brain* (2013), 136(Pt 4): 1128-38; ambos se incorporan aquí como referencia). Finalmente, se ha demostrado la transferencia y transmisión de alfa-sinucleína tanto monomérica como oligomérica del bulbo olfativo a estructuras cerebrales interconectadas en ratones (Rey et al. *Acta Neuropathol* (2013), 126(4): 555-73; incorporada aquí como referencia).

Los enfoques de inmunoterapia pasiva con anticuerpos dirigidos a la alfa-sinucleína se han probado en numerosos modelos de ratón de alfa-sinucleinopatía preclínicos (Lawand et al. *Expert Opin Ther Targets* (2015): 1-10; incorporado aquí como referencia). Específicamente,

15 un estudio que utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido contra la alfa-sinucleína (9E4) ha demostrado la eliminación in vivo de agregados y patologías de la alfa-sinucleína, las mejoras motoras del comportamiento y los efectos neuroprotectores (documento WO 2014/058924; que se incorpora aquí como referencia).

Otros estudios que utilizan inmunización pasiva de ratones transgénicos alfa-sinucleína desarrollados como modelos experimentales de PD/DLB, con el anticuerpo monoclonal 9E4 han demostrado que el anticuerpo elimina la patología alfa-sinucleína, disminuye los déficits sinápticos y axonales, deroga la pérdida de fibras de tirosina hidroxilasa estriada y reduce significativamente los déficits de memoria y las alteraciones de la función motora (Games et al. *J Neurosci* (2014), 34(28): 9441-54; Bae et al. *J Neurosci* (2012), 32(39): 13454-69; y Masliah et al., *PLoS One* (2011), 6(4): e19338; cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia). Además, se ha demostrado que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales anti-alfa-sinucleína en ratones de tipo silvestre que se inyectaron intraestriatalmente con fibrillas preformadas de alfa-sinucleína sintética (pffs) condujo a una

25 fuerte reducción de la patología de Lewy, prevención de la pérdida de neuronas de dopamina en la sustancia negra, y una mejora significativa en las alteraciones motoras que se manifiestan en el modelo de ratón después del tratamiento con pffs (Tran et al. *Cell Rep* (2014), 7(6): 2054-65; incorporado aquí como referencia).

Además, uno de los principales desafíos asociados con el tratamiento de trastornos del SNC con agentes terapéuticos de moléculas grandes, como los anticuerpos, es introducir estos medicamentos en el tejido afectado. El paso de moléculas grandes hacia el cerebro y la médula espinal está restringido en gran medida por la barrera hematoencefálica (BBB). El BBB protege y regula la homeostasis del cerebro y evita el paso libre de moléculas a la mayoría de las partes del cerebro, lo que limita el tratamiento de muchas enfermedades cerebrales. El transporte de moléculas esenciales como nutrientes, factores de crecimiento y hormonas se logra a través de una serie de transportadores y receptores específicos que regulan el paso a través de las células endoteliales del cerebro. La entrega de biológicos y otros fármacos al cerebro, por lo tanto, representa un desafío significativo. Además, parece que existen mecanismos de transporte que eliminan rápidamente los anticuerpos del cerebro,

35 presumiblemente para prevenir las respuestas inflamatorias debido a la participación de Fc con ligandos efectores que promueven una respuesta proinflamatoria.

Durante la última década, han surgido informes sobre el transporte de anticuerpos a través de la BBB, donde la unión al dominio extracelular de las moléculas transportadoras facilita la transcitosis del complejo de anticuerpos del receptor a través de la capa de células endoteliales.

50

- El BBB se compone principalmente de células endoteliales capilares del cerebro, que tienen características especializadas, como uniones estrechas, para limitar el transporte de moléculas al cerebro (Reese et al. 1967, J. Cell Biol. 34: 207-217; Brightman et al. 1969, J. Cell Biol. 40: 648-677; Rubin et al. 1999, Ann. Rev. Neurosci. 22: 11-28), aunque otros tipos
- 5 de células, como los pericitos, astrocitos y células neuronales, también desempeñan un papel importante en la función de la BBB. Típicamente, menos del 0.1% de un anticuerpo periféricamente dosificado llega al cerebro (Boado et al. 2010, Mol. Pharm. 7: 237-244; Pepinsky et al. 2011, nat. Neurosci. 8: 745-751). El BBB funciona como una barrera física, metabólica e inmunológica (Gaillard et al. 2003, Microvasc. Res. 65: 24-31).
- 10 El transporte de anticuerpos a través de la BBB puede mejorarse al desencadenar la transcitosis mediada por receptores en las células endoteliales del cerebro. A través de este proceso, el compromiso de antígenos en el lado luminal de la célula endotelial puede inducir la internalización y el desplazamiento del anticuerpo a través de la célula, y luego su posterior liberación en el tejido.
- 15 Las terapias farmacológicas actuales para la EP se centran principalmente en el tratamiento de los síntomas motores de la enfermedad. Actualmente no hay terapias comercializadas o disponibles que puedan tratar o prevenir la sinucleinopatía alfa.

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de una terapia para tratar alfa sinucleinopatías, particularmente en seres humanos.

20 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos aislados contra alfa-sinucleína humana. La invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen una o más de las propiedades funcionales del anticuerpo aslo0452 ngl-3. Por ejemplo:

- 25 La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la región C-terminal de α -sinucleína humana. La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la región que comprende aproximadamente el aminoácido 102 a aproximadamente el aminoácido 130 de α -sinucleína humana (por ejemplo, SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une
- 30 específicamente a una región que comprende aproximadamente el aminoácido 120 a aproximadamente el aminoácido 130 de α -sinucleína humana (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo que no es el mismo que el anticuerpo unido por el anticuerpo 9E4.

- 35 La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la α -sinucleína humana pero no a la β -sinucleína humana o la γ -sinucleína humana.

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a α -sinucleína humana, de rata y de cynomolgus.

- 40 La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la α -sinucleína humana con alta afinidad. En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención se une a la alfa-sinucleína con una K_D de menos de 500 pM, menos de 400 pM, menos de 300 pM, menos de 200 pM, menos de 150 pM, menos de 120 pM, menos de 110 pM o 106 pM o menos según lo medido, por ejemplo, utilizando el análisis de Octeto. En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención se une a la alfa-sinucleína con una K_D de menos
- 45 de 400 pM, menos de 300 pM, menos de 250 pM, menos de 200 pM, menos de 150 pM, menos de 120 pM, menos de 110 pM, menos de 100 pM, menos de 80 pM o 74 pM o menos según lo medido, por ejemplo, utilizando el análisis KinExA.

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la sinucleína humana endógena nativa.

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a formas monoméricas de α -sinucleína humana.

- 5 La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a agregados de α -sinucleína humana.

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a formas patológicas relevantes de la enfermedad de α -sinucleína.

- 10 La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que reduce los niveles de α -sinucleína en el fluido intersticial del cerebro. En particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención reduce los niveles de α -sinucleína libres no unidos en el líquido intersticial del cerebro.

- 15 La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que reduce los niveles de α -sinucleína en el líquido cefalorraquídeo. En particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención reduce los niveles de α -sinucleína libres no unidos en el líquido cefalorraquídeo.

- 20 Como se usa en el presente documento, los términos " α -sinucleína libre no unida" se refieren a una sinucleína que no está unida al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según la invención. Dicha α -sinucleína libre no unida puede aplicarse a la α -sinucleína en su forma monomérica u oligomérica, o en forma agregada. Estos términos generalmente se aplican a cualquier forma patológica de α -sinucleína.

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que reduce la diseminación de α -sinucleína in vivo.

- 25 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención compete con el anticuerpo aslo0452 ngl-3 por la unión a α -sinucleína humana.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se une al mismo epítipo en α -sinucleína humana que el anticuerpo aslo0452 ngl-3.

- 30 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se deriva del anticuerpo asyn0087 que comprende una región de cadena pesada variable (VH) de secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una región de cadena ligera variable (VL) de la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 3, como se describe a continuación.

- 35 En una realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se deriva del anticuerpo asyn0087, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una K_D de menos de 500 mM y se une al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos asyn0087, y aslo0452 ngl-3 y aslo543 descritos a continuación.

- 40 Como se usa aquí, "H-CDR" significa una región determinante de complementariedad (CDR) en la región de la cadena pesada, y "L-CDR" significa una región determinante de complementariedad (CDR) en la región de la cadena ligera de un anticuerpo o antígeno o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención comprende al menos una CDR seleccionada de:

(i) H-CDR1 de la SEQ ID NO: 5,

(ii) H-CDR2 de la SEQ ID NO: 6,

- (iii) H-CDR3 de la SEQ ID NO: 7,
 - (iv) L-CDR1 de la SEQ ID NO: 9,
 - (v) L-CDR2 de la SEQ ID NO: 10,
 - (vi) L-CDR3 de la SEQ ID NO: 11.
- 5 En una realización adicional, la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno según la invención es CDR3 de la SEQ ID NO: 16 de la cadena pesada del anticuerpo aslo0452 ngl-3; y/o la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención es CDR3 de la SEQ ID NO: 21 de la cadena ligera del anticuerpo aslo0452 ngl-3.
- 10 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención tiene al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o todas las CDR seleccionadas de las CDR de anticuerpo aslo0452 ngl-3, es decir, al menos una CDR seleccionado de una de las SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 21.
- 15 En una realización, la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención es CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo aslo0452 ngl-3; y/o la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención es CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo aslo0452 ngl-3.
- 20 En una realización, la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo aslo0452 ngl-3.
- En una realización, la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención es CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo aslo0452 ngl-3.
- 25 En una realización, la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención es CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo aslo0452 ngl-3 y la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo aslo0452 ngl-3.
- 30 La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene las seis CDR del anticuerpo aslo0452 ngl-3.
- Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención comprende:
- a) tres CDR de cadena pesada que tienen secuencias:
 - (i) H-CDR1 de la SEQ ID NO: 5,
 - (ii) H-CDR2 de la SEQ ID NO: 15; y
 - (iii) H-CDR3 de la SEQ ID NO: 16 y
 - b) tres CDR de cadena ligera que tienen secuencias:
 - (i) L-CDR1 de la SEQ ID NO: 20,
 - (ii) L-CDR2 de la SEQ ID NO: 10, y
 - (iii) L-CDR3 de la SEQ ID NO: 21.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende una cadena pesada variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de nucleótidos definida por SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de nucleótidos definida por la SEQ ID NO: 18.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende una cadena pesada variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad a la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 19.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

En una realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia definida por la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia definida por la SEQ ID NO: 8.

En una realización particular adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia definida por la SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia definida por la SEQ ID NO: 8, y se une a la α -sinucleína humana con una K_D de menos de 500 pM y se une al mismo epítipo que asyn0087, aslo0452 ngl-3 o aslo0543.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención comprende una cadena pesada variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia definida por SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 19.

En una realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia definida por la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia definida por la SEQ ID NO: 19.

En una realización adicional, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad a la secuencia definida por la SEQ ID NO: 19 y además comprende:

a) tres CDR de cadena pesada que tienen secuencias:

(i) H-CDR1 de la SEQ ID NO: 5,

(ii) H-CDR2 de la SEQ ID NO: 15; y

(iii) H-CDR3 de la SEQ ID NO: 16 y

b) tres CDR de cadena ligera que tienen secuencias:

(i) L-CDR1 de la SEQ ID NO: 20,

(ii) L-CDR2 de la SEQ ID NO: 10; y

(iii) L-CDR3 de la SEQ ID NO: 21.

5 La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia de nucleótidos definida por la SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de nucleótidos definida por la SEQ ID NO: 18.

10 La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 19.

También se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 17.

15 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención comprende una cadena pesada variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia definida por SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 30.

20 En una realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia definida por la SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia definida por la SEQ ID NO: 30.

25 En una realización adicional, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con la secuencia definida por SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad. a la secuencia definida por la SEQ ID NO: 30 y además comprende:

30 c) tres CDR de cadena pesada que tienen secuencias:

(iv) H-CDR1 de la SEQ ID NO: 25,

(v) H-CDR2 de la SEQ ID NO: 26; y

(vi) H-CDR3 de la SEQ ID NO: 27, y

d) tres CDR de cadena ligera que tienen secuencias:

35 (iv) L-CDR1 de la SEQ ID NO: 31,

(v) L-CDR2 de la SEQ ID NO: 32; y

(vi) L-CDR3 de la SEQ ID NO: 33.

40 La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia de nucleótidos definida por la SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de nucleótidos definida por la SEQ ID NO: 30.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia de aminoácidos definida

por la SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 30.

5 También se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 28.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como se define en cualquier lugar anteriormente es un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgM, IgG tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

10 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención tiene una región Fc modificada. Las modificaciones adecuadas son bien conocidas por los expertos en la técnica y pueden incluir, entre otras, modificaciones para aumentar o disminuir la vida media, ablacionar, reducir o mejorar la función efectora, proporcionar
15 cisteínas sustituidas con tioles libres para la conjugación. Ejemplos de tales modificaciones son YTE para aumentar la vida media y/o TM para reducir la función efectora. En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento comprenden mutaciones M252Y/S254T/7256E (YTE) en la región Fc del anticuerpo (Dall'Acqua et al., 2006, J. Biol. Chem, 281: 23514-23524). En algunas
20 realizaciones, cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento comprenden una mutación triple (abreviada en este documento como "TM") en la región Fc correspondiente a la mutación L234F/L235E/P331S divulgada en Oganessian et al. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, (2008) 64: 700-704. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede ser un anticuerpo IgG1 TM o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otra realización, el
25 anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede comprender una región Fc que tiene mutaciones YTE.

En otra realización, el anticuerpo, o su fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención se puede acoplar a un resto transportador de barrera hematoencefálica (BBB), en el que el resto de transportador BBB es capaz de transportar el anticuerpo, o su
30 fragmento de unión a antígeno, a través del BBB.

En una realización, el resto transportador BBB puede ser un anticuerpo. En una realización, el anticuerpo BBB puede formar una construcción multispecífica con un anticuerpo anti- α -sinucleína o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El resto transportador BBB puede comprender una región-1 determinante de complementariedad de la cadena pesada variable
35 (VH-CDR1) de inmunoglobulina, una región-2 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (VH-CDR2) de inmunoglobulina, una región-3 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (VH-CDR3) de inmunoglobulina, una región-1 determinante de complementariedad de la cadena ligera variable (VL-CDR1) de inmunoglobulina, una región-2 determinación de complementariedad de la cadena ligera variable (VL-CDR2) de inmunoglobulina y la región-3 determinante de complementariedad de la cadena ligera variable (VL-CDR3) de inmunoglobulina; en donde la VH-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 40 o 49, VH-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 41 o 50, VH-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 42 o 51, VL-CDR1 comprende la SEQ ID NO: 36, 44 o 53, VL-CDR2 comprende la SEQ ID NO: 37, 45 o 54 y VL-CDR3 comprende la SEQ ID NO: 38, 46 o 55.

45 En algunas realizaciones, el resto transportador comprende una región de cadena pesada (VH) variable de inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 39. En algunas realizaciones, el resto transportador comprende una región de cadena ligera (VL) variable de inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO: 43.

- Además, el resto transportador se puede seleccionar de entre un anticuerpo completo, un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento unido a disulfuro (dsFv), un fragmento Fv de cadena única (scFV), un fragmento sc(Fv)₂, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo y un anticuerpo de cadena única. En una realización particular, el resto transportador comprende un fragmento scFV que comprende un dominio VH y un dominio VL fusionados a través de un enlazador. En algunos casos, el enlazador puede ser (Gly4Ser)ⁿ (SEQ ID NO: 56), donde n es un entero positivo seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.
- En algunas realizaciones, cualquier molécula transportadora de la invención se puede combinar como se describe en el presente documento con cualquier molécula de unión a alfa-sinucleína de la invención para proporcionar una molécula de unión multiespecífica de la invención.
- La invención proporciona el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como se definió en cualquier parte anteriormente, para uso como un medicamento.
- La invención también proporciona el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como se definió en cualquier lugar anteriormente para uso en la prevención o tratamiento de una α -sinucleinopatía.
- En una realización, la α -sinucleinopatía se selecciona de la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la atrofia de sistemas múltiples (MSA).
- En una realización, la α -sinucleinopatía es la enfermedad de Parkinson (EP).
- La invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad, en particular una enfermedad asociada con el sistema nervioso central, en un paciente, el método que comprende administrar al paciente el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de mismo de la presente invención como se definió en cualquier parte anteriormente.
- En una realización, la enfermedad es una α -sinucleinopatía.
- En una realización, la α -sinucleinopatía se selecciona entre la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la atrofia de sistemas múltiples (MSA).
- En una realización, la α -sinucleinopatía es la enfermedad de Parkinson (EP).
- La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como se definió en cualquier lugar anteriormente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- La frase "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y agentes antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionan funciones terapéuticas suplementarias, adicionales o mejoradas. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluirse en un contenedor, empaque o dispensador junto con instrucciones para la administración.
- Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los expertos en la técnica conocen métodos para llevar a cabo la administración. La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavitaria, subcutánea o transdérmica.

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como se definió en cualquier parte anteriormente.

5 En una realización particular, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la SEQ ID NO: 13 y/o la SEQ ID NO: 18.

En otra realización particular, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la SEQ ID NO: 23 y/o la SEQ ID NO: 29.

10 Una vez que se proporciona esta información, un experto en la técnica podría obtener fácilmente moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos divulgados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden comprender ADN o ARN y pueden ser total o parcialmente sintéticos o recombinantes. La referencia a una secuencia de nucleótidos abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que, U es sustituida por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.

15 Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención comprenden una secuencia de codificación para una CDR, un dominio VH y/o un dominio VL divulgado en el presente documento.

20 La presente divulgación también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, fagémidos, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como se definió en cualquier lugar anteriormente, en particular que codifica un CDR, un dominio VH y/o un dominio VL divulgado en este documento.

La divulgación proporciona además una célula huésped que comprende una o más construcciones como anteriormente.

25 También se proporcionan los ácidos nucleicos que codifican uno o más CDR (H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3), dominio VH o VL divulgado en este documento, así como los métodos de fabricación de los productos codificados. El método comprende expresar el producto codificado a partir del ácido nucleico codificador. La expresión se puede lograr cultivando en condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, se puede aislar y/o purificar un dominio VH o VL, o un miembro de unión específico utilizando cualquier técnica adecuada, y luego usarlo según sea apropiado. Los fragmentos de unión a antígeno, los dominios VH y/o VL y las moléculas y vectores de ácido nucleico codificantes pueden aislarse y/o purificarse de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distintos de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped son bien conocidos en la técnica.

40 Para las células adecuadas para producir anticuerpos, vea Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999. En resumen, las células huéspedes adecuadas incluyen bacterias, células vegetales, células de mamíferos y sistemas de levadura y baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células de mieloma de ratón NSO y muchas otras. Un huésped bacteriano común es E. coli. Cualquier sistema de expresión de proteínas compatible con la invención se puede usar para producir los anticuerpos divulgados. Los sistemas de expresión adecuados incluyen animales transgénicos descritos en Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernández et al., 1999.

Los vectores adecuados pueden elegirse o construirse, de modo que contengan secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos o víricos, por ejemplo, fagos o fagémidos, según sea apropiado. Para más detalles, ver, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology. 2ª edición, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico como se divulgó aquí, en particular un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como se definió en cualquier lugar anteriormente.

Otro aspecto adicional proporciona un método que comprende la introducción de dicho ácido nucleico en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otro virus, por ejemplo, vaccinia, o, para células de insectos, baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transformación con cloruro de calcio, la electroporación y la transfección utilizando bacteriófagos. La introducción del ácido nucleico en las células puede seguirse causando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células huésped en condiciones para la expresión del gen.

Breve descripción de las figuras y listado de secuencias

La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a las Figuras adjuntas y la lista de secuencias, en las que se muestran:

Clave para los SEQ ID NOs:

Nombre	Descripción	SEQ ID NO:
Alfa sinucleína humana	Secuencia de aminoácido	1
asyn0087	Secuencia de aminoácido VH	2
	Secuencia de aminoácido VL	3
Secuencia general de un anticuerpo derivado de asyn0087	secuencia de aminoácidos VH	4
	Secuencia de aminoácidos H-CDR1	5
	Secuencia de aminoácidos H-CDR2	6
	Secuencia de aminoácidos H-CDR3	7
	secuencia de aminoácidos VL	8
	secuencia de aminoácidos L-CDR1	9
	Secuencia de aminoácidos L-CDR2	10
	secuencia de aminoácidos L-CDR3	11

aslo0452 ngl-3	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada	12
	Secuencia de nucleótidos VH	13
	Secuencia de aminoácidos VH	14
	secuencia de aminoácidos H-CDR1	5
	secuencia de aminoácidos H-CDR2	15
	secuencia de aminoácidos H-CDR3	16
	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera	17
	Secuencia de nucleótidos VL	18
	secuencia de aminoácidos VL	19
	secuencia de aminoácidos L-CDR1	20
	Secuencia de aminoácidos L-CDR2	10
	Secuencia de aminoácidos de L-CDR3	21
aslo0543	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada	22
	Secuencia de nucleótidos VH	23
	Secuencia de aminoácidos VH	24
	Secuencia de aminoácidos H-CDR1	25
	Secuencia de aminoácidos H-CDR2	26
	Secuencia de aminoácidos H-CDR3	27
	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera	28
	secuencia de nucleótidos VL	29
	secuencia de aminoácidos VL	30
	secuencia de aminoácidos L-CDR1	31
	Secuencia de aminoácidos de L-CDR2	
	secuencia de aminoácidos L-CDR3	32
		33
transportador BBB General	secuencia de aminoácidos VH	34
	secuencia de aminoácidos VL	35
	secuencia de aminoácidos L-CDR1	36
	secuencia de aminoácidos L-CDR2	37
	secuencia de aminoácidos L-CDR3	38
BBBt0626gl	secuencia de aminoácidos VH	39
	secuencia de aminoácidos H-CDR1	40
	Secuencia de aminoácidos H-CDR2	41
	Secuencia de aminoácidos H-CDR3	42
	secuencia de aminoácidos VL	43
	secuencia de aminoácidos L-CDR1	44
	secuencia de aminoácidos L-CDR2	45
	secuencia de aminoácidos L-CDR3	46

BBBt0626	secuencia de aminoácidos VH	47
	secuencia de aminoácidos H-CDR1	40
	Secuencia de aminoácidos H-CDR2	41
	Secuencia de aminoácidos H-CDR3	42
	secuencia de aminoácidos VL	43
	secuencia de aminoácidos L-CDR1	44
	secuencia de aminoácidos L-CDR2	45
	secuencia de aminoácidos L-CDR3	46

BBBt0632gl	secuencia de aminoácidos VH	48
	Secuencia de aminoácidos H-CDR1	49
	Secuencia de aminoácidos H-CDR2	50
	Secuencia de aminoácidos H-CDR3	51
	secuencia de aminoácidos VL	52
	secuencia de aminoácidos L-CDR1	52
	secuencia de aminoácidos L-CDR2	54
	secuencia de aminoácidos L-CDR3	55

Leyendas de la figura:

5 Tabla 1: Determinación de la afinidad de los anticuerpos anti- α -sinucleína claves para α -syn humana realizada en dos plataformas de medición de afinidad.

Figura 1: Esquema del ensayo HTRF®.

Figura 2: Comparación de secuencias de aminoácidos de asyn0087, aslo0452ngl-3 y aslo0543 región variable de cadena pesada (VH) (SEQ ID NOs: 2, 14 y 24, respectivamente) y región variable de cadena ligera (VL) (SEQ ID NOs: 3, 19, y 30, respectivamente). Los aminoácidos subrayados corresponden a las CDR.

Figuras 3A-3D: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de aslo0452 ngl-3. Las Figuras 3A y 3B muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cadena pesada variable y cadena ligera variable, respectivamente, de aslo0452 ngl-3. La Figura 3A divulga las SEQ ID Nos: 13 y 14, respectivamente, en orden de aparición. La Figura 3B divulga las SEQ ID Nos: 18 y 19, respectivamente, en orden de aparición. Las Figuras 3C y 3D muestran la alineación de estas secuencias con las secuencias de la línea germinal humana más cercanas. La Figura 3C muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos del dominio de cadena pesada variable aslo0452 ngl-3 (SEQ ID NO: 14) con la línea germinal IGHV3-23 (SEQ ID NO: 58) y las secuencias JH6 (SEQ ID NO: 59). La Figura 3D muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos del dominio de cadena ligera variable aslo0452 ngl-3 (SEQ ID NO: 19) con la línea germinal IGLV5-45 (SEQ ID NO: 60) y JL2 (SEQ ID NO: 61), 3 secuencias. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están subrayadas y etiquetadas. Las diferencias con la línea germinal se resaltan en negrita y se describen. Todos los residuos que no son de Vernier en las regiones marco de la cadena ligera son aminoácidos de la línea germinal humana. Los residuos Vernier (*) no se han cambiado para que coincidan con los aminoácidos de la línea germinal.

Figuras 4A y 4B: Unión de epítipo de clones aislados de plomo utilizando un panel de un truncados α -sin. Los pozos de ELISA están recubiertos con un rango de truncados α -syn disponibles en el mercado que representan las diversas regiones definidas de la proteína: 1-140: α -syn de longitud completa, 1-60: solo región N-terminal, 61-140: componente no amiloide de placas (NAC) más la región C-terminal, 1-95: regiones N-terminal y NAC, 96-140:

solo región C-terminal, Δ NAC: región NAC eliminada, NCAP: es una forma de alternativamente empalmada de aminoácidos faltantes α -sin 103-129 (rPéptido). Los anticuerpos primarios utilizados para la detección fueron (Figura 4A) Asyn087; y (Figura 4B) Aslo0452 ngl-3 (barras negras), aslo0543 (barras grises claras) y control equiparado del isotipo NIP228 (barras grises oscuras). La unión se detecta con un anticuerpo secundario IgG Eu³⁺ antihumano (Figura 4A) o con un anticuerpo secundario IgG-HRP antihumano (Figura 4B).

Figura 5: Especificidad de aslo0452 ngl-3 y aslo0543 para α -syn en relación con los miembros de la familia sinucleína utilizando un ensayo de competición de epítipo DELFIA. Usando el ensayo de HTRF de competición de epítipo, la especificidad de los clones aslo0452 ngl-3 y aslo0543 con afinidad optimizada se determinó mediante la titulación de α -sin, β -sin y γ -sin sin marcar. A partir de esto se determinaron los valores de IC₅₀.

Figura 6: Especificidad de aslo0452 ngl-3 y aslo0543 para humanos, monos cynomolgus y α -syn de ratas utilizando un ensayo de Competición de Epítipo HTRF. Usando el ensayo de HTRF de competición de epítipo, se determinó el perfil de reactividad cruzada de las especies de los clones optimizados de afinidad en un ensayo similar mediante la titulación de la α -syn sin marcar y la derivación de Valores de IC₅₀ para cada una de las especies de α -sin.

Figuras 7A y 7B: Resultados representativos de citometría de flujo que demuestran que los clones de afinidad optimizada se unen a la α -syn humana nativa en una línea celular de neuroblastoma humano.

Los paneles A, C, E y G de las Figuras 7 A y 7B muestran unión a la línea celular de cáncer de mama humano negativo α -sin, BT20. Los paneles B, D, F y H de las Figuras 7A y 7B muestran unión a la línea celular de neuroblastoma humano positivo α -sin, SHSY5Y. Figura 7A: los anticuerpos humanos primarios utilizados en este estudio fueron asyn0087 y control de IgG Hu. La unión del anticuerpo humano se detectó utilizando una IgG-FITC antihumano secundario (Jackson). Figura 7B: Los anticuerpos humanos primarios utilizados en este estudio fueron el control de IgG1 TM coincidente con el isotipo aslo0452 ngl-3, aslo0543 y NIP228. La unión de anticuerpo humano se detectó utilizando un IgG-FITC antihumano secundario (Jackson). Los principales anticuerpos de ratón utilizados fueron 4D6 (Covance) y un control negativo de isotipo coincidente (R&D Systems). La unión del anticuerpo de ratón se detectó utilizando un IgG-FITC antirratón secundario (Sigma).

Figura 8: Especificidad de las IgG anti- α -syn optimizados para α -syn humano agregado por DELFIA ELISA. El gráfico muestra que aslo0452 ngl-3 y aslo0543, dos clones específicos de alta afinidad al α -sin, y el anticuerpo líder asyn0087 detectaron formas agregadas capturadas de α -syn (barras negras) pero no detectaron el α -syn monomérico capturado.

Figuras 9A-9C: Especificidad de clones optimizados de afinidad en tejidos relevantes para la enfermedad por inmunohistoquímica. Las Figuras 9A, 9B y 9C muestran tinción con aslo0452 ngl-3, asyn0087 y aslo0543, respectivamente. Los paneles A, B y C muestran aslo0452 ngl-3 que tiñen tanto los cuerpos de Lewy (paneles A y B) como en las neuritas de Lewy (panel C) de la sustancia negra en el tejido cerebral con EP. El panel D muestra aslo0452 ngl-3 muestra una tinción de bajo nivel de α -syn en células de la corteza temporal en una sección cerebral normal. Los paneles E, F y G muestran aslo0452 ngl-3 que tiñen los cuerpos de Lewy, las neuritas de Lewy y los puntos de Lewy de la amígdala en el tejido cerebral de EP. El panel H muestra un anticuerpo de control de isotipo coincidente que demuestra que no hay tinción en la amígdala en el tejido cerebral con EP. Los paneles I a M muestran la tinción de asyn0087 del Locus Coeruleus en tejido cerebral con EP; las características patológicas identificadas son cuerpos de Lewy (Panel I y L), agregados neuronales (Panel J), neuritas de Lewy (Panel K) y cuerpos pálidos (Panel M). Los paneles N y O muestran una aslo0543 que tiñe los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy en la sustancia negra en el tejido cerebral con EP. El panel P

muestra una tinción de bajo nivel de aslo0543 de α -syn en células de la corteza temporal en una sección cerebral normal.

Figuras 10A y 10B: La administración sistémica de aslo0452 ngl-3 disminuye rápidamente los niveles de asyn libres en la corteza prefrontal de ratas. La concentración de α -sinucleína libre media $\pm$ SEM absoluta (Figura 10A) o relativa (Figura 10B) en ISF de ratas tratadas con aslo0452 ngl-3 (30 mg/kg por vía intravenosa; símbolos cerrados) o con vehículo (símbolos abiertos).

Figuras 11A y 11 B: La dosis de Aslo0452 ngl-3 y dependiente del tiempo disminuye los niveles de asyn libre en el CSF de ratas tras la administración sistémica. La concentración de α -sinucleína libre media $\pm$ SEM absoluta (Figura 11A) o relativa (Figura 11B) en CSF de ratas tratadas con aslo0452 ngl-3 (3, 10, 30, 100 mg/kg por vía intravenosa; símbolos cerrados) o vehículo (símbolos abiertos).

Figuras 12A-12C: Los anticuerpos anti-alfa-sinucleína aslo0452 ngl-3 y aslo0452 ngl-3-D265A bloquean la diseminación de alfa-sinucleína ipsilateral a contralateral. (Figura 12A): los ratones no tg inyectados con LV- α -syn en el hipocampo derecho (flechas negras) se inmunizaron pasivamente con dosis semanales de anticuerpos IgG1 de ratón anti-alfa-sinucleína: El anticuerpo de control de isotipo aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, o con NIP228, durante 13 semanas, seguido por la determinación de la diseminación de alfa-sinucleína por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imagen automatizada. (Figura 12B): Cuantificación de los datos de inmunorreactividad de alfa-sinucleína obtenidos a partir del análisis inmunocitoquímico de las secciones coronales del hipocampo ipsilateral representadas en A. Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos de anticuerpos independientes (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett. (Figura 12C): Cuantificación de los datos de inmunorreactividad de alfa-sinucleína obtenidos del análisis inmunocitoquímico de las secciones coronales del hipocampo contralateral representadas en el panel A. Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos con anticuerpos independientes (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett.

Figuras 13A-13C: Los anticuerpos anti-alfa-sinucleína aslo0452 ngl-3 y aslo0452 ngl-3-D265A reducen la deposición y diseminación de alfa-sinucleína expresada lentividalmente a lo largo de los axones. (Figura 13A): los ratones no tg inyectados con LV- α -syn en el hipocampo derecho fueron inmunizados pasivamente con dosis semanales de anticuerpos IgG1 de ratón anti-alfa-sinucleína: anticuerpo de control de isotipo aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, o con el NIP228, durante 13 semanas, seguido de un análisis inmunocitoquímico de los depósitos de alfa-sinucleína a lo largo de los axones trans-hipocampo ipsilaterales y contralaterales (flechas negras). (Figura 13B): Cuantificación de los depósitos de alfa-sinucleína ipsilaterales determinados por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imágenes automatizado. Cada columna es el valor de la media $\pm$ SEM de 10 tratamientos con anticuerpos independientes (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett. (Figura 13C): Cuantificación de los depósitos de alfa-sinucleína axonal contralateral determinada por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imagen automatizado. Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos con anticuerpos independientes (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett.

Figuras 14A-14C: Los anticuerpos anti-alfa-sinucleína aslo0452 ngl-3 aslo0452 ngl-3-D265A reduce la deposición de alfa-sinucleína en las neuronas del hipocampo CA1 y las neuronas neocorticales de la capa 5. (Figura 14A): los ratones no tg inyectados con LV- α -syn en el hipocampo derecho se inmunizaron pasivamente con dosis semanales de anticuerpos IgG1 anti-alfa-sinucleína de ratón: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, o con el anticuerpo de control de isotipo NIP228, durante 13 semanas, seguido de un análisis inmunocitoquímico

- de los depósitos de alfa-sinucleína en las neuronas del hipocampo CA1 ipsilaterales y las neuronas neocorticales de la capa 5 ipsilaterales (flechas negras). (Figura 14B): Cuantificación de depósitos de alfa-sinucleína en neuronas neocorticales de la capa 5 ipsilaterales determinada por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imagen automatizado. Los datos mostrados representan el número de células positivas a alfa-sinucleína (neuronas) por 0.1 mm². Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos con anticuerpos independientes (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett. (Figura 14C): Cuantificación de depósitos de alfa-sinucleína en neuronas del hipocampo CA1 ipsilaterales determinadas por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imagen automatizado. Los datos mostrados representan el número de células positivas a alfa-sinucleína (neuronas) por 0.1 mm². Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos independientes con anticuerpos (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett.
- Figuras 15A-15C: Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0452 ngl-3-D265A bloquean la diseminación de alfa-sinucleína en ratones transgénicos alfa-sinucleína. (Figura 15A): los ratones α -syn tg inyectados con LV- α -syn en el hipocampo derecho (flechas negras) se inmunizaron pasivamente con dosis semanales de anticuerpos IgG1: ratón anti-alfa-sinucleína: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, o con el anticuerpo de control de isotipo NIP228, durante 13 semanas, seguido de la determinación de la diseminación de alfa-sinucleína por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imágenes automatizado. (Figura 15B): Cuantificación de los datos de inmunorreactividad alfa-sinucleína obtenidos a partir del análisis inmunocitoquímico de las secciones coronales del hipocampo ipsilateral representadas en el panel A. Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos de anticuerpos independientes (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett. (Figura 15C): Cuantificación de los datos de inmunorreactividad de alfa-sinucleína obtenidos del análisis inmunocitoquímico de las secciones coronales del hipocampo contralateral representadas en el panel A. Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos con anticuerpos independientes (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett.
- Figuras 16A-16C: los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0452 ngl-3-D265A reducen la deposición y diseminación de alfa-sinucleína expresada de manera lentiviralmente expresada a lo largo de los axones en ratones transgénicos. (Figura 16A): los ratones α -syn tg inyectados con LV- α -syn en el hipocampo derecho se inmunizaron pasivamente con dosis semanales de anticuerpos IgG1 de ratón anti-alfa-sinucleína: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, o con el anticuerpo de control de isotipo NIP228, durante 13 semanas, seguido de un análisis inmunocitoquímico de los depósitos de alfa-sinucleína a lo largo de los axones trans-hipocampo ipsilateral y contralateral (flechas negras). (Figura 16B): Cuantificación de depósitos ipsilaterales de axa alfa-sinucleína determinada por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imagen automatizado. Cada columna es el valor de la media $\pm$ SEM de 10 tratamientos independientes con anticuerpos (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett. (Figura 16C): Cuantificación de los depósitos de alfa-sinucleína axonal contralateral determinada por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imagen automatizado. Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos con anticuerpos independientes (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett.
- Figuras 17A-17D: Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0452 ngl-3-D265A reducen la deposición de alfa-sinucleína en neuronas de hipocampo CA1 y neuronas neocorticales de capa 5 en ratones transgénicos de alfa-sinucleína. (Figura 17A): los ratones α -syn tg inyectados con LV- α -syn en el hipocampo derecho se inmunizaron pasivamente con dosis

semanales de anticuerpos IgG1 de ratón alfa-sinucleína: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, o con el anticuerpo de control de isotipo NIP228, durante 13 semanas, seguido de un análisis inmunocitoquímico de los depósitos de alfa-sinucleína en las neuronas del hipocampo CA1 ipsilaterales y las neuronas neocorticales de la capa 5 ipsilateral (flechas negras). (Figura 17B): Cuantificación de depósitos de alfa-sinucleína en neuronas neocorticales de la capa 5 ipsilateral determinada por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imagen automatizado. Los datos mostrados representan el número de células positivas a alfa-sinucleína (neuronas) por 0.1 mm². Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos independientes con anticuerpos (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett. (Figura 17C): Cuantificación de depósitos de alfa-sinucleína en neuronas del hipocampo ipsilaterales CA1 determinadas por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imagen automatizado. Los datos mostrados representan el número de células positivas a alfa-sinucleína (neuronas) por 0.1 mm². Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos independientes con anticuerpos (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett. (Figura 17D): Cuantificación de depósitos de alfa-sinucleína en neuronas del hipocampo CA1 contralateral determinada por inmunocitoquímica con SYN-1 y análisis de imagen automatizado. Los datos mostrados representan el número de células positivas a alfa-sinucleína (neuronas) por 0.1 mm². Cada columna es el valor medio $\pm$ SEM de 10 tratamientos independientes con anticuerpos (n=10 ratones por grupo de tratamiento con anticuerpos). *P<0.05 vs NIP228; ANOVA de 1 vía con postprueba de Dunnett.

Figura 18. La competencia de epítomos de aslo452-ngl3-hlgG1TM con BBBt0626gl-ScFv-Bs2-also0452-ngl-3-hlgG1TM demuestra en un ensayo HTRF que la incorporación de un resto BBB no altera la especificidad de unión de aslo452-ngl3-hlgG1TM. El anticuerpo anti-alfa-sinucleína marcado con Dylight650, aslo0452hgl3-hlgG1TM se une a la alfa sinucleína biotinilada que, a su vez, se une a la estreptavidina marcada con criptato. Después de la excitación del criptato, se produce una transferencia de energía (FRET) y, en la presencia del aslo0452hgl3-hlgG1TM marcado con dylight650, el dylight650 se excita y da como resultado un fluoresceno. Si está presente una IgG competidora, se bloquea la unión del aslo0452 marcado con dylight650 y se evita la excitación del slo00452 marcado con dylight650, lo que resulta en una disminución de la señal fluorescente. Los no marcados aslo0452 y Bbbt0626-Bs2-also0452 hlgG1 TM son capaces de competir con de manera similar con aslo0452-ngl3-hlgG1 TM marcado con dylight650.

Figura 19. La unión de las células endoteliales del cerebro de ratón de BBBt0626gl-BS2-aslo452-ngl-3- hlgG1TM demuestra la participación efectiva del objetivo del resto BBB cuando se acopla a aslo452-ngl3-hlgG1TM. La FMAT (tecnología de ensayo de microvolumen de fluorescencia) o de bola de espejo se han utilizado para determinar la unión específica de los anticuerpos a las células endoteliales del cerebro. Este ensayo mide la unión de las IgG humanas a las células endoteliales del cerebro de ratón (b. End3). Las células b. End3 están unidas de manera similar por Bbbt0626 hlgG1 TM, Bbbt0626glscFv-Bs2-aslo0452-hlgG1TM y Bbbt0626glscFv-Bs2-NIP228 hlgG1TM, pero no por el anticuerpo NIP228 hlgG1 TM de control. Esta unión se detecta con un mAb anti-Fc de ratón (específico para humanos) que a su vez se detecta con un Fc anti-ratón de cabra marcado con Alexafluor647.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente e inesperado de los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543. Este descubrimiento ha llevado a un nuevo grupo de anticuerpos con características compartidas por los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543, así como a subgrupos de anticuerpos que tienen características de aslo0452 ngl-3 y aslo0543, respectivamente.

- En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se deriva del anticuerpo asyn0087 que comprende una región de cadena pesada variable (VH) de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una región de cadena ligera variable (VL) de la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 3, como se describe a continuación.
- En una realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se deriva del anticuerpo asyn0087, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una K_D de menos de 500 nM y se une al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos asyn0087, aslo0452ngl-3 y aslo0543, descritos a continuación.
- Al igual que asyn0087, los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 se unen a la región C-terminal (residuos 96-140) de la α -sinucleína humana. Más específicamente, los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 o su fragmento de unión a antígeno se unen a la región comprendida entre aproximadamente el aminoácido 102 y aproximadamente el aminoácido 130 de la α -sinucleína humana (por ejemplo, SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento se unen a la región comprendida entre aproximadamente el aminoácido 120 y aproximadamente 130 de α -sinucleína humana (por ejemplo, SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento se unen a un epítipo que no es el mismo epítipo que el epítipo unido por el anticuerpo 9E4.
- Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 son selectivos para α -sinucleína. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a otros miembros de la familia de sinucleína, como la β -sinucleína o la γ -sinucleína. Más específicamente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es específico para la α -sinucleína humana.
- Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 se unen a alfa-sinucleína de humano, rata o de cynomolgus. La capacidad de aslo0452 ngl-3 y aslo0543 para unirse a la alfa-sinucleína humana, mono cynomolgus y rata es indicativa de unión a un epítipo diferente en alfa-sinucleína humana en comparación con los anticuerpos que no se unen a alfa-sinucleína humana, mono cynomolgus y rata. Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 son, por lo tanto, capaces de usarse para la evaluación e investigación de seguridad in vivo en modelos de enfermedad de monos cynomolgus y ratas.
- Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 se unen a α -sinucleína humana con alta afinidad. Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 se unen a alfa-sinucleína con un K_D de menos de 500 picomolar (pM), menos de 400 pM, menos de 300 pM, menos de 150 pM, menos de 120 pM, menos de 115 pM, menos de 110 pM o 106 pM o menos según lo medido, por ejemplo, utilizando el análisis de Octeto (ver, por ejemplo, Ejemplo 9). Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 se unen a alfa-sinucleína con una K_D de menos de 300 pM, menos de 250 pM, menos de 200 pM, menos de 150 pM, menos de 120 pM, menos de 110 pM o 108 pM, menos de 100 pM, menos de 80 pM o 74 pM o menos según lo medido, por ejemplo, utilizando el análisis de KinExA (para un protocolo de análisis de referencia de KinExA, consulte, por ejemplo, el Ejemplo 9).
- El fragmento Fab aslo0452 ngl-3 se une a la α -sinucleína humana con alta afinidad. El fragmento Fab aslo0452 ngl-3 se une a la alfa-sinucleína con un K_D de menos de 300 pM, menos de 200 pM, menos de 180 pM, 174 pM o menos según lo medido, por ejemplo, utilizando el análisis KinExA (ver, por ejemplo, Ejemplo 9.3).
- Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 se unen a α -sinucleína humana endógena nativa. Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 se unen a agregados de α -sinucleína humana. En particular, los anticuerpos, por lo tanto, se unen a un epítipo que no es necesario para la agregación. Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 son capaces de secuestrar formas

- monoméricas y agregadas de alfa-sinucleína. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención son capaces de unirse a formas monoméricas y agregadas de alfa-sinucleína.
- 5 Los anticuerpos aslo0452 ngl-3 y aslo0543 se unen a enfermedades relevantes, formas patológicas de α -sinucleína, por ejemplo, cuerpos de Lewy, neuritas de Lewy, puntos de Lewy en los tejidos cerebrales de la enfermedad de Parkinson. Se observa una tinción mínima en el cerebro normal (no enfermo).
- 10 El anticuerpo aslo0452 ngl-3 reduce los niveles de α -sinucleína en el fluido intersticial del cerebro. En particular, el anticuerpo aslo0452 ngl-3 reduce los niveles de α -sinucleína no unida libre en el fluido intersticial del cerebro.
- 15 El anticuerpo aslo0452 ngl-3 reduce los niveles de α -sinucleína en el fluido cefalorraquídeo. En particular, el anticuerpo aslo0452 ngl-3 reduce los niveles de α -sinucleína sin unir en el líquido cefalorraquídeo. El anticuerpo aslo0452 ngl-3 reduce la diseminación de α -sinucleína in vivo. Esta nueva función de inhibir la diseminación de alfa-sinucleína es indicativa de que se une a un epítipo diferente en la alfa-sinucleína humana en comparación con los anticuerpos que no inhiben la diseminación.
- 20 En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno del mismo divulgados en este documento tiene una o más de las propiedades funcionales de aslo0452 ngl-3, por ejemplo, cualquiera de las propiedades funcionales de aslo0452 ngl-3 citadas en el presente documento. En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento tiene una o más de las propiedades funcionales de aslo0543, por ejemplo, cualquiera de las propiedades funcionales de aslo0543 mencionadas en el presente documento.
- 25 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención compite con el anticuerpo aslo0452 ngl-3 y/o aslo0543 por la unión a α -sinucleína humana. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se une al mismo epítipo en α -sinucleína humana que el anticuerpo aslo0452 ngl-3 y/o aslo0543.
- 30 Puede determinarse fácilmente si un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al epítipo del anticuerpo de referencia o fragmento de unión a antígeno como se definió anteriormente. Tales métodos son una cuestión de rutina en el arte. Por ejemplo, un anticuerpo puede compararse con otro mediante un ensayo bioquímico de competición, por lo que dos anticuerpos (uno etiquetado para el propósito de detección y otro no) se incuban simultáneamente con un antígeno dado. Si se logra una señal de unión para el anticuerpo marcado, se dice que los dos anticuerpos reconocen epítopos distintos, no superpuestos, en la proteína de interés. Si no se obtiene una señal de unión, a la inversa, se caracterizarían por tener epítopos superpuestos en la secuencia de la proteína porque la unión de un anticuerpo impide estéricamente la unión del segundo anticuerpo. Además, la ubicación de los aminoácidos de un epítipo dado también se puede identificar utilizando proteínas modificadas
- 35 como truncados, secuencias peptídicas lineales derivadas de una secuencia amino primaria de un antígeno, ortólogos de especies, y por digestión proteolítica y análisis espec. de masas de un anticuerpo unido a una proteína dada. Estas metodologías sirven para generar una región de interacción entre el anticuerpo y el antígeno.
- 40 Se puede llevar a cabo una experimentación rutinaria adicional (como la mutación de péptidos y los análisis de unión) para confirmar si cualquier falta observada de unión se debe, de hecho, a la unión al epítipo de la invención o si es responsable de algún otro fenómeno (como el impedimento estérico). Dichos experimentos pueden llevarse a cabo utilizando ELISA, RIA, Biacore, citometría de flujo u otros ensayos de unión de anticuerpos conocidos.
- 45

Por ejemplo, para un mapeo fino de un epítipo específico, los modelos matemáticos de la interfaz epítipo: paratopo se pueden derivar de los datos generados a través de la resolución de la estructura del complejo antígeno: anticuerpo utilizando un método de imágenes de alta resolución como la co-cristalización con difracción de rayos X. Para confirmar la relevancia del modelo matemático derivado, en términos de identificar los residuos de contacto clave que definen el epítipo, se debe realizar una mutagénesis puntual del antígeno y se debe establecer un análisis del efecto sobre la fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo causado por tales mutaciones. Usando esta combinación de métodos, se puede establecer un mapa exacto de los residuos de contacto clave que comprenden el epítipo.

Los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al epítipo del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención pueden generarse produciendo variantes del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. Dichos anticuerpos variantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden tener CDR que comparten un alto nivel de identidad con las CDR del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cualquiera de las CDR divulgadas en este documento de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno divulgados en este documento puede diferir en 1 o 2 residuos de aminoácidos en comparación con una o más de las secuencias de CDR específicas mencionadas aquí (por ejemplo, una o más de las CDR que tienen las SEQ ID NO: 5, 15, 16, 20, 10 y 21). Además, dichos anticuerpos pueden tener una o más variaciones (por ejemplo, una sustitución conservadora de aminoácidos) en las regiones marco.

En una realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención tienen variaciones en las secuencias de aminoácidos de CDR que mantienen al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% y hasta el 99% de identidad de secuencia con las CDR del anticuerpo aslo0452 ngl-3.

En particular, se contemplan sustituciones de aminoácidos conservativas. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que tienen cadenas laterales relacionadas. Los aminoácidos codificados genéticamente generalmente se dividen en familias: (1) ácidos: aspartato, glutamato; (2) básico: lisina, arginina, histidina; (3) no polares: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Estas familias pueden clasificarse aún más: la serina y la treonina son una familia hidroxil alifática; La asparagina y la glutamina son una familia que contiene amidas; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y la fenilalanina, el triptófano y la tirosina son una familia aromática. Por lo tanto, en general se podría esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente, no tendrá un efecto importante sobre la función de unión o las propiedades del anticuerpo resultante, especialmente si el reemplazo no involucra un aminoácido dentro de un sitio de CDR.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención comprende al menos una CDR seleccionada de:

- (i) H-CDR1 de la SEQ ID NO: 5,
- (ii) H-CDR2 de la SEQ ID NO: 6,
- (iii) H-CDR3 de la SEQ ID NO: 7,
- (iv) L-CDR1 de la SEQ ID NO: 9,
- (v) L-CDR2 de la SEQ ID NO: 10,

(vi) L-CDR3 de la SEQ ID NO: 11.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención tiene al menos una CDR seleccionado de las CDR del anticuerpo aslo0452 ngl-3, es decir, al menos una CDR seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 21.

En otra realización, la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo aslo0452 ngl-3; y/o la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo aslo0452 ngl-3. Por lo tanto, en una realización, la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención es CDR3 de la SEQ ID NO: 16 de la cadena pesada del anticuerpo aslo0452 ngl-3; y/o la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención es CDR3 de la SEQ ID NO: 21 de la cadena ligera del anticuerpo aslo0452 ngl-3.

En una realización adicional, la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo aslo0452 ngl-3.

En una realización, la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo aslo0452 ngl-3.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención tiene las seis CDR del anticuerpo aslo0452 ngl-3, es decir, tres CDR de cadena pesada que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16; y tres CDR de cadena ligera que tienen secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 21.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende una cadena pesada variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de nucleótidos definida por SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con La secuencia de nucleótidos definida por la SEQ ID NO: 18.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia de nucleótidos definida por la SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de nucleótidos definida por la SEQ ID NO: 18.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende una cadena pesada variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad a la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 19.

En una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende (i) una cadena pesada variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 19, y (ii) las seis CDR del anticuerpo aslo0452 ngl-3.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención que comprende una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

- 5 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención tiene las seis CDR del anticuerpo aslo0543.

Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención comprende:

a) tres CDR de cadena pesada que tienen secuencias:

- 10 (i) H-CDR1 de la SEQ ID NO: 25,
(ii) H-CDR2 de la SEQ ID NO: 26; y
(iii) H-CDR3 de la SEQ ID NO: 27, y

b) tres CDR de cadena ligera que tienen secuencias:

- (i) L-CDR1 de la SEQ ID NO: 31,
15 (ii) L-CDR2 de la SEQ ID NO: 32; y
(iii) L-CDR3 de la SEQ ID NO: 33.

En una realización adicional, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada variable que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con la secuencia definida por la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera variable que tenga al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad a la secuencia definida por la SEQ ID NO: 19 y además comprende:

a) tres CDR de cadena pesada que tienen secuencias:

- (vii) H-CDR1 de la SEQ ID NO: 25,
25 (viii) H-CDR2 de la SEQ ID NO: 26; y
(ix) H-CDR3 de la SEQ ID NO: 27, y

b) tres CDR de cadena ligera que tienen secuencias:

- (vii) L-CDR1 de la SEQ ID NO: 31,
(viii) L-CDR2 de la SEQ ID NO: 32; y
30 (ix) L-CDR3 de la SEQ ID NO: 33.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada variable que tiene una secuencia de nucleótidos definida por la SEQ ID NO: 23 y una cadena ligera variable que tiene una secuencia de nucleótidos definida por la SEQ ID NO: 29.

- 35 La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención que comprende una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30.

- 40 En una realización adicional, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ

ID NO: 22 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 28.

5 La región marco y las CDR o un anticuerpo pueden definirse con precisión (ver, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services (1991), 91-3242, 1991; and Chothia *et al.* J. Mol. Biol. (1987), 196:901-917, ambos incorporados aquí como referencia).

10 Se contemplan variaciones menores en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que están abarcadas por la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia o secuencias de aminoácidos mantengan al menos el 75%, más preferiblemente al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, y lo más preferiblemente al menos 99% de identidad de secuencia con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención como se define en cualquier parte del presente documento. En particular, se contemplan reemplazos de aminoácidos conservativos.

15 La invención también proporciona una secuencia de aminoácidos de cadena única que comprende la cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como se define en cualquier parte del presente documento. La invención también proporciona una secuencia de aminoácidos de cadena única que comprende la cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención como se define en cualquier parte del presente documento.

20 La alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de alineación de homología local de Smith y Waterman (Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2(1981), 484; incorporado aquí como referencia), por el algoritmo de Needleman & Wunsch (Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. (1970), 48: 443; incorporada aquí por referencia) mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman (Pearson & Lipman, Proc Natl Acad Sci utiliza (1988), 85: 2444; incorporada aquí por referencia), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA - Paquete de software de análisis de secuencia del Genetics Computer Group, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), o mediante inspección visual (véase Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausbel et al, eds, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. And John Wiley & Sons, Inc. (1995 Supplement) Ausubel; incorporado aquí como referencia).

25 Ejemplos de algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de similitud o identidad de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (ver Altschul et al. J. Mol. Biol. (1990), 215(3): 403-410; y "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>" del Centro Nacional de Información Biotecnológica; los cuales se incorporan aquí como referencia).

30 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se aísla. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se purifica.

35 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención es un anticuerpo humanizado. En otra realización más, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención es un anticuerpo humano.

40 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es una IgA, IgD, IgE, IgM o IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de los mismos.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención tiene una afinidad de unión reducida a los receptores Fc de IgG. Así, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la invención tiene un bajo efecto inmunogénico. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo IgG1
5 TM o fragmento de unión a antígeno del mismo. El IgG1 TM es un mutante triple de IgG1, que contiene 3 mutaciones puntuales (L234F/L235E/P331S) en el dominio Fc que reducen la afinidad de unión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a receptores Fc-gamma (FcγRs) (Oganesyan et al. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, (2008) 64: 700-704; incorporado aquí como referencia). En algunas realizaciones, la prevención mediada por
10 anticuerpos de la alfa-sinucleína diseminada por los anticuerpos de la invención, por lo tanto, no requiere funciones efectoras asociadas con Fc como un mecanismo de acción clave.

Los fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, Fv, scFv, dAb, Fd, Fab', F(ab')₂ o una región determinante de complementariedad (CDR) aislada que tiene marco suficiente para unirse. Un fragmento Fab puede ser un fragmento monovalente que consiste en los dominios
15 VL, VH, CL y CH1. Un fragmento F(ab')₂ puede ser un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra. Un fragmento Fc puede consistir en los dominios CH2 y CH3. Un fragmento Fv puede consistir en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo. Un fragmento dAb (Ward et al. *Nature* (1989), 341: 544-546; incorporado aquí como referencia) puede consistir en un dominio VH. Una
20 región determinante de complementariedad aislada (CDR) que tiene marco suficiente para unirse puede ser una porción de unión a antígeno de una región variable.

Una porción de unión a antígeno de una región variable de cadena ligera y una porción de unión a antígeno de una región variable de cadena pesada, por ejemplo, los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un
25 conector sintético que permite para que se formen como una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. *Science* (1988), 242(4877): 423-426 y Huston y otros, *Proc Natl Acad Sci* utiliza (1988), 85: 5879-5883; ambos se incorporan aquí como referencia). Estos se obtienen utilizando técnicas convencionales
30 conocidas por los expertos en la técnica, y las porciones se analizan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden tener cualquiera o todas las propiedades ventajosas como se define anteriormente o combinaciones de los mismos. En particular, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos
35 de la invención pueden ser selectivos para la alfa-sinucleína y ser capaces de retardar o prevenir la transmisión de célula a célula y la dispersión de la alfa-sinucleína in vivo.

La funcionalidad del anticuerpo resultante o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención y en particular (i) su capacidad para unirse al epítipo de alfa-sinucleína; y (ii) su capacidad para retardar o prevenir la transmisión de célula a célula y la dispersión de alfa-sinucleína in vivo puede determinarse fácilmente mediante el ensayo de su actividad
40 específica utilizando las técnicas descritas en este documento en los Ejemplos.

Esta divulgación proporciona composiciones para el suministro del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención a través de la barrera hematoencefálica (BBB) utilizando una molécula transportadora que puede cruzar células
45 endoteliales del cerebro mientras está asociada con dicho anticuerpo o fragmento, por ejemplo, mientras está fusionada o conjugado a dicho anticuerpo o fragmento. Las secuencias de BBB se proporcionan en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, el término "carga útil" se utiliza como una abreviatura para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe
50 aquí, cuyo transporte a través de la BBB puede ser facilitado por una molécula transportadora

como se proporciona en el presente documento. En realizaciones particulares, la “carga útil” cubre la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos de la invención, más particularmente la región variable de la cadena pesada de also0452 ngl-3 o aslo0543.

- 5 Una carga útil puede ser parte de la molécula transportadora, por ejemplo, como un polipéptido de fusión, o unirse al polipéptido a través de enlaces disulfuro u otros enlaces covalentes. Alternativamente, la carga útil puede asociarse con la molécula transportadora de cualquier manera que permita que la molécula transportadora facilite su transporte a través de la BBB, como se describe más adelante. En ciertos aspectos, la carga útil sigue siendo parte de la molécula transportadora después del transporte de BBB y retiene la actividad del sistema nervioso central (SNC) en esa forma. Alternativamente, la carga útil puede asociarse con la molécula transportadora durante el transporte de BBB, pero de una manera que le permita disociarse con la molécula transportadora después del transporte de BBB.

- 10 La divulgación proporciona además métodos para el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o trastorno del SNC, en particular una α -sinucleinopatía, que comprende el uso de dichas moléculas transportadoras asociadas con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma de acuerdo con la invención.

- 15 En ciertos aspectos, esta descripción proporciona una molécula transportadora aislada que comprende un polipéptido derivado de inmunoglobulina, en ciertos aspectos, el polipéptido es un mimético o no mimético del anticuerpo del camélido FC5, identificado y aislado utilizando la tecnología de ensayo de micro-volumen de fluorescencia (FMAT) para detectar la unión a las células endoteliales microvasculares del cerebro (BMVEC), por ejemplo, células B.End3 de ratón. En ciertos aspectos, el polipéptido derivado de inmunoglobulina es un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, donde “activo” significa que la molécula transportadora puede, por ejemplo, unirse a BMVEC en una o más especies, por ejemplo, BMVEC de ratón, BMVEC de rata, mono cynomolgus BMVEC, o BMVEC humano, se internaliza en BMVEC de una o más especies, y/o cruza la barrera hematoencefálica ya sea solo o asociado a una carga útil.

- 20 En algunas realizaciones, la molécula transportadora BBB es una molécula transportadora BBB descrita en la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. No. 62/094,503, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. En ciertos aspectos, la molécula transportadora comprende uno o más de Bbbt0241, Bbbt0626, Bbbt0626gl, Bbbt0632, BBBt0632gl Bbbt0654, Bbbt0726, Bbbt0727, Bbbt0732, Bbbt0754, Bbbt0674, Bbbt0755, Bbbt0643, Bbbt0579 o Bbbt0671 como se describe en la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. 62/094,503, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

- 25 En una realización particular, la molécula transportadora BBB es Bbbt0626 o BBBt0632.
- 30 En ciertas realizaciones, la molécula transportadora BBB tiene una línea germinal, por ejemplo, Bbbt0626gl es una versión germinal de Bbbt0626, llamada “Bbbt0626gl”.

En una realización particular adicional, la molécula transportadora BBB es BBBt0632gl o Bbbt0626gl.

- 35 En ciertos aspectos, la molécula transportadora no se une a BMVEC, pero aún es capaz de transportarse a través de la BBB como se indica en el ensayo de la transcitosis in vitro.

- 40 Con referencia a las moléculas transportadoras BBB, las secuencias de CDR de VH descritas corresponden a las ubicaciones de numeración de Kabat clásica, a saber, Kabat H-CDR1 está en las posiciones 31-35, H-CDR2 es una posición 50-65, y H-CDR3 está en las posiciones 95-102. L-CDR2 y L-CDR3 también corresponden a las ubicaciones de numeración de Kabat clásica, es decir, las posiciones 50-56 y 89-97, respectivamente. Como se utiliza en este documento, los términos “L-CDR1” o “cadena ligera CDR1” corresponden a las secuencias ubicadas en las posiciones de Kabat 23-34 en el VL (en contraste, la ubicación clásica de L-

CDR1 de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat corresponde a las posiciones 24-34).

5 En ciertos aspectos, el polipéptido derivado de inmunoglobulina comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, el polipéptido derivado de inmunoglobulina puede incluir una región-1 determinante de complementariedad de cadena pesada de inmunoglobulina (H-CDR1), una región-2 determinante de complementariedad de cadena pesada de inmunoglobulina (H-CDR2), una
10 región-3 determinante de complementariedad de cadena pesada de inmunoglobulina (H-CDR3). En ciertos aspectos, el polipéptido derivado de inmunoglobulina puede comprender, o alternativamente comprender, CDR de cadena ligera de inmunoglobulina. Por ejemplo, el polipéptido derivado de inmunoglobulina puede incluir una región-1 determinante de complementariedad de cadena ligera de inmunoglobulina (L-CDR1), una región-2 determinante de complementariedad de cadena ligera de inmunoglobulina (L-CDR2) y una
15 determinación de complementariedad de cadena ligera de inmunoglobulina región-3 (L-CDR3).

En ciertos aspectos, el polipéptido derivado de inmunoglobulina contiene una H-CDR1, una H-CDR2, una H-CDR3, una L-CDR1, una L-CDR2 y una L-CDR3 con las siguientes secuencias de aminoácidos, respectivamente:

20 (a) SEQ ID NO: 40 como H-CDR1, SEQ ID NO: 41 como H-CDR2, SEQ ID NO: 42 como H-CDR3, SEQ ID NO: 36 como L-CDR1, SEQ ID NO: 37 como L-CDR2, y SEQ ID NO: 38 como L-CDR3, en donde las CDR son similares a las de Bbbt0626 y Bbbt0626gl;

(b) SEQ ID NO: 40 como H-CDR1, SEQ ID NO: 41 como H-CDR2, SEQ ID NO: 42 como H-CDR3, SEQ ID NO: 44 como L-CDR1, SEQ ID NO: 45 como L-CDR2, y SEQ ID NO: 46 como L-CDR3, en donde las CDR son idénticas a las de Bbbt0626 y Bbbt0626gl.

25 En ciertos aspectos, el polipéptido derivado de inmunoglobulina contiene una H-CDR1, una H-CDR2, una H-CDR3, una L-CDR1, una L-CDR2 y una L-CDR3 con las siguientes secuencias de aminoácidos, respectivamente:

30 (a) SEQ ID NO: 49 como H-CDR1, SEQ ID NO: 50 como H-CDR2, SEQ ID NO: 51 como H-CDR3, SEQ ID NO: 53 como L-CDR1, SEQ ID NO: 54 como L-CDR2, y SEQ ID NO: 55 como L-CDR3, en donde las CDR son similares a las de Bbbt0632gl;

(b) SEQ ID NO: 49 como H-CDR1, SEQ ID NO: 50 como H-CDR2, SEQ ID NO: 51 como H-CDR3, SEQ ID NO: 53 como L-CDR1, SEQ ID NO: 54 como L-CDR2, y SEQ ID NO: 55 como L-CDR3, en donde las CDR son idénticas a las de Bbbt0632gl;

35 En ciertas realizaciones alternativas, una o más CDR como se describió anteriormente son idénticas a las CDR citadas, excepto, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 deleciones, sustituciones o inserciones de aminoácidos individuales.

En ciertas realizaciones, la molécula transportadora como se proporcionó anteriormente puede cruzar la barrera hematoencefálica.

40 En ciertos aspectos, la H-CDR1, la H-CDR2, la H-CDR3, la L-CDR1, la L-CDR2 y la L-CDR3 pueden situarse en regiones marco de inmunoglobulina para producir un anticuerpo VH y un anticuerpo VL. En ciertos aspectos, las regiones marco pueden ser regiones marco derivadas de humanos. En ciertos aspectos, el anticuerpo VH y el anticuerpo VL se fusionan, por ejemplo, a través de un enlazador peptídico flexible, para formar una molécula scFv. En ciertos aspectos, el VH y el VL comprenden además uno o más dominios constantes de
45 inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH3, un dominio CH3, un dominio CL-kappa y/o un dominio CL lambda. En ciertos aspectos, uno o más dominios constantes de inmunoglobulina se derivan de una inmunoglobulina humana,

por ejemplo, una inmunoglobulina IgG1 humana. En ciertos aspectos, los dominios VH, VL y/o constantes pueden comprender mutaciones para facilitar, por ejemplo, una semivida más larga o más corta, funciones efectoras aumentadas o reducidas, o la capacidad de unir una molécula de carga útil mediante fusión peptídica, un enlace disulfuro, o conjugación química.

- 5 En ciertos aspectos de la invención, se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la invención asociados con una molécula transportadora que puede cruzar las células endoteliales del cerebro como se describe a continuación.

- 10 En aspectos particulares, esta descripción proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención asociada con una molécula transportadora que comprende un polipéptido derivado de inmunoglobulina, donde el polipéptido comprende una región variable de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina y una región de cadena ligera (VL) inmunoglobulina. En ciertos aspectos, el polipéptido derivado de inmunoglobulina comprende secuencias proporcionadas en el presente documento, que incluyen:

- 15 (a) una secuencia de aminoácidos VH al menos 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a SEQ ID NO: 39 y una secuencia de aminoácidos VL al menos 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 43, donde la SEQ ID NO: 39 y la SEQ ID NO: 43 codifican las regiones VH y VL de Bbbt0626gl,

- 20 (b) una secuencia de aminoácidos VH al menos 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 47 y una secuencia de aminoácidos VL al menos 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 43, donde la SEQ ID NO: 47 y la SEQ ID NO: 43 codifican las regiones VH y VL de Bbbt0626,

- 25 (c) una secuencia de aminoácidos VH al menos 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 48 y una secuencia de aminoácidos VL al menos 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 43, donde la SEQ ID NO: 48 y la SEQ ID NO: 43 codifican las regiones VH y VL de Bbbt0632

- 30 En ciertos aspectos, esta descripción proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención asociada con una molécula transportadora que comprende un polipéptido derivado de inmunoglobulina, donde el polipéptido derivado de inmunoglobulina comprende una región VH y una región VL, donde:

- (a) la región VH comprende la SEQ ID NO: 34 y la región VL comprende la SEQ ID NO: 35; o
- (b) la región VH comprende la SEQ ID NO: 39 y la región VL comprende la SEQ ID NO: 43; o
- (c) la región VH comprende la SEQ ID NO: 39 y la región VL comprende la SEQ ID NO: 35; o
- (d) la región VH comprende la SEQ ID NO: 47 y la región VL comprende la SEQ ID NO: 43; o
- 35 (e) la región VH comprende la SEQ ID NO: 47 y la región VL comprende la SEQ ID NO: 35; o
- (f) la región VH comprende la SEQ ID NO: 48 y la región VL comprende la SEQ ID NO: 52

En una realización adicional, las regiones VH y VL de la molécula transportadora como se describe anteriormente están unidas covalentemente para formar un fragmento de cadena sencilla (ScFv).

- 40 En ciertos aspectos, la molécula transportadora provista aquí tiene actividad transportadora, por ejemplo, puede unirse a BMVEC de una o más especies, por ejemplo, ratón, rata, mono cynomolgus o BMVEC humano, puede internalizarse en BMVEC de una o más especies, o puede atravesar la barrera hematoencefálica.

En ciertos aspectos, una molécula transportadora como se proporciona en el presente documento comprende un polipéptido derivado de inmunoglobulina, donde el polipéptido derivado de inmunoglobulina comprende un anticuerpo o un fragmento penetrable de BBB del mismo.

- 5 Un “fragmento penetrable de BBB” como se describe en este documento es un fragmento de la molécula transportadora que puede unirse específicamente a BMVEC de una o más especies y atravesar BMVEC in vitro o in vivo desde la vasculatura periférica a la vasculatura del SNC. Si un fragmento dado es un fragmento penetrable de BBB puede probarse mediante una variedad de ensayos in vitro o in vivo conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la molécula transportadora se puede probar en un ensayo de transcitosis in vitro, en un ensayo in vivo como un ensayo de diuresis, como se describe en el documento US 62/094.503. Otros ensayos que podrían usarse para medir la entrega de cargas útiles in vivo a través de la BBB incluyen, sin limitación, lesión crónica por constricción (ICC); el modelo de lesión nerviosa (SNI) o la ligadura del nervio espinal (SNL), todos los cuales se pueden medir mediante el movimiento de la pata o el método de Hargreaves (Hargreaves K, et al. Pain; 1988; 32; 77-88). En ciertos aspectos, una molécula transportadora como se proporciona en el presente documento puede unirse a BMVEC de una o más especies, por ejemplo, BMVEC humano, mono cynomolgus, murino, rata o bovino. La unión puede demostrarse de diversas maneras conocidas por personas con experiencia ordinaria en la técnica, por ejemplo, en un ensayo FMAT como se describe en el documento US 62/094,503. En ciertos aspectos, los BMVEC son células endoteliales capilares del cerebro (BCEC). En ciertos aspectos, una molécula transportadora como se proporciona en el presente documento puede pasar a través de una monocapa de BCEC en un ensayo de transcitosis in vitro. En ciertos aspectos, la actividad de la molécula transportadora se puede demostrar mediante la visualización de la molécula transportadora en el SNC. Por ejemplo, una molécula transportadora marcada con tritio se puede administrar a un sujeto, por ejemplo, un ratón periféricamente, por ejemplo, por vía intravenosa, y luego visualizarlo en el SNC a través de una radiografía cuantitativa de todo el cuerpo. En ciertos aspectos, la molécula transportadora se localiza en regiones específicas del SNC, por ejemplo, la corteza del cerebelo, la materia gris del cerebro, la materia gris de la médula espinal, la protuberancia o una combinación de ellas.

- En ciertos aspectos, una molécula transportadora como se describe en el presente documento comprende un anticuerpo o un fragmento penetrable por BBB del mismo que comprende o consiste en dos o más subunidades, por ejemplo, una cadena pesada o un fragmento de la misma y una cadena ligera o un fragmento de la misma, donde la cadena pesada y la cadena ligera están asociadas, por ejemplo, como una proteína de fusión única (por ejemplo, un scFv), o como dos subunidades mantenidas juntas por uno o más enlaces disulfuro. En ciertos aspectos, la cadena pesada comprende un dominio o región VH y la cadena ligera comprende un dominio o región VL.

- En una realización, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención asociado a una molécula transportadora de barrera hematoencefálica como se describe a continuación.

- En una realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención está asociado a una molécula transportadora de barrera hematoencefálica, en la que la molécula transportadora es un fragmento de cadena sencilla (scFv) que comprende:

- i. la región variable de la cadena pesada (VH) de BBBt0626gl de la SEQ ID NO: 39 y la región variable de la cadena ligera (VL) de BBBt0626gl de la SEQ ID NO: 43, o
- ii. la región variable de la cadena pesada (VH) de BBBt0626 de la SEQ ID NO: 47 y la región variable de la cadena ligera (VL) de la BBBt0626 de la SEQ ID NO: 43,

iii. la región variable de la cadena pesada (VH) de BBBt0632gl de la SEQ ID NO: 48 y la región variable de la cadena ligera (VL) de la BBBt0632gl de la SEQ ID NO: 52

5 En ciertos aspectos, la cadena pesada comprende además un dominio constante de cadena pesada, por ejemplo, un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y/o un dominio CH3, o un fragmento del mismo. En ciertos aspectos, el dominio constante de la cadena pesada es un dominio constante de IgG o un fragmento del mismo, por ejemplo, un dominio constante de IgG humana, por ejemplo, un dominio constante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano. En ciertos aspectos, el dominio constante de IgG o fragmento del mismo comprende una glicosilación alterada y/o una o más sustituciones de aminoácidos en relación con un dominio constante de IgG de tipo silvestre en el que la IgG modificada tiene una propiedad particular, por ejemplo, un aumento o disminución de la semi vida en comparación con la semivida de una IgG que tiene el dominio constante de IgG de tipo silvestre, ya sea un aumento o disminución de las funciones efectoras en relación con un dominio constante de IgG de tipo silvestre, o la capacidad de unir fracciones heterólogas mediante, por ejemplo, un enlace peptídico, un enlace disulfuro, o una conjugación química. En ciertos aspectos, el dominio constante de IgG o su fragmento tiene una glicosilación alterada en relación con un dominio constante de IgG de tipo silvestre en el que la IgG modificada tiene una propiedad particular, por ejemplo, una semivida aumentada o disminuida en comparación con la semivida de un IgG que tiene el dominio constante de IgG de tipo silvestre, ya sea aumento o disminución de las funciones efectoras en relación con un dominio constante de IgG de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención está asociado con BBBt0626 o BBBt0626gl, como se define aquí, formando moléculas de anticuerpo biespecíficas.

25 En otras realizaciones, dichos anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención comprenden el esqueleto IgG1 TM humano (es decir, las regiones CH1, CH2, CH3 de cadena pesada de un IgG1 TM) asociadas con un fragmento de cadena sencilla (scFv) que comprende las regiones VH y VL de BBBt0626 o BBBt0626gl injertado en el terminal N ("formato BiS2") o en el terminal C ("formato BiS3") de la cadena pesada o en el terminal N ("formato BiS1") de la VL, de un anticuerpo anti- α -sinucleína de acuerdo con la invención. Las referencias de formato BiS son las descritas en DiMasi et al. J Mol Biol. 2009 de 30 de octubre: 393(3): 672-92.

En algunas realizaciones, dichos anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención comprenden además una cadena ligera que comprende la región CL kappa o lambda asociada con la VL de un anticuerpo anti- α -sinucleína de acuerdo con la invención.

35 En realizaciones particulares, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención comprenden el esqueleto IgG1 TM humano asociado con:

(i) un fragmento de cadena sencilla (scFv) de BBBt0626gl que comprende la región variable de la cadena pesada (VH) de la SEQ ID NO: 39 y la región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 43; o

40 (ii) un fragmento de cadena sencilla (scFv) de Bbbt0626 que comprende la región variable de la cadena pesada (VH) de la SEQ ID NO: 47 y la región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 43,

en el que dicho ScFv se injerta en el terminal N (formato BiS2) o terminal C (formato BiS3) de la cadena pesada de aslo0452 ngl-3 de SEQ ID NO: 12 o terminal N ("Formato BiS1") de la cadena ligera de SEQ ID NO. 17.

En otras realizaciones particulares, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención comprenden el esqueleto IgG1 TM humano asociado con un fragmento de cadena sencilla (scFv) de BBBt0626gl que comprende (i) la región variable de cadena pesada (VH) de la SEQ

ID NO: 39 y (ii) la región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 43; en el que dicho ScFv está injertado en el terminal N (formato BiS2) o en el terminal C (formato BiS3) de la cadena pesada de aslo0452 ngl-3 de la SEQ ID NO: 12 o en el terminal N ("formato BiS1") de la cadena ligera de SEQ ID NO: 17.

- 5 En otras realizaciones particulares, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención comprenden el esqueleto IgG1 TM humano asociado con:

(i) un fragmento de cadena sencilla (scFv) de BBbt0626gl que comprende la región variable de cadena pesada (VH) de la SEQ ID NO: 39 y la región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 43; o

- 10 (ii) un fragmento de cadena sencilla (scFv) de Bbbt0626 que comprende la región variable de la cadena pesada (VH) de la SEQ ID NO: 47 y la región variable de la cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 43,

en donde dicho ScFv se injerta en el terminal N (formato BiS2) o terminal C (formato BiS3) de la cadena pesada de aslo0543 de la SEQ ID NO: 22 o terminal N ("formato BiS1") de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 28.

- 15 La presente invención también proporciona el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención para uso como un medicamento.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad del sistema nervioso central, en particular una α -sinucleinopatía. En una realización, la α -sinucleinopatía se selecciona de la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la atrofia de sistemas múltiples (MSA). En una realización preferida, la α -sinucleinopatía es la enfermedad de Parkinson (EP).

La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la invención para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad del sistema nervioso central, en particular una α -sinucleinopatía. En una realización, la α -sinucleinopatía se selecciona entre la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la atrofia de sistemas múltiples (MSA). En una realización preferida, la α -sinucleinopatía es la enfermedad de Parkinson (EP).

La invención también proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad en un paciente, el método que comprende administrar al paciente un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. En una realización, la α -sinucleinopatía se selecciona entre la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la atrofia de sistemas múltiples (MSA). En una realización preferida, la α -sinucleinopatía es la enfermedad de Parkinson (EP).

En uso, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención es capaz de tratar o prevenir la progresión de la enfermedad mediante la inhibición de la dispersión y dispersión de alfa-sinucleína in vivo. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención proporciona así una clara ventaja sobre otros agentes terapéuticos. La invención también proporciona un método para ralentizar o prevenir la progresión de la enfermedad en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de la invención al paciente.

En una realización, dicho método para tratar una enfermedad comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. En otra realización, dicho método para prevenir la enfermedad o retardar o prevenir la progresión de la enfermedad comprende administrar una cantidad

profilácticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

5 Los intervalos de dosificación para la administración del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención son los que producen el efecto terapéutico deseado. Se apreciará que el intervalo de dosificación requerido depende de la naturaleza precisa del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo o de la composición, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la edad del paciente, la naturaleza, el alcance o la gravedad de la condición del paciente, las contraindicaciones, si las hay, y el juicio del médico tratante. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar
10 utilizando rutinas empíricas estándar para la optimización.

Las dosis adecuadas están en el rango de 1 a 50 mg por kg de peso corporal. Pueden estar en el rango de 5 a 30 mg/kg, 10 a 25 mg/kg, o 15 a 20 mg/kg. La dosis unitaria se puede administrar diariamente o con menos frecuencia, por ejemplo, semanalmente o mensualmente.

15 La administración puede efectuarse mediante administraciones repetidas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, durante un período de tiempo prolongado. La administración puede ser concurrente o secuencial, y puede efectuarse en cualquier orden.

20 La prevención o tratamiento definido en el presente documento se puede aplicar como una terapia única o puede implicar, además del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención, la administración de otros agentes o terapias establecidas normalmente utilizadas en el tratamiento de α -sinucleinopatías (tales como L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), agonistas de la dopamina (receptor), inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y/o inhibidores de la monoaminoxidasa de tipo B (MAO-B)). La administración de otros agentes
25 o terapias establecidas puede ser en combinación con, o como complemento de, o en conjunto con, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la invención y puede ser por medio de dosificación simultánea, secuencial o separada del componentes individuales del tratamiento.

30 El tratamiento de combinación se puede llevar a cabo de cualquier manera que el experto en la materia considere necesario o conveniente, y para los fines de esta especificación, no hay limitaciones con respecto al orden, la cantidad, la repetición o la cantidad relativa de los compuestos que se utilizarán en combinación se contempla.

Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad o el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que cuando se administra solo o en combinación a un paciente
35 para tratar una enfermedad, o al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad, es suficiente para afectar dicho tratamiento de la enfermedad, o síntoma. La cantidad terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo, por ejemplo, del anticuerpo y/o los síntomas de la enfermedad, la edad, el peso y/o la salud del paciente a tratar, y el juicio del médico que prescribe. Los expertos en la técnica pueden determinar una cantidad apropiada
40 terapéuticamente eficaz en cualquier caso dado o pueden determinarse mediante experimentación rutinaria. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se ve compensado por los efectos beneficiosos.

Una "cantidad profilácticamente efectiva" es cualquier cantidad del anticuerpo o el anticuerpo
45 o fragmento de unión a antígeno del mismo que, cuando se administra solo o en combinación a un paciente, inhibe o retrasa la aparición o reincidencia de la enfermedad, o al menos uno de los síntomas clínicos de la enfermedad. En algunas realizaciones, la cantidad profilácticamente efectiva previene la aparición o la recurrencia de la enfermedad por

completo. "Inhibir" la aparición significa disminuir la probabilidad de aparición de la enfermedad o prevenir la aparición de la enfermedad por completo.

- La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. De acuerdo con
- 5 la invención, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados pueden facilitar el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones adecuadas para la administración farmacéutica.
- 10 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para, pero no se limitan a, administración parenteral, por ejemplo, intramuscular, subcutánea o intravenosa. Las composiciones adecuadas para inyección intramuscular, subcutánea o intravenosa incluyen soluciones acuosas estériles.
- 15 La composición farmacéutica puede tomar la forma de una solución acuosa y puede incluir tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. La composición farmacéutica puede contener adicional o alternativamente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. La composición farmacéutica se puede preparar como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos
- 20 lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.
- 25 La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. La presente invención también proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la invención. La presente invención proporciona además una célula huésped que comprende el vector de la invención.
- 30 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención no están limitados a un método particular de generación o producción. Por lo tanto, la invención proporciona anticuerpos que se han fabricado a partir de un hibridoma que secreta el anticuerpo, así como anticuerpos producidos a partir de una célula producida de forma recombinante que se ha transformado o transfectado con un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican el
- 35 anticuerpo. Dichos hibridomas, células producidas de forma recombinante y ácidos nucleicos forman parte de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos.

- Se aislaron anticuerpos específicos anti- α -syn de las bibliotecas de presentación de fagos
- 40 utilizando una serie de ciclos de selección en α -syn humano recombinante ("hu α -syn"), ambos inmovilizados pasivamente en pozos de microtitulación y libres en solución. Las bibliotecas de presentación del fago Fv (scFv) humano de cadena sencilla clonadas en un vector fagémido basado en el fago filamentoso M13 se utilizaron para las selecciones (Lloyd et al, Protein Eng Des Sel. (2009), 22(3): 159-68; y Vaughan et al., Nat Biotechnol. (1996), 14(3): 309-14; ambos
- 45 se incorporan aquí como referencia).

Un número representativo de clones individuales de las salidas de selección después de dos o tres rondas de selección descritas anteriormente se seleccionaron inicialmente como fragmentos scFv solubles en extractos de E. coli periplásmicos (Kipriyanov et al. J Immunol

Methods (1997) 200: 69-77; incorporado aquí por referencia) en un ensayo homogéneo de FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) HTRF® (Fluorescencia Homogénea Resuelta en el Tiempo, Cisbio International) para determinar la unión a la α -sinucleína de humano soluble.

- 5 Un ensayo HTRF® (Figura 1) es una tecnología de ensayo homogénea que utiliza la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia entre un fluoróforo donante y aceptor que se encuentra muy cerca (Mathis G Clin Chem (1995) 41: 1391-1397; incorporado aquí por referencia). Este ensayo se utilizó para medir las interacciones macromoleculares acoplando directa o indirectamente una de las moléculas de interés a un fluoróforo donante, por ejemplo, Criptato de europio (Eu3+) y acoplamiento de la otra molécula de interés a un fluoróforo aceptor XL665, (una alofococianina reticulada estable). La excitación de la molécula de criptato (a 337 nm) produjo una emisión de fluorescencia a 620 nm. La energía de esta emisión se transfirió a XL665 cerca del criptato, lo que dio como resultado la emisión de una fluorescencia específica de larga duración (a 665 nm) del XL665. Se midieron las señales específicas tanto del donante (a 620 nm) como del aceptor (a 665 nm), permitiendo el cálculo de una relación de 665/620 nm que compensa la presencia de compuestos coloreados en el ensayo.

- Las muestras de scFv anti- α -syn no purificadas se analizaron para determinar su unión a α -syn biotinilado. Se agregaron 5 microlitros de una solución que contenía 40 nM de α -syn humana biotinilada combinada con estreptavidina terbio 0.8 nM (Cisbio International, 610SATLB) a una placa de ensayo de 384 pozos de bajo volumen (Costar, 3676). A continuación, se agregaron a la placa 10 microlitros de cada dilución de la muestra de prueba de anticuerpos. Finalmente, se agregaron 5 microlitros de una solución que contenía DC anti-myc (Cisbio International, 661 MYCDAB) a la placa de ensayo. Todas las diluciones se realizaron en un tampón de ensayo que contenía fluoruro potásico 0.8 M (BDH 103444T) y albúmina de suero bovino al 0.1% (BSA, Sigma A9576) en Dulbeccos PBS (Invitrogen, 14190185). Las placas de ensayo se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente, seguido de 16 horas a 4°C antes de que el tiempo de lectura resolviera la fluorescencia a 620 nm y longitudes de onda de 665 nm utilizando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer).
- Los datos se analizaron calculando la relación de 665/620 nm seguida del % de valores de Delta F para cada muestra. La relación de 665/620 nm se usó para corregir la interferencia de la muestra utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{relación } 665/620 \text{ nm} = \left(\frac{\text{señal } 665 \text{ nm}}{\text{señal } 620 \text{ nm}} \right) \times 10.000$$

35

El % Delta F para cada muestra se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{DeltaF (\%)} = \left(\frac{\text{relación } \frac{665}{620} \text{ nm muestra} - \text{relación } \frac{665}{620} \text{ nm control negativo}}{\text{relación } \frac{665}{620} \text{ nm control negativo}} \right) \times 10.000$$

- 40 El control negativo (unión no específica) se definió reemplazando la muestra de prueba con una α -syn de rata o humana no marcada.

El % de valores de Delta F se utilizaron posteriormente para calcular el % de unión específica como se describe en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de unión específica} = \left(\frac{(\% \text{ Delta } F \text{ de muestra} - \text{NSB Delta } F\%)}{(\% \text{ Delta } F \text{ de unión Total} - \text{NSB Delta } F\%)} \right) \times 100$$

5 Los valores de IC₅₀ se determinaron utilizando el software GraphPad Prism mediante el ajuste de curvas utilizando una ecuación logística de cuatro parámetros:

$$Y = \text{Inferior} + (\text{superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

X es el logaritmo de concentración.

Y es un enlace específico

Y comienza en la parte Inferior y va a la parte superior con una forma sigmoide.

- 10 Los clones de Fv de cadena sencilla que se unían a la α -syn humana como extractos periplásmicos no purificados se sometieron a secuenciación de ADN (Osbourne et al, Immunotechnology (1996), 2: 181-196; y Vaughan et al., Nat Biotechnol. (1996), 14(3); 309-14; ambos de los cuales se incorporan aquí como referencia). Los scFv únicos se expresaron nuevamente en bacterias y se purificaron mediante cromatografía de afinidad (como se describe en el documento WO 01/66754; incorporado por referencia). Las potencias de estas
- 15 muestras se determinaron mediante una titulación de la preparación purificada para unirse a la α -syn humana biotinilada en el ensayo HTRF como se describe anteriormente. Las preparaciones de scFv purificadas que exhibieron la interacción α -syn más fuerte se seleccionaron para la conversión al formato IgG.
- 20 Al valorar el anticuerpo en el ensayo de HTRF, los clones se clasificaron según la fuerza de unión a la α -syn. Los mejores aglutinantes de α -syn se analizaron para determinar tanto la cinética de unión a α -syn (k_{off}) como las IgG en un biosensor Octet Red (consulte el método descrito en el Ejemplo 9), así como la selectividad de los miembros de la familia de sinucleína (α -syn, β -syn, γ -syn humanos) (ver método como se describe en el Ejemplo 4) y para reactividad cruzada con α -syn de murino (ver método como se describe en el Ejemplo 5).
- 25

Ejemplo 2: Derivación de aslo0452 nql-3

- Se identificó un clon específico de α -syn reactivo en C, asyn0087, mediante la selección de la unión a la α -syn humana en un ensayo DELFIA (consulte el método descrito en el Ejemplo 4). Asyn0087 se une específicamente a los humanos, monos cynomolgus y roedores α -syn (ver método como se describe en el Ejemplo 5). Asyn0087 fue revertido a la secuencia de línea germinal humana más cercana posible (Tomlinson VBASE. MRC Center of Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido, 1997; incorporada aquí como referencia) que no afectó la potencia mediante técnicas de mutagénesis estándar antes de la optimización. Después de la línea germinal, el clon fue reevaluado para unirse a α -syn. No se observaron efectos
- 30 perjudiciales.
- 35

- Se crearon bibliotecas grandes de scFv-fagos derivadas del clon líder mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de las regiones determinantes de complementariedad (VH) (CDR) 2 y 3 de la cadena pesada (VL) y CDR 1 y 3 de cadena ligera (VL) utilizando técnicas estándar de biología molecular como se describe en Clarkson y Lowman (2004) (Phage display: A practical approach. Oxford: Oxford University Press; incorporado aquí como referencia). Las bibliotecas se sometieron a selecciones de presentación de fagos basadas en afinidad realizadas en α -syn humano biotinilado soluble con el fin de seleccionar variantes con mayor afinidad para α -syn humano. Las selecciones se realizaron esencialmente como se describió anteriormente, con la excepción de reducir la concentración de α -syn humano
- 40 biotinilado soluble para cada ronda de selección realizada.
- 45

Los clones representativos de cada salida de selección se seleccionaron inicialmente como fragmentos scFv solubles en extractos de *E. coli* periplásmicos en un ensayo HTRF por su capacidad para competir por la unión a α -syn soluble contra el clon de unión α -syn parental asyn0087. El rendimiento de cada biblioteca en estas pantallas de población se usó para

5 informar qué bibliotecas de mutagénesis de CDR se agregaron genéticamente, o se “recombinaron” para crear nuevas bibliotecas, y estas bibliotecas recombinadas se sometieron a rondas adicionales de selecciones conducidas por afinidad realizadas en α -syn humanos solubles biotinilados.

Para los clones derivados de bibliotecas tanto de la mutagénesis individual como

10 recombinada, después del análisis de secuencia de los aglutinantes positivos, los clones se expresaron y purificaron como fragmentos scFv e IgG y la unión a α -syn soluble se reconfirmó mediante los ensayos de HTRF de competición de epítipo. Al valorar el anticuerpo en el ensayo de competición del epítipo HTRF, los clones se clasificaron según sus valores de IC₅₀ para la mejora relativa de la unión a la α -syn en comparación con la IgG parental asyn0087.

15 Los mejores aglutinantes de α -syn se analizaron adicionalmente para la selectividad de miembros de la familia de sinucleína (α -syn, β -syn, γ -syn humano) y para la reactividad cruzada con cynomolgus y α -syn de rata tanto por ensayo de HTRF de unión directa como por ensayo de HTRF de competición de epítipo.

A partir de estas rondas iterativas de recombinación de bibliotecas y selección, se identificaron

20 dos potentes clones reactivos cruzados de α -syn, cynomolgus y α -syn de rata, aslo0452 ngl-1 y aslo0467.

Se realizó mutagénesis de punto único en aslo0452 ngl-1 para cada una de las CDR donde se observaron mejoras positivas en la potencia de la IC₅₀. Cada posición en la CDR elegida se mutó individualmente a través de todos los 20 posibles residuos de aminoácidos, y se

25 seleccionó nuevamente mediante el ensayo de HTRF de competición del epítipo para IC₅₀ mejorada en comparación con la IgG aslo0452 ngl-1. Se identificaron múltiples residuos en cuatro CDR (H2, H3, L1 y L3) y se combinaron tanto en aslo0452 ngl-1 como en aslo0467, y se evaluaron nuevamente mediante el ensayo HTRF de competición de epítipo para IC₅₀ mejorada en comparación con aslo0452 ngl-1. De estos experimentos, los dos aglutinantes

30 más mejorados se identificaron como aslo0452 ngl-3 y aslo0543.

La Figura 2 compara las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de asyn0087, aslo0452 ngl-3 y aslo0543.

Ejemplo 2.1: Cambio de formato de scFv a TM IgG1

Clones de Fv de cadena sencilla con propiedades de unión α -syn deseables se convirtió en

35 función efectora nula inmunoglobulina completa G1 TM (IgG1 TM) (Oganesyan et al. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2008), 64(Pt 6): 700-4; incorporado aquí como referencia) formato de anticuerpo esencialmente como se describe por Persic et al. (Persic et al, Gene (1997) 187: 9-18; incorporado aquí como referencia) con las siguientes modificaciones. Se incluyó un fragmento OriP en los vectores de expresión para facilitar el uso con células

40 transitorias de CHO y para permitir la replicación episomal. El dominio pesado variable (VH) se clonó en un vector (pEU1.4) que contiene los dominios constantes de la cadena pesada humana y los elementos reguladores para expresar la cadena pesada IgG1 TM completa en células de mamíferos. De manera similar, el dominio variable de luz (VL) se clonó en un vector (pEU4.4) para la expresión de los dominios constantes de la cadena ligera humana (λ)

45 y los elementos reguladores para expresar la cadena ligera de IgG completa en células de mamíferos. Para obtener IgG, los vectores de expresión de IgG de las cadenas pesada y ligera se transfectaron en células de mamíferos transitorias con CHO (Daramola et al, Biotechnol Prog (2014) 30: 132-141; incorporado aquí como referencia). Las IgG se expresaron y se secretaron en el medio. Las cosechas se filtraron antes de la purificación,

50 luego la IgG se purificó utilizando cromatografía de proteína A. Los sobrenadantes de cultivo

se cargaron en una columna de tamaño apropiado de Proteína Cerámica A (BioSeptra) y se lavaron con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. NaCl 250 mM. La IgG unida se eluyó de la columna utilizando citrato sódico 0.1 M (pH 3,0) y se neutralizó mediante la adición de Tris-HCl (pH 9,0). El material eluido se intercambió con tampón en PBS utilizando columnas Nap10 (Amersham, No. 17-0854-02) y la concentración de IgG se determinó espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos de la IgG (Mach et al, Anal Biochem (1992) 200: 74-80; incorporado aquí como referencia). Las IgG purificadas se analizaron para determinar la pureza de la agregación y la degradación utilizando SEC-HPLC y mediante SDS-PAGE.

El fundamento para usar IgG1 TM como el formato de fármaco candidato es minimizar la muerte no dirigida debido a la activación de las células inmunitarias y de complemento (es decir, la producción excesiva de C3a que puede causar inflamación). La muerte no dirigida de células puede ser desencadenada por la acumulación potencial de complejos inmunitarios formados por el fármaco candidato y la α -sinucleína extracelular que se ha demostrado que interactúa con las membranas lipídicas (Bartels et al., Biophys. J. (2010), 99: 2116-2124; incorporado aquí como referencia). Se eligió el formato IgG1 TM ya que se ha demostrado que tiene una unión insignificante a los receptores Fc γ (Fc γ R) y una activación del complemento mediada por C1q reducida por complejos inmunitarios (Oganesyan et al. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2008), 64(Pt 6): 700-4; incorporado aquí como referencia).

Para minimizar cualquier riesgo potencial de inmunogenicidad, los marcos de aslo0452 ngl-3 están tan cerca de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana como sea posible sin afectar la potencia. Esto significa que algunos aminoácidos en aslo0452 ngl-3, incluidos los residuos de Vernier (Foote y Winter, J Mol Biol. (1992), 224(2): 487-99; incorporados aquí como referencia), no están mutados al más cercano secuencia de la línea germinal humana. Para el dominio V_H de aslo0452 ngl-3 hay un residuo de Vernier en la región V que no está mutado a la línea germinal humana IGVH3-23 y la secuencia IGJH6 (Figura 3C). Para el dominio V_L de aslo0452 ngl-3, todos los residuos de la estructura coinciden con la línea germinal humana IGLV5-45 y las secuencias IGJL2 o IGJL3 (Figura 3D).

Ejemplo 3: Afinidad optimizada de confirmación de epítipo Ig anti- α -syn

La alfa, beta y gamma, sinucleína de humano recombinante, las versiones truncadas recombinantes de alfa-sinucleína de humano (aa1-60, aa1-95, aa61-140, 96-140, Δ NAC y NCAP) y alfa-sinucleína de ratón fueron obtenidos de rPeptide LLC. El mapeo de epítopos en bruto se realizó utilizando los truncados α -syn disponibles en el mercado.

En resumen, se recubrió un microgramo por mililitro de cada truncado en un pozo de microtitulación durante la noche a 4°C. Después de enjuagar los pozos en PBS, se agregó una dilución de 1 μ g/ml de cada anticuerpo anti- α -syn. Después de 1 h de incubación y lavado, el anticuerpo unido se detectó mediante la adición de una IgG antihumana conjugada con HRP o Eu³⁺. Después de la incubación y el lavado, se añadió el sustrato de detección apropiado (solución de TMB o DELFIA Enhancer respectivamente) y la placa se leyó en un lector de placas de microtitulación.

Estos estudios de unión al epítipo revelaron que el aislado de plomo, asyn0087, reconoce un epítipo ubicado en la región terminal C de la proteína α -syn entre los aminoácidos 102 y 130 (Figura 4A). Tanto aslo0452 ngl-3 como aslo0543 mantienen su reconocimiento del mismo epítipo ubicado en la región de terminal C de la proteína α -syn entre los aminoácidos 102 y 130 como su aislado líder parental asyn0087 (Figura 4B).

Ejemplo 4: Especificidad de aslo0452 ngl-3 y aslo0543 para α -syn en relación con los miembros de la familia de sinucleína que utilizan un ensayo de HTRF de competición de epítipo

Es importante que un anticuerpo destinado a ser utilizado en aplicaciones terapéuticas sea específico para el α -syn humano, con el fin de para minimizar los posibles riesgos de seguridad relacionados con la interacción fuera del objetivo con las otras sinucleínas (β -sinucleína y γ -sinucleína).

- 5 La especificidad de aslo0452 ngl-3 y aslo0543 para α -syn sobre los otros miembros de la familia de sinucleína, β -syn y γ -syn, se determinó utilizando el ensayo de competencia de epítipo HTRF que midió la unión de α -syn humana biotinilada al anticuerpo en solución.

- 10 α -syn, β -syn y γ -syn se valoraron en el ensayo, y se evaluó la selectividad de la IgG aslo0452 ngl-3 y la IgG aslo0543 midiendo el grado de inhibición de la unión de la α -syn humana biotinilada a aslo0452 ngl-3/aslo0543. Los valores de IC_{50} se determinaron mediante la curva ajustando los datos a una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando el software PRISM 6® (Graphpad). También se usaron ensayos de HTRF más sensibles que miden la unión directa de IgG a α -syn, β -syn y γ -syn humanos para confirmar la especificidad α -syn de epítipo (datos no mostrados). Para el control negativo, la muestra de prueba de anticuerpos se reemplazó con un anticuerpo de control de isotipo o un tampón solamente.

En la Figura 5 se muestran los valores representativos de IC_{50} obtenidos con las proteínas α -syn, β -syn y γ -syn en los ensayos de competición de epítipos de aslo0452 ngl-3 y aslo0543 HTRF. No se observó unión a β -syn y γ -syn a las concentraciones probadas (hasta 5 μ M), lo que demuestra que aslo0452 ngl-3 y aslo0543 son selectivos para α -syn.

- 20 Ejemplo 5: Especificidad de aslo0452 ngl-3 para humanos, monos cynomolgus y ratas α -syn utilizando un ensayo de competencia de epítipos de HTRF

- 25 En vista de las aplicaciones terapéuticas, es importante que el anticuerpo tenga reactividad cruzada con cynomolgus α -sinucleína y se desee que sea reactivo cruzado con la α -sinucleína de rata, dentro de 10 veces la observada contra la α -syn humana. Esto es para permitir que los estudios de seguridad se lleven a cabo tanto en monos cynomolgus como en especies de ratas.

La especificidad de aslo0452 ngl-3 y aslo0543 para α -syn de humanos, monos cynomolgus y ratas se determinó utilizando el ensayo de competición epítipo HTRF que mide la unión de la α -syn humana biotinilada a aslo0452 ngl-3 en solución.

- 30 α -syn de humanos, monos cynomolgus y ratas se valoraron en el ensayo, y se evaluó la selectividad del anticuerpo midiendo el grado de inhibición de la unión de α -syn humano biotinilado al anticuerpo. Los valores de IC_{50} se determinaron mediante la curva ajustando los datos a una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando el software PRISM 6® (Graphpad). La reactividad cruzada de especies de aslo0452 ngl-3 y aslo0543 también se confirmó utilizando un formato de ensayo HTRF de unión directa (no mostrado). Aslo0452 ngl-3 (o aslo0543) se tituló en el ensayo para competir por la unión α -syn de mono o de rata humana o cynomolgus a aslo0452 ngl-3 (o aslo0543) mediante el ensayo HTRF. Para los controles negativos, la muestra de prueba de anticuerpos se reemplazó con un anticuerpo de control de isotipo o un tampón solamente.

- 40 En la Figura 6 se muestran los valores representativos de IC_{50} obtenidos con proteínas α -syn humanas, de mono cynomolgus y ratas en el ensayo de competencia del epítipo HTRF. Aslo0452 ngl-3 se une a α -syn de humano y cynomolgus con valores de IC_{50} de 5.7 nM y 6.8 nM respectivamente, y se unen a α -syn de rata con un valor de IC_{50} de 19.6 nM, dentro de 4 veces. Aslo0543 se une a la α -syn de humano y cynomolgus con valores de IC_{50} de 2,0 nM y 2,1 nM respectivamente, y se une a α -syn de rata con un valor de IC_{50} de 3,8 nM, en 2 veces.

La capacidad de aslo0452 ngl-3 para unirse a humanos, monos cynomolgus y α -syn de rata es indicativa de la unión a un epítipo diferente en la α -syn de humano en comparación con los anticuerpos que no se unen α -syn de humano, mono cynomolgus y rata.

Ejemplo 6: Especificidad de los clones de afinidad optimizada para α -syn nativa medida por citometría de flujo

La especificidad de las IgG anti- α -syn optimizadas de afinidad, aslo0452 ngl-3 y aslo0543, para la unión a la α -syn humana endógena nativa se determinó mediante citometría de flujo utilizando estirpes celulares positivas y negativas de α -syn.

Brevemente, las células de neuroblastoma SHSY5Y (α -syn positivo) y las células de cáncer de mama BT-20 (α -syn negativo) se fijaron en formaldehído al 0.01% y luego se permeabilizaron con Tween 20 al 0.5% (v/v) antes de la incubación con anticuerpos anti- α -syn, control positivo o anticuerpos de control de isotipos. Después de lavados extensos, el anticuerpo unido se detectó por incubación con un anticuerpo secundario anti-humano IgG-FITC. Después de lavados adicionales, las células se analizaron con un aparato FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y el análisis de los datos se realizó con el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Los datos se representan como histogramas que muestran la diferencia entre las células teñidas solas y las células teñidas con anticuerpos primarios. Los resultados en la Figura 7A muestran un cambio en la señal fluorescente en presencia de asyn0087 (panel D) en células SH-SY5Y positivas α -syn, en comparación con el control de isotipo y el anticuerpo secundario solo (panel B), lo que indica el reconocimiento de una expresión endógena α -syn. Asyn0087 no se une a la estirpe celular de cáncer de mama humano negativo α -syn, BT-20 (panel C). Los resultados en la Figura 7B muestran un fuerte cambio en la señal fluorescente en presencia de aslo0452 ngl-3 o aslo0543 (panel H) comparable al anticuerpo de control positivo, 4D6 en células SH-SY5Y positivas α -syn (panel F) y sin cambio en las células BT-20 negativas α -syn (panel G). Esto demuestra que tanto el aslo0452 ngl-3 como el aslo0543 se unen al α -syn humano intracelular nativo, expresado endógenamente.

Ejemplo 7: Especificidad de las IgG anti- α -syn optimizadas para α -syn de humano agregado mediante ELISA de DELFIA.

Las preparaciones fibrilares o agregados de α -syn de humano se generaron según lo descrito por Emadi et al. (Emadi et al, Biochemistry (2004), 43: 2871 -2878.; incorporado aquí como referencia). Brevemente, se dividieron en alícuotas 200 μ l de 50 μ de α -syn recombinante en un tubo Sarstedt de 1,8 ml y se colocaron en una incubadora de agitación a 37°C durante 3 días a 280 rpm. La presencia de α -syn agregado se determinó mediante la incorporación de tioflavina T agregada a una concentración final de 10 μ M, se incubó en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente y se leyó la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 450 nm y una longitud de onda de emisión de 485 nm en un lector de microplacas Envision.

La especificidad de las IgG anti- α -syn optimizadas de afinidad, aslo0452 ngl-3 y aslo0543, y el anticuerpo líder asyn0087, para el α -syn humano agregado se determinó utilizando un ensayo de captura de anticuerpos DELFIA®. Este ensayo midió la captura de α -syn humano agregado por aslo0452 ngl-3, aslo0543 o asyn0087 en un ELISA por pares. Brevemente, se inmovilizó una versión IgG1 de ratón del anticuerpo anti- α -syn en el pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos (Nunc). Después del bloqueo, se incubó la α -syn de humano agregada o monomérica en los pocillos. Después del lavado, se detectó la α -syn humana capturada mediante la adición de la versión IgG1 TM humana del mismo anticuerpo anti- α -syn y, posteriormente, un conjugado de IgG-Europium antihumano (Perkin Elmer) o un conjugado de IgG-HRP antihumano. Después de la incubación y el lavado, se añadió el sustrato de detección apropiado (solución de TMB o DELFIA Enhancer respectivamente) y la placa se leyó en un lector de placas de microtitulación.

En este ensayo, solo el α -syn de humano agregado se capturará y detectará, ya que presenta múltiples copias del mismo epítipo en un solo agregado. Para α -syn monomérico solo está presente una copia del epítipo, por lo tanto, el segundo anticuerpo de detección no puede

unirse en presencia del anticuerpo de captura. Los datos se resumen en la Figura 8. El aislado principal, asyn0087, es capaz de unirse a la α -syn de humano recombinante agregada. Por lo tanto, el epítipo al que se une asyn0087 no está involucrado en la agregación de α -syn. Tanto aslo0452 ngl-3 como aslo0543 conservaron su capacidad de unirse a la α -syn recombinante humana agregada.

Ejemplo 8: Especificidad de IgG anti- α -syn optimizada en tejidos pertinentes de la enfermedad mediante inmunohistoquímica

La especificidad de las IgG anti- α -syn de afinidad optimizadas, aslo0452 ngl-3 y aslo0543, y el anticuerpo líder asyn0087, para las formas relevantes de la enfermedad humana se determinó mediante tinción inmunohistoquímica del tejido cerebral de la enfermedad de Parkinson. Los resultados se muestran en la Figura 9 y demuestran que al igual que asyn0087, aslo0452 ngl-3 y aslo0543 pueden reconocer formas patológicas relevantes para la enfermedad del síndrome humano en secciones de tejido cerebral de la enfermedad de Parkinson, incluidos cuerpos de Lewy, neuritas de Lewy, agregados neuronales, puntos de Lewy y tejido cerebral de fondo. No se observó tinción inespecífica en tejido cerebral normal o sano.

Ejemplo 9: Determinación de afinidad de anticuerpos anti- α -syn

Las constantes de disociación de equilibrio (K_D) para las IgG anti- α -syn de humano se determinaron utilizando dos tecnologías de plataforma: Octet Red (Forte Bio) y KinExA (Sapidyne Instruments).

Ambos sistemas de ensayo mostraron buena concordancia, lo que indica que la afinidad aslo0452 ngl-3 estaba en el rango sub-nanomolar. La Tabla 1 muestra las mediciones de afinidad derivadas de los clones anti- α -syn clave generados a lo largo del proceso de aislamiento y optimización principales.

Ejemplo 9.1: Afinidad de asSo0452 ngl-3 por octeto

La afinidad de la IgG aslo0452 ngl-3 para el avi-tag α -syn-Flag-His humano monomérico de expresión bacteriana recombinante se estimó utilizando un instrumento Octet Red. Aslo0452 ngl-3 se mezcló previamente con concentraciones variables de cada ligando hasta que se alcanzó el equilibrio. La cantidad de anticuerpo libre se midió luego utilizando el octeto mediante la captura de aslo0452 ngl-3 libre utilizando un α -syn biotinilado inmovilizado sobre sensores recubiertos con estreptavidina. La cantidad de anticuerpo libre detectada en cada concentración α -syn se representó en función de la concentración del ligando y se utilizó el software KinExA para calcular la constante de disociación en equilibrio (K_D). Los resultados mostrados en la Tabla 1 demuestran que la IgG aslo0452 ngl-3 se une a α -syn de humano con una afinidad de 106 pM.

Ejemplo 9.2: Afinidad de aslo0452 ngl-3 por KinExA

Además, se determinó la afinidad en fase de solución (K_D) de aslo0452 ngl-3 IgG para la α -syn biotinilada humana monomérica recombinante expresada en bacterias utilizando un instrumento KinExA (Sapidyne Instruments). Aslo0452 ngl-3 se mezcló previamente con concentraciones variables de cada ligando hasta que se alcanzó el equilibrio. La cantidad de anticuerpo libre se midió luego utilizando el KinExA capturando el aslo0452 ngl-3 libre utilizando perlas recubiertas con α -syn, lavando el material no unido y detectando el anticuerpo unido utilizando un anticuerpo específico de especie marcado con fluorescencia. La cantidad de anticuerpo libre detectado en cada concentración α -syn se representó en función de la concentración del ligando y se utilizó el software KinExA para calcular la constante de disociación en equilibrio (K_D). Los resultados mostrados en la Tabla 1 demuestran que la IgG aslo0452 ngl-3 se une a α -syn con una afinidad de 74 pM, mostrando una buena concordancia con el ensayo de afinidad de fase de solución de Octet anterior.

Ejemplo 9.3: Afinidad del fragmento Fab aslo0452 ngl-3 por KinExA

El fragmento Fab aslo0452 ngl-3 se une a la sinucleína con una alta afinidad. El valor K_D del fragmento Fab aslo0452 ngl-3 para α -sinucleína, medido por el análisis KinExA (como se describe en el ejemplo anterior para el anticuerpo completo), es de 174 pM (95% CI: 15-177 pM).

Ejemplo 10: Efectos de aslo0452 ngl-3 sobre los niveles de α -sinucleína no unida libre en el líquido intersticial de la corteza prefrontal (ISF) de ratas Sprague Dawley macho

Se anestesiaron ratas Sprague Dawley macho adultas (293-417 g; Harlan, Países Bajos) y se implantaron guías en la corteza prefrontal.

- 10 Un día antes del experimento, se implantaron sondas push pull (1-3 MDa membrana de 4 mm) en el corteza prefrontal utilizando un marco estereotáxico (coordenadas para las sondas: AP=-3.4 mm (a bregma), lateral + 0.8 mm (a línea media), ventral -5.0 mm (a la duramadre), la barra incisiva se fijó en -3.3 mm (todas las coordenadas de acuerdo con Paxinos y Watson, El cerebro de rata en coordenadas estereotáxicas, Academic Press, Nueva York, 6ª edición, 15 2008). Las sondas se unieron al cráneo con un tornillo de acero inoxidable y cemento dental.

- El día del experimento, las sondas de microdiálisis de inserción por presión se conectaron con un tubo PEEK flexible (Western Analytical Products Inc. Estados Unidos; PK005-020) a una bomba de microperfusión (Harvard) y perfundida con CSF artificial (perfundido), que contiene NaCl 147 mM, KCl 3.0 mM, CaCl₂ 1.2 mM y MgCl₂ 1.2 mM + BSA a 0.2% a un índice de fluidez de 0.5 μ L/min. Las salidas de las sondas se conectaron a tubos flexibles de FEP. Después de un mínimo de dos horas de preestabilización, se dosificaron aslo0452 ngl-3 formulado en PBS o PBS solo (vehículo) a 30 o 0 mg/kg, respectivamente. El compuesto se administró a 2 ml/kg por vía intravenosa. Las muestras de microdiálisis se recogieron a intervalos de 120 minutos. Las muestras se recolectaron en mini viales (Microbiotech/se AB, Suecia; 4001029). Todas las muestras se almacenaron a -80°C.

- Para determinar la concentración de α -sinucleína libre en ISF de rata, las muestras de microdiálisis se sometieron primero a inmunoprecipitación para eliminar aslo0452 ngl-3. La inmunoprecipitación co-precipita la α -sinucleína unida a anticuerpos terapéuticos, mientras que la α -sinucleína "libre" no unida permanece en el sobrenadante. Se añadió una solución de perlas de proteína A (Dynabeads® Protein A) a una placa de 96 pozos sin faldón (polipropileno, 0.2 ml) y se lavó dos veces con TBST (50 mM TBS más 0.1% de Tween 20) utilizando un imán (lado DynaMag™ 96) para separar las perlas de la solución. Muestras de microdiálisis ISF de rata descongeladas (10 o 20 μ l) se agregaron a cada pocillo, se mezclaron con perlas pipeteando hacia arriba y hacia abajo y se incubaron a 4°C con rotación de inclinación durante 10 minutos. Las perlas se sedimentaron utilizando el imán dos veces para asegurar la eliminación completa de las perlas. Las muestras de ISF inmunoprecipitadas se transfirieron a una placa de 96 pozos de un kit ELISA anti- α -sinucleína (kit ELISA cuantitativo Sensolyte™, humano/ratón/rata, AnaSpec, EE. UU., AS-55550) con un tampón diluyente de muestra ya agregado a un total volumen de 100 μ l. Las muestras de calibración, 100 μ l por pocillo, se agregaron a la placa por duplicado y se agregaron 50 μ l de solución de trabajo del anticuerpo de detección a cada pocillo. La placa se incubó a +4-8°C durante la noche mientras se agitaba y se protegió de la luz y luego se lavó seis veces con 350 μ l de tampón de lavado. Finalmente, se agregaron 100 μ l de sustrato de color TMB a cada pozo y la placa se incubó en 10-15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Para detener la reacción, se agregaron 50 μ l de Solución de Paro a cada pozo y la placa se leyó dentro de las 2 horas a una absorbancia de 450 nm. La cuantificación se realizó trazando la respuesta de la curva estándar como unidades de absorbancia en la escala lineal frente a la concentración en la escala logarítmica. Se usó una función de cuatro parámetros para el ajuste de curvas.

Se demostró una disminución dependiente del tiempo de la α -sinucleína libre en la ISF (Figura 10) después de una única administración intravenosa de 30 mg/kg de aslo0452 ngl-3.

Ejemplo 11: Efectos de aslo0452 ngl-3 sobre los niveles de α -sinucleína libre no unidos en el CSF de ratas Sprague Dawley macho

- 5 Se anestesiaron ratas Sprague Dawley macho adultas y se colocaron catéteres en la cisterna magna para acomodar el muestreo de CSF. Se insertó una cánula permanente de 0.8 cm en la cisterna magna y se exteriorizó a través de una incisión en la parte superior del cráneo. El extremo del catéter CSF se fijó en su posición con cemento acrílico dental y se unió al cráneo con tres tornillos de acero inoxidable. Se permitió a los animales un mínimo de 2 días de recuperación antes de que se administrara el compuesto.

Aslo0452 ngl-3 se formuló en un tampón para dosis a 3, 10, 30 o 100 mg/kg. El compuesto o vehículo solo se administró a 2 ml/kg por vía intravenosa.

- 15 Después de recoger al menos cuatro muestras de CSF limpias tomadas durante un mínimo de dos días, se administró el compuesto. Todos los animales recibieron la dosis de aslo0452 ngl-3 o vehículo en el día "0". Se recogieron muestras de CSF en cada punto de tiempo indicado. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta el envío.

- 20 Para determinar la α -sinucleína libre en el CSF, la α -sinucleína unida a aslo0452 ngl-3, se elimina por inmunoprecipitación (IP) antes del análisis. La IP coprecipitará una α -sinucleína unida a anticuerpos terapéuticos, mientras que la α -sinucleína "libre" no unida permanece en el sobrenadante. La determinación de los niveles libres de α -sinucleína en el sobrenadante se realiza utilizando un kit comercial ELISA obtenido de Anaspec. El análisis se realizó como se describe para los resultados ISF (como se describe en el Ejemplo 10).

- 25 Se demostró una disminución dependiente de la dosis y el tiempo de la α -sinucleína libre en el CSF (Figura 11) después de una única administración intravenosa de aslo0452 ngl-3 en el rango de dosis de 3 a 100 mg/kg.

Ejemplo 12: Caracterización funcional de aslo0452 ngl-3 mediante la reducción de la difusión de α -sinucleína en un modelo lentiviral in vivo de alfa-sinucleinopatía

- 30 La capacidad de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína de alta afinidad, aslo0452 ngl-3, para bloquear la difusión de la alfa-sinucleína se investigó utilizando un modelo de ratón lentiviral in vivo de alfa-sinucleinopatía. Para este propósito, tanto los ratones de tipo silvestre no transgénicos (no-tg) como los ratones transgénicos que sobreexpresan alfa-sinucleína (a-syn tg) fueron inyectados con un vector lentiviral que expresa alfa-sinucleína (LV-a-syn) en el hipocampo derecho, y luego se inmunizaron pasivamente semanalmente durante 13 semanas con anticuerpos IgG1 de ratón anti-alfa sinucleína, incluyendo aslo0452 ngl-3, y un ratón de control de isotipo IgG1 NIP228. Al final del período de inmunización, los ratones se sometieron a eutanasia y sus cerebros se fijaron en PFA al 4%, luego se seccionaron coronariamente y se analizaron mediante inmunocitoquímica con análisis de imagen automático para determinar los niveles de inmunorreactividad alfa-sinucleína ipsilateral y contralateral al sitio del Inyección LV- α -syn.

- 40 Cirugía e inmunización pasiva

- 45 Ratones de tipo silvestre no transgénicos de tres a cuatro meses (no-tg; n=40) y ratones transgénicos alfa-sinucleína (α -syn tg; n=40) recibieron una única inyección unilateral en el hipocampo derecho (-2.0, -1.5, -1.3 de Bregma) de un vector lentiviral que expresa alfa-sinucleína (LV- α -syn). Dos semanas después de la cirugía de inyección LV-a-syn, los ratones recibieron dosis semanales de anticuerpos anti-alfa-sinucleína IgG1 de ratón: aslo0452 ngl-3 (no-tg n=10; α -syn tg n=10), aslo0452 ngl-3 D265A (no-tg n=10; α -syn tg n=10), 9E4 (no-tg

n=10; α -syn tg n=10), o se dosificaron con el ratón de control de isotipo NIP228 IgG1 (no tg n=10; α -syn tg n=10).

5 Todas las IgG de ratón se administraron a 20 mg/kg por vía intraperitoneal (IP) durante 13 semanas. Los animales fueron alojados en grupo con un máximo de 4 por jaula. Los animales se mantuvieron en ciclo de luz/oscuridad 12/12 con acceso a alimentos y agua ad libitum. Las jaulas se cambiaron una vez a la semana y se controlaron diariamente. Cualquier evento adverso fue reportado. Todos los animales toleraron los procedimientos quirúrgicos así como las inmunizaciones. Al final del período de tratamiento con anticuerpos, los ratones se sometieron a eutanasia siguiendo las pautas para el tratamiento humanitario de los animales y sus cerebros se seccionaron en serie en los ejes coronales y se evaluaron para el análisis neuropatológico de la dispersión de alfa-sinucleína por métodos inmunocitoquímicos.

Inmunocitoquímica alfa-sinucleína

15 Se extrajeron los cerebros, se fijaron en paraformaldehído al 4% y se cortaron secciones a intervalos de 40 μ m en los ejes coronales utilizando un vibratome y se almacenaron a -30°C en medio crioprotector (30% de glicerina, 30% de etilenglicol, 40% de PBS). Después de los lavados con PBS y las etapas de bloqueo del tampón, las secciones se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario (mAb SYN-1 anti-alfa-sinucleína de BD a una dilución de 1:500), se lavaron en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario (IgG anti-ratón biotinilado de Vector Laboratories a una dilución de 20 1:100). Después de las etapas finales de lavado con PBS, la tinción alfa-sinucleína se localizó utilizando el sistema de detección de complejos de avidina/biotina-peroxidasa (Elite ABC, Vector Laboratories). Luego se analizaron las secciones con análisis automatizado de imágenes para determinar los niveles de alfa-sinucleína ipsilateral y contralateral al sitio de la inyección del vector lentiviral (LV- α -syn).

25 Estadística

Los datos generados a partir de la adquisición automatizada de imágenes de los niveles de alfa-sinucleína en los grupos de tratamiento no-tg y α -syn tg se analizaron utilizando GraphPad Prism Software, San Diego California, EE. UU. ANOVA de una vía se realizó con la prueba posterior de comparación múltiple de Dunnett. Los datos mostrados en las figuras se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre los grupos se consideraron de significación estadística cuando $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron cegados al evaluador. Los grupos de tratamiento con anticuerpos también fueron cegados al evaluador.

Resultados

35 Tanto en ratones no tg como en ratones α -syn tg, la inmunorreactividad de alfa-sinucleína en el lado ipsilateral de LV- α -syn fue intensa en el neuropilo y cubrió la mayor parte de la superficie del hipocampo (Figura 12A, Figura 15A; NIP228 - Ipsilateral). El hipocampo no inyectado contralateral de ratones no tg y ratones α -syn tg también mostró altos niveles de inmunorreactividad alfa-sinucleína, lo que indica que la alfa-sinucleína expresada de forma 40 lentiviral se había propagado desde el hipocampo derecho inyectado al hipocampo izquierdo (Figura 12A, Figura 15A; NIP228 - Contralateral). En este modelo de ratón de inyección de alfa-sinucleína lentiviral, experimentos previos han demostrado que solo la proteína alfa-sinucleína expresada se disemina al lado contralateral sin evidencia de transferencia del lentivirus en sí, según lo determinado por el análisis de PGR (datos no mostrados).

45 Los niveles de hipocampo ipsilateral y contralateral de alfa-sinucleína expresados de forma lentivírica en ratones no tg que se inmunizaron pasivamente con el anticuerpo 9E4 (9E4 - versión de ratón de PRX002 (Prothema)) fueron casi idénticos a los niveles ipsilateral y contralateral de hipocampo expresados de manera lentiviral alfa-sinucleína en ratones no tg que se inmunizaron pasivamente con IgG1 de ratón de control de isotipo NIP228 (Figura 12

A, B, C; 9E4 en comparación con NIP228), lo que indica que 9E4 se administra a 20 mg/kg semanalmente durante 13 semanas a través de IP ruta no bloquea la difusión de alfa-sinucleína en este modelo de difusión de alfa-sinucleína.

5 En contraste, tanto los niveles de hipocampo ipsilateral como contralateral de alfa-sinucleína expresada en forma lentiviral en ratones no tg que se inmunizaron pasivamente con el anticuerpo aslo0452 ngl-3 o una versión mutante nula efectora de aslo0452 ngl-3 (aslo0452-
10 ngl-3-D265A), donde el reemplazo de ácido aspártico por alanina en la posición 265 (D265A) en el ratón IgG1 da como resultado la pérdida de interacción entre este isotipo y los receptores de Fc de IgG de baja afinidad (FcγRIIB y FcγRIII) encontrados en la microglia, fueron
15 significativamente más bajos que los niveles de hipocampo ipsilateral y contralateral de alfa-sinucleína expresados de forma lentiviral en ratones no tg que se inmunizaron pasivamente con IgG1 de ratón de control de isotipo NIP228 (Figura 12 A, B, C: aslo0452-
20 ngl-3-D265A) en comparación con NIP228). Esto indica que la inmunización pasiva de ratones con aslo0452-
20 ngl-3 o con la versión mutante nula D265A efectora de aslo0452-
20 ngl-3 bloquea fuertemente la dispersión de alfa-sinucleína en este modelo de ratón de alfa-sinucleinopatía. Se obtuvieron resultados similares cuando se inyectó el vector LV-α-syn en el hipocampo derecho de ratones α-syn tg; la inmunización pasiva con aslo0452-
20 ngl-3 o aslo0452-
20 ngl-3-D265A pero no con 9E4 condujo a una reducción robusta y estadísticamente significativa en los niveles ipsilateral y contralateral de inmunorreactividad de alfa-sinucleína en el hipocampo cuando se comparó con ratones α-syn tg tratados con NIP228 (Figura 15 A, B, C).

A mayor aumento, los depósitos inmunorreactivos de alfa-sinucleína expresados de forma lentivírica se observaron a lo largo de los axones ipsilaterales del lado inyectado y los axones contralaterales del lado no inyectado de los ratones no tg (Figura 13A; flechas negras que
25 muestran los axones del hipocampo), lo que sugiere que la alfa-sinucleína que se extiende al hipocampo contralateral puede ocurrir principalmente a lo largo de los axones (dispersión trans-axonal). Los niveles ipsilaterales y contralaterales de los depósitos axonales de alfa-sinucleína en ratones no tg inmunizados pasivamente con el anticuerpo 9E4 o con el control del isotipo NIP228 IgG1 no fueron significativamente diferentes (Figura 13 A, B, C; 9E4 en
30 comparación con NIP228), lo que indica que en nuestras condiciones experimentales, el 9E4 no afecta los niveles de depósitos de alfa-sinucleína axonal ni reduce la difusión de alfa-sinucleína a lo largo de los axones en este modelo de difusión lentiviral-alfa-sinucleinopatía.

En contraste, los niveles ipsilateral y contralateral de depósitos axonales de alfa-sinucleína en ratones no tg inmunizados pasivamente con el anticuerpo aslo0452 ngl-3 o la versión efectora mutante nula de aslo0452-
35 ngl-3 (aslo0452-
35 ngl-3-D265A), fueron significativamente más bajos que los niveles de depósitos de alfa-sinucleína axonales en ratones no tg tratados con IgG1 de control de isotipo NIP228 (Figura 13 A, B, C; aslo0452-
35 ngl-3 & aslo0452-
35 ngl-3-D265A en comparación con NIP228), lo que indica que la inmunización pasiva de ratones con aslo0452-
40 ngl-3 o el efector nulo D265A versión mutante de aslo0452-
40 ngl-3 elimina los depósitos axonales de alfa-sinucleína y bloquea sólidamente la transferencia ipsilateral-contralateral de alfa-sinucleína a lo largo de los axones en este modelo de ratón lentiviral-alfa-sinucleinopatía.

Se obtuvieron resultados muy similares cuando se inyectó el vector LV-α-syn en el hipocampo derecho de ratones α-syn tg; La inmunización pasiva con aslo0452-
45 ngl-3 o aslo0452-
45 ngl-3-D265A pero no con el 9E4 condujo a una reducción robusta y estadísticamente significativa en los niveles ipsilateral y contralateral de inmunorreactividad de alfa-sinucleína a lo largo de los axones cuando se comparó con ratones α-syn tg tratados con NIP228 (Figura 16 A, B, C).

En ratones no tg inyectados con LV-α-syn, se detectó una inmunorreactividad alfa-sinucleína intensa de mayor aumento en el neuropilo del hipocampo ipsilateral y, en menor medida, en el neuropilo de la neocorteza ipsilateral (Figura 14A). Además, se detectaron depósitos intensos de alfa-sinucleína en varios cuerpos celulares neuronales identificables (soma) en la
50 región CA1 del hipocampo ipsilateral y se detectó una inmunorreactividad alfa-sinucleína más débil en las neuronas de la capa 5 de la neocorteza ipsilateral (Figura 14; flechas negras). Si

bien el tratamiento con el anticuerpo 9E4 no alteró significativamente el número de neuronas ipsilaterales del hipocampo CA1 o neuronas neocorticales ipsilaterales de la capa 5 que contienen depósitos de alfa-sinucleína cuando se comparan con ratones no tg inmunizados con IgG de control de isotipo NIP228 (Figura 14 A, B, C; 9E4 en comparación con NIP228), los ratones no tg tratados con el anticuerpo aslo0452 ngl-3 o una versión mutante nula efectora de aslo0452-ngl-3 (aslo0452-ngl-3-D265A) tuvieron un número significativamente reducido de neuronas ipsilaterales CA1 y capa 5 ipsilateral neuronas que contienen depósitos de alfa-sinucleína en comparación con los ratones no tg tratados con IgG de ratón de control de isotipo NIP228 (Figura 14 A, B, C; aslo0452-ngl-3 & aslo0452-ngl-3-D265A en comparación con NIP228).

Además, la intensidad de la inmunorreactividad alfa-sinucleína en el neuropilo y las neuronas de la región ipsilateral CA1 del hipocampo y la región ipsilateral de la capa 5 de la neocorteza fue notablemente menor en aslo0452-ngl-3 tratado y aslo0452-ngl-3-D265A- ratones no tg tratados en comparación con los ratones no tg tratados con IgG de ratón de control de isotipo NIP228 (Figura 14 A; aslo0452-ngl-3 & aslo0452-ngl-3-D265A en comparación con NIP228).

Se obtuvieron resultados similares cuando se inyectó el vector LV- α -syn en el hipocampo derecho de ratones α -syn tg; el tratamiento con aslo0452-ngl-3 o aslo0452-ngl-3-D265A pero no con 9E4 condujo a una disminución estadísticamente significativa en el número de neuronas que contienen una fuerte inmunorreactividad alfa-sinucleína en las regiones ipsilaterales de hipocampo y capa 5 neocortical CA1, así como en la región del hipocampo CA1 contralateral, en comparación con los ratones α -syn tg tratados con NIP228 (Figura 17 A, B, C, D).

Se ha demostrado que la inmunización pasiva de ratones de tipo silvestre no tg o ratones α -syn tg que se han inyectado estereotácticamente con un vector lentiviral que impulsa la expresión de alfa-sinucleína de humano en un lado del hipocampo, con un anticuerpo IgG1 de ratón de anti-alfa-sinucleína de alta afinidad el aslo0452-ngl-3 reduce de manera robusta la dispersión transaxonal ipsilateral-contralateral de alfa-sinucleína expresada de forma lentiviral que se observa en este modelo de ratón de dispersión de alfa-sinucleína. La propiedad de este anticuerpo anti-alfa-sinucleína recién revelada de inhibir la dispersión de la alfa-sinucleína in vivo es indicativa de la unión a un epítipo diferente de la alfa-sinucleína de humano en comparación con los anticuerpos que no inhiben la dispersión en el modelo probado, por ejemplo, anticuerpo 9E4.

Además, los datos que muestran que una versión mutante efectora D265A nula de aslo0452-ngl-3 es igual de efectiva que aslo0452-ngl-3 para reducir la dispersión de alfa-sinucleína en el modelo indican que la prevención mediada por anticuerpos de la dispersión de alfa-sinucleína no requiere que el efector asociado con Fc funcione como un mecanismo de acción clave, y en particular indica que no parece haber ningún requisito o función para los receptores Fc (Fc γ RIIB y FCYRII) presentes en la microglía en el bloqueo mediado por anticuerpos de la dispersión de alfa-sinucleína.

En resumen, los anticuerpos de la invención que se dirigen a la alfa-sinucleína, así como su fragmento de unión al antígeno, tienen el potencial de ser modificadores de la enfermedad en EP o DLB o MSA mediante el bloqueo o la desaceleración de la captación patológica de alfa-sinucleína en células receptoras y la prevención de la diseminación y la transmisión de la patología alfa-sinucleína entre las regiones del cerebro conectadas anatómicamente. De esta manera, los anticuerpos dirigidos a la alfa-sinucleína pueden tratar o prevenir la progresión de la enfermedad y ser de beneficio terapéutico para los pacientes con sinucleinopatías como EP, DLB o MSA.

Ejemplo 13: Generación de 0452 anticuerpos biespecíficos ngl-3-BBBt0626ql

Anticuerpos biespecíficos ejemplares de acuerdo con la invención que comprenden el esqueleto IgG1 TM humano asociado con un fragmento de cadena sencilla (scFv) de BBBt0626gl, injertado en el terminal N (formato Bis2) o en el terminal C (formato Bis3) de la cadena pesada de la cadena aslo0452 ngl-3 se generaron como se describe a continuación.

- 5 Se generó un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en formato Bis2, produciendo sintéticamente un fragmento de ADN que codifica Bbbt0626glscFv-(G4S)x2-aslo0452 ngl-3 VH o Bbbt0626w-(G4S)x2-aslo452 ngl-3 VH que contenía BsH y los sitios de restricción de endonucleasas flanqueantes BstEII, anteriores de Bbbt0626glscFv o Bbbt0626wt y posteriores a aslo0452 ngl-3 VH, respectivamente. Los fragmentos de ADN
10 digeridos fueron luego clonados direccionalmente en el esqueleto del vector hlgITM.

- Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en un formato Bis3 se generó mediante amplificación con PGR seguida de clonación direccional utilizando sitios de endonucleasas de restricción (SfiI y XbaI). Se generaron dos fragmentos de PGR: (1)
15 amplificando el dominio hlgITM -CH3 desde el sitio de restricción SfiI hasta el terminal C del dominio CH3 y (2) un fragmento de PGR superpuesto con un oligo PGR directo que incorpora el extremo de terminal C del conector CH3- (G4S)x3 (SEQ ID NO: 57) y el extremo de terminal N del Bbbt0626gl scFv junto con un oligo que amplifica el extremo de terminal C del Bbbt0626gl scFv y la secuencia del vector corriente abajo más allá del sitio de restricción XbaI. Ambos fragmentos de PGR se unieron juntos en una reacción de PGR de extracción directa
20 y posteriormente se clonaron direccionalmente en el pEU1_4 (vector IgGITM humano) a través de los sitios de endonucleasa de restricción SfiI y XbaI.

- Estos anticuerpos biespecíficos se expresaron en un sistema de expresión basado en CHO y los anticuerpos resultantes se purificaron mediante la purificación en columna de proteína A. Todos los anticuerpos biespecíficos derivados de Bbbt0626 se analizaron para determinar la
25 unión in vitro a la estirpe celular endotelial del cerebro de ratón (b.end3) para confirmar la actividad de unión de la fracción de transportador BBB y también se evaluó la competencia de unión de también 0452 ngl-3 en una competición de epítomos basada en HTRF ensayo para confirmar la unión al epítopo aslo0452 ngl-3.

Tabla 1

ID de Clon	Método	Afinidad – K_D	95% CI
asyn0087	Octeto	> 1.0 µM	n/a
aslo0452 ngl-1	Octeto	1.1 nM	0.3-2.3 nM
aslo0452 ngl-3	KinExa	74 pM	15-177 pM
aslo0452ngl-3	Octeto	106 pM	10-292 pM
aslo0543	KinExa	108 pM	34-223 pM
aslo0543	Octeto	113 pM	5-333 pM