

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/036646 A1

(43) Fecha de publicación internacional
19 de marzo de 2015 (19.03.2015) **WIPO | PCT**

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:**
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
- (21) **Número de la solicitud internacional:**
PCT/ES2014/070704
- (22) **Fecha de presentación internacional:**
15 de septiembre de 2014 (15.09.2014)
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:**
P201331334
13 de septiembre de 2013 (13.09.2013) ES
- (71) **Solicitantes:** **FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD** [ES/ES]; Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico, Cartuja 93, E-41092 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias, s/n, E-41013 Sevilla (ES).
- (72) **Inventores:** **ROODVELDT CATELLANI, Cintia**; Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico, Cartuja 93, E-41092 Sevilla (ES). **LABRADOR GARRIDO, Adahir**; Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico, Cartuja 93, E-41092 Sevilla (ES). **POZO PÉREZ, David**; Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico, Cartuja 93, E-41092 Sevilla (ES).
- (74) **Mandatario:** **FÚSTER, Gustavo**; Pº de la Habana 9-11, E-28036 Madrid (ES).
- (81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) **Title:** COMBINATIONS OF AGGREGATING PROTEINS AND MOLECULAR CHAPERONE PROTEINS FOR THE TREATMENT OF PROTEINOPATHIES OR CONFORMATIONAL DISEASES

(54) **Título :** COMBINACIONES DE PROTEÍNAS AGREGANTES Y CHAPERONAS MOLECULARES PARA EL TRATAMIENTO DE PROTEINOPATÍAS O ENFERMEDADES CONFORMACIONALES

(57) **Abstract:** HSPs (chaperones or heat-shock proteins) possess two very valuable characteristics that can be productively exploited in a specific form in order to "intelligently" manipulate the immune response so as to treat "conformational" disorders or "proteinopathies": the classic chaperone functions thereof; and the more recently discovered immunoactive properties thereof. On the basis thereof, the present invention combines a peptide, a protein or a polypeptide associated with a "conformational disease" with a biologically active or functional HSP, resulting in a distinguishing immunoactive complex which is advantageous for treating the "conformational disease" in question associated with the peptide, protein or polypeptide used.

(57) **Resumen:** Las HSPs (chaperonas o proteínas de choque térmico ('heat-shock proteins' o HSPs)) poseen dos características muy valiosas que podrían ser explotadas productivamente y de forma específica para una manipulación 'inteligente' de la respuesta inmunitaria para tratar trastornos 'conformacionales' o 'proteinopatías': sus funciones clásicas de chaperona; y sus propiedades immunoactivas más recientemente descubiertas. En base a esto, los autores de la presente invención han combinado un péptido, proteína o polipéptido asociado a una 'enfermedad conformacional' con una HSP biológicamente activa o funcional dando como resultado un complejo immunoactivo diferencial que resulta beneficioso para tratar la 'enfermedad conformacional' en cuestión asociada al péptido, proteína o polipéptido utilizado



WO 2015/036646 A1

Combinaciones de proteínas agregantes y chaperonas moleculares para el tratamiento de proteinopatías o enfermedades conformacionales.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, la biología molecular y la farmacia, y específicamente se refiere a una vacuna que comprende un péptido o polipéptido agregante, y una chaperona molecular, en la elaboración de un medicamento o vacuna para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad relacionada con la proteína agregante. También se refiere a las secuencias nucleotídicas, vectores de expresión, células hospedadoras, anticuerpos, o composición celular inmunoterapéutica relacionadas con la composición de la invención, así como a un método para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con las proteínas agregantes mediante el empleo de los anticuerpos de la invención.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La enfermedad de Parkinson (EP o PD) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer, con una prevalencia más alta y cada vez mayor en los países industrializados. Este trastorno y otras proteinopatías o enfermedades conformacionales se caracterizan por el mal plegamiento y la agregación de proteínas específicas en las estructuras fibrilares altamente ordenadas que se acumulan y dan lugar a la formación de depósitos de proteínas en ciertas células y áreas del cerebro (Knowles TP et al. 2014. Nat Rev Mol Cell Biol. 15:384-96.). La EP se caracteriza patológicamente por la presencia de depósitos de agregados de α -sinucleína (α Syn) en inclusiones intracelulares conocidas como cuerpos de Lewy (LB) en la sustancia negra del cerebro y por la pérdida de neuronas dopaminérgicas. A pesar de que las causas y el mecanismo patogénico subyacente aún no se han dilucidado totalmente, se ha establecido que α Syn juega un papel fundamental en el inicio y progresión de la enfermedad (Marques & Outeiro, 2012. *Cell Death Dis.* 3: e350). Actualmente no existe un tratamiento eficaz contra esta enfermedad devastadora cuyo proceso normal en última instancia conduce a una gran pérdida de células neuronales y a la demencia.

30

La proteína α Syn, cuyas funciones fisiológicas se desconocen a día de hoy, se expresa fundamentalmente en las neuronas por lo que se encuentra principalmente en el cerebro. A pesar de que α Syn ha sido tradicionalmente considerada como una proteína intracelular exclusivamente, se ha acumulado evidencia que muestra la presencia de α Syn, tanto en su

forma agregada como no agregada, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en la sangre. De hecho, se ha encontrado que los desequilibrios en el contenido del oligómero o de la proteína total α Syn en el LCR están asociados a la EP, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la enfermedad de Alzheimer (AD).

5 Además, existen nuevas evidencias que sugieren que estas especies de proteínas aberrantes pueden ser transferidas de célula a célula y animar a la propagación de la neurodegeneración de una manera similar al prión. Mientras que desde hace tiempo se conoce que la neuroinflamación robusta mediada por la microglia activada acompaña al proceso neurodegenerativo en la EP, estudios recientes indican que la α Syn extracelular,
10 especialmente las formas oligoméricas, tiene un papel principal en la respuesta inflamatoria, así como en otros mecanismos neurotóxicos ligados a la neurodegeneración.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA o ALS) es una enfermedad neurodegenerativa incurable de carácter fatal tras su diagnóstico en un plazo de entre 3 y 5 años. Actualmente, no existen tratamientos efectivos para la misma, siendo una prioridad para los sistemas
15 sanitarios la obtención de datos preclínicos que sustenten estudios clínicos para el establecimiento de terapias modificadoras del progreso de la enfermedad. Actualmente, sólo existe un tratamiento aprobado (Riluzole) para la ELA, que solo consigue efectos parcialmente moderados prolongando la supervivencia de los pacientes entre 2-3 meses. De todos los casos de ELA, el 90% son esporádicas y el 10% del tipo familiar. Aunque la muerte
20 de neuronas motoras es responsable de esta enfermedad, durante los últimos tres años se ha hecho evidente que el ELA no es un fenómeno exclusivamente ligado a las mismas ya que diversos tipos celulares, entre los que destacan la activación de la microglia, infiltración de células T, y una respuesta inmune adquirida deficitaria también influyen en esta enfermedad.

25 Actualmente se sabe que el 20% de los casos de ELA familiar están asociados a mutaciones en el gen que codifica para la enzima Cu, Zn superóxido dismutasa 1 (SOD1), uno de los componentes principales del mecanismo de defensa de las células contra el daño oxidativo. Además, se cree que la agregación y la acumulación intracelular de SOD1 en las neuronas motoras son cruciales para el inicio y la progresión del ELA, aunque los
30 mecanismos patológicos subyacentes no se conocen aún.

En los últimos años, la vacunación o inmunización ha surgido como una estrategia terapéutica potencialmente poderosa para el tratamiento de algunas proteinopatías neurodegenerativas. A pesar de que se han realizado algunos progresos para la
35 enfermedad de Alzheimer (AD), esta vía ha sido poco explorada para otras enfermedades

como la EP y ELA, existiendo en la actualidad sólo una vacuna en estudio de fase I para EP y ninguna para ELA u otras 'enfermedades conformacionales'. En efecto, los anticuerpos producidos por la inmunización con α Syn en un modelo de ratón de la EP y la vacunación pasiva con anticuerpos anti- α Syn en un modelo de ratón de la enfermedad de cuerpos de

5 Lewy o ratones transgénicos α -sinucleína han mostrado resultados alentadores, aunque modestos. Por otro lado, se ha demostrado que la inmunización con especies altamente agregadas de α -Syn en ratones EP exacerba la neuroinflamación y la neurodegeneración a través de una disfunción en las células T reguladoras (Treg), que se sabe que son instrumentales en la modulación de la respuesta inmunitaria. En general, aunque la

10 inmunización con α -sinucleína se sitúa actualmente como una opción de tratamiento muy atractiva para EP y otras sinucleinopatías, los protocolos de inmunoterapia actuales han demostrado hasta el momento resultados mixtos/éxito modesto, y es claro que son necesarios nuevos enfoques para optimizar los esquemas de vacunación.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Las HSPs (chaperonas o proteínas de choque térmico (*'heat-shock proteins'* o HSPs)) poseen dos características muy valiosas que podrían ser explotadas productivamente y de forma específica para una manipulación 'inteligente' de la respuesta inmunitaria para tratar trastornos 'conformacionales' o 'proteínopatías':

20

- sus funciones clásicas de chaperona; y
- sus propiedades inmunoactivas más recientemente descubiertas.

En base a esto, los autores de la presente invención han combinado un péptido, proteína o

25 polipéptido asociado a una 'enfermedad conformacional' con una HSP biológicamente activa o funcional dando como resultado un complejo inmunoactivo diferencial que resulta beneficioso para tratar la 'enfermedad conformacional' en cuestión asociada al péptido, proteína o polipéptido utilizado.

30 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende:

- a) una mezcla de péptidos/polipéptidos/proteínas que comprenda i) al menos un péptido/polipéptido/proteína cuya secuencia aminoacídica se corresponda a un péptido/polipéptido/proteína agregante (de ahora en adelante "secuencia A de la invención"),
- 35 o cualquiera de las variantes y fragmentos biológicamente activos de dicha secuencia, y ii)

un péptido/polipéptido/proteína cuya secuencia aminoacídica se corresponda a una chaperona molecular (de ahora en adelante “secuencia B de la invención”), o a cualquiera de las variantes y fragmentos biológicamente activos de dicha secuencia; y/o

5 b) un péptido/polipéptido/proteína de fusión, de ahora en adelante “secuencia aminoacídica de fusión de la invención”, que comprende las secuencias aminoacídicas de al menos un péptido/polipéptido/proteína agregante (“secuencia A de la invención”), o cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos, y de un péptido/polipéptido/proteína cuya secuencia aminoacídica se corresponda a una chaperona (“secuencia B de la invención”), o a cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos.

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención, al menos una de las secuencias A y/o B son recombinantes. En otra realización preferida, la secuencia A se corresponde con la secuencia aminoacídica de la α -sinucleína, o con cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos. En otra realización preferida, la secuencia B se corresponde con la secuencia aminoacídica de la chaperona Grp94 o con cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos. En otra realización aún más preferida, la secuencia A se corresponde con la secuencia aminoacídica de la α -sinucleína, o con cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos, y la secuencia B se corresponde con la secuencia aminoacídica de la chaperona Grp94 o con cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos.

20 En otra realización preferida, la secuencia A se corresponde con la secuencia aminoacídica de la SOD1, o con cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos. En otra realización preferida, el péptido B se corresponde con la secuencia aminoacídica de la chaperona Hsp70 o con cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos. En otra realización aún más preferida, la secuencia A se corresponde con la secuencia aminoacídica de la SOD1, o con cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos, y el péptido B se corresponde con la secuencia aminoacídica de la chaperona Hsp70 o con cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos

Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos aislada, de ahora en adelante “secuencia de nucleótidos de la invención”, que comprenden una o más secuencias de nucleótidos, que codifican a toda o a una fracción de la proteína de fusión de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un vector de expresión aislado (de ahora en adelante “vector de expresión de la invención”), que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora aislada, (de ahora en adelante “célula hospedadora de la invención”), que comprende un vector de expresión de la invención, o una secuencia de nucleótidos de la invención.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo, de ahora en adelante “anticuerpo de la invención”, o “fragmento de anticuerpo de la invención”, capaz de unirse a uno de las secuencias A o B de la invención, o a la secuencia aminoacídica de fusión de la invención. En una realización preferida de este aspecto, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la invención se obtiene tras la inmunización de un animal (en presencia o ausencia de un adyuvante), o de las células de un animal, con una secuencia A
10 y B de la invención, o con la secuencia aminoacídica de fusión de la invención. En una realización más preferida el mamífero es humano.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición celular inmunoterapéutica que comprende al menos una célula presentadora de antígeno activada aislada (APC), en el que dicha APC se obtiene a partir de un paciente diagnosticado con una enfermedad provocada
15 por una proteína agregante de la invención, y en donde dicha APC es estimulada por la exposición *ex vivo* a una composición que comprende la secuencia A y la secuencia B de la invención, o la secuencia aminoacídica de fusión de la invención, o cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante “composición farmacéutica de la invención”, que comprende la composición de la invención, la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula hospedadora de la invención, el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo de la invención y/o la composición celular inmunoterapéutica de la invención. En una realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica además comprende
25 un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición farmacéutica además comprende un adyuvante.

Otro aspecto de la invención se refiere a una preparación combinada, de ahora en adelante “preparación combinada de la invención”, que comprende la secuencia A de la invención y la secuencia B de la invención.

30 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la secuencia B de la invención, la composición de la invención, la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula hospedadora de la invención, la composición farmacéutica de la invención, la preparación combinada de la invención, o el anticuerpo de la invención, en la elaboración de un medicamento. En una realización preferida, el
35 medicamento es una vacuna.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la secuencia B de la invención, la composición de la invención, la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula hospedadora de la invención, el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo de la invención, la composición celular inmunoterapéutica de la invención, la composición farmacéutica de la invención, o la preparación combinada de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos relacionados con una proteína agregante. En una realización preferida de este aspecto, la enfermedad o trastorno relacionado con la proteína agregante se selecciona de la lista que consiste en: enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia de sistemas múltiples (MSA), enfermedad de Alzheimer, fallo autonómico puro (FAP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia fronto-temporal, enfermedad de Gaucher, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, la enfermedad de priones, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob Jakob y otras encefalopatías espongiiformes transmisibles, esclerosis múltiple, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, el insomnio familiar fatal, diabetes de tipo II, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y/o trastornos similares a la esquizofrenia, y neurodegeneración debida a agregación de proteínas relacionado con la edad. Más preferiblemente es el Parkinson (EP o PD) y la Esclerosis lateral amiotrófica (ELA o ALS).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las secuencias A y B de la invención, la composición de la invención, la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula hospedadora de la invención, la composición farmacéutica de la invención, la preparación combinada de la invención, o el anticuerpo de la invención, en la elaboración de un medicamento. En una realización preferida, el medicamento es una vacuna.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las secuencias A y B de la invención, la composición de la invención, la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula hospedadora de la invención, el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo de la invención, la composición celular inmunoterapéutica de la invención, la composición farmacéutica de la invención, o la preparación combinada de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos relacionados con una proteína agregante. Preferiblemente, la proteína agregante es la α -sinucleína. En una realización preferida de este aspecto, la enfermedad o trastorno relacionado con la α -sinucleína u otra proteína agregante se selecciona de la lista que consiste en: enfermedad de Parkinson (EP), demencia con

cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia de sistemas múltiples (MSA), enfermedad de Alzheimer, fallo autonómico puro (FAP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia fronto-temporal, enfermedad de Gaucher, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, la enfermedad de priones, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob Jakob y otras encefalopatías espongiformes transmisibles, esclerosis múltiple, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, el insomnio familiar fatal, diabetes de tipo II, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y/o trastornos similares a la esquizofrenia, y neurodegeneración debida a agregación de proteínas relacionado con la edad. Más preferiblemente es el Parkinson (EP o PD) y la Esclerosis lateral amiotrófica (ELA o ALS).

En otra realización preferida, la enfermedad o trastorno relacionado con la α -sinucleína se selecciona de la lista que consiste en: Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples (MSA), síndrome de Gaucher, fallo autonómico puro (FAP) y la enfermedad de Alzheimer.

Otra realización aún más preferida, se refiere al uso de una composición de la invención que comprende como secuencia A, la secuencia aminoacídica de la α -sinucleína, y como secuencia B la secuencia aminoacídica de la chaperona Grp94 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno relacionado con la α -sinucleína. En una realización preferida, la enfermedad o trastorno relacionado con la α -sinucleína se selecciona de la lista que consiste en: Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples (MSA), síndrome de Gaucher, fallo autonómico puro (FAP) y la enfermedad de Alzheimer.

Otra realización aún más preferida, se refiere al uso de una composición de la invención que comprende como secuencia A, la secuencia aminoacídica de la α -sinucleína, y como secuencia B la secuencia aminoacídica de la chaperona Grp94

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la preparación combinada de la invención, que comprende la secuencia A y la secuencia B de la invención, en la elaboración de un medicamento para su administración combinada, simultánea o secuencial, para el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos relacionados con una proteína agregante. Más preferiblemente, la proteína agregante es la α -sinucleína o α -*sinucleinopatías*. En una realización preferida de este aspecto, la enfermedad o trastorno relacionado con la α -sinucleína se selecciona de la lista que consiste en: enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia de sistemas múltiples (MSA), enfermedad de Alzheimer,

esclerosis lateral amiotrófica (ELA), síndrome de Down, demencia frontotemporal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Huntington, la enfermedad de priones, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y otras encefalopatías espongiformes transmisibles, esclerosis múltiple, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, el insomnio familiar fatal, diabetes de tipo II, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y/o trastornos similares a la esquizofrenia, y neurodegeneración debida a agregación de proteínas relacionado con la edad. Más preferiblemente es el Parkinson.

Otra realización aún más preferida, se refiere al uso de la preparación combinada de la invención que comprende como secuencia A, la secuencia aminoacídica de la α -sinucleína, y como secuencia B la secuencia aminoacídica de la chaperona Grp94 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno relacionado con la α -sinucleína. En una realización preferida, la enfermedad o trastorno relacionado con la α -sinucleína se selecciona de la lista que consiste en: enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia de sistemas múltiples (MSA), enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia fronto-temporal, enfermedad de Gaucher, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, la enfermedad de priones, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob Jakob y otras encefalopatías espongiformes transmisibles, esclerosis múltiple, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, el insomnio familiar fatal, diabetes de tipo II, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y/o trastornos similares a la esquizofrenia, y neurodegeneración debida a agregación de proteínas relacionado con la edad. Más preferiblemente es el Parkinson (EP o PD) y la Esclerosis lateral amiotrófica (ELA o ALS).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Evaluación del efecto sobre esplenocitos murinos estimulados *in vitro* con una combinación de α Syn y Grp94. A. Análisis del perfil de activación por citometría de flujo de esplenocitos murinos en cultivo provenientes de ratones C57BL/6 sanos, incubados *in vitro* durante 24 hrs con LPS (0.5 μ g/ml), α Syn (14.3 nM o 0.2 μ g/ml), Grp94 (14.3 nM o 1.3 μ g/ml), una combinación de α Syn y Grp94 (0.2 μ g/ml y 1.3 μ g/ml, respectivamente), o con solución tampón como referencia. B-D. Niveles de IFN- γ (B), IL-10 (C) e IL-17 (D) en los sobrenadantes de los cultivos mencionados en (A), medidos por ELISA. Los gráficos son

representativos de dos experimentos independientes, y los valores corresponden al promedio \pm S.D de duplicados.

Figura 2: Respuesta inmune generada en ratones C57BL/6 inmunizados con una combinación de α Syn y Grp94, según el protocolo 1. A. Análisis por citometría de flujo

5 de la población de esplenocitos CD4⁺/CD25^h/Foxp3⁺ (Treg) respecto de los esplenocitos CD4⁺ totales. B y C. Niveles de IFN- γ (B) e IL-10 (C) en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos incubados *in vitro* durante 24 hrs con α Syn(15 μ g/ml) o solución tampón. D. Niveles relativos de anticuerpos IgG anti- α Syn sobre IgG totales en suero, medidos por ELISA. Los valores corresponden al promedio \pm S.D. con muestras provenientes de 5
10 ratones por grupo (N=5).

Figura 3: Respuesta inmune y prueba comportamental en ratones C57BL/6 receptores de esplenocitos (obtenidos luego de la inmunización de los ratones mutantes de acuerdo al protocolo 1) con posterior modelado de Parkinson mediante administración de MPTP. A y B. Análisis por citometría de flujo de la población de

15 esplenocitos CD4⁺/CD25^h (Treg) respecto de los esplenocitos CD4⁺ totales (A), y de la población CD4⁺/CD25⁻ (Teff) respecto de los esplenocitos CD4⁺ totales (B). C y D. Niveles de IFN-g (B) e IL-10 (C) en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos incubados *in vitro* durante 24 hrs con α Syn(15 μ g/ml) o LPS (0.5 μ g /ml). E. Prueba comportamental de *footprinting* (sobre patas delanteras) luego de la transferencia adoptiva y posterior
20 administración de MPTP durante 3 meses, un período de recuperación de 1 mes y administración de anfetaminas (ver Materiales y Métodos). Los grupos 'Salino' y 'MPTP' corresponden a los controles de animales 'sanos' y 'enfermos' que no han adoptado esplenocitos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M. de cada grupo (N=7, con excepción de 'Salino' con N=4, y 'MPTP' con N=5).

Figura 4: Respuesta inmune generada en ratones C57BL/6 inmunizados con una combinación de α Syn y Grp94, según el protocolo 2. A y B. Análisis por citometría de

25 flujo de la población de esplenocitos CD4⁺/CD25^h (Treg) respecto de los esplenocitos CD4⁺ totales (A), y de la población CD4⁺/CD25⁻ (Teff) respecto de los esplenocitos CD4⁺ totales (B). C. Niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos incubados *in vitro*
30 durante 24 hrs con α Syn (15 μ g/ml) o solución tampón. D. Niveles relativos de anticuerpos IgG anti- α Syn sobre IgG totales en suero, medidos por ELISA. E. Niveles de anticuerpos IgM anti- α Syn en suero, medidos por ELISA. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M. con muestras provenientes de 5 ratones por grupo (N=5).

Figura 5: Prueba comportamental en ratones C57BL/6 receptores de esplenocitos (obtenidos luego de la inmunización de los ratones donantes de acuerdo

35

al protocolo 2) con posterior modelado de Parkinson mediante administración de MPTP. Prueba comportamental de *footprinting* (sobre patas traseras) luego de la transferencia adoptiva de esplenocitos, y posterior administración de MPTP durante 3 meses, un período de recuperación de 1 mes y administración de anfetaminas (ver 5 Materiales y Métodos). Los grupos 'Salino' y 'MPTP' corresponden a los controles de animales 'sanos' y 'enfermos' que no han adoptado esplenocitos. Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M. de cada grupo (N=5).

Figura 6: Respuesta inmune generada en ratones de modelo de ALS (Tg SOD1) vacunados con una combinación de SOD1 y Hsp70 de acuerdo al Protocolo 4.

10 Resultados preliminares. Análisis por citometría de flujo de la población de esplenocitos CD4⁺ (A), CD4⁺/CD25^h/Foxp3⁺ (Treg) (B), y CD4⁺CD25⁻ (Teff) (C), respecto de los esplenocitos CD4⁺ totales. D. Niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos incubados *in vitro* durante 24 hrs con SOD1 (20 μ g/ml) o solución tampón. E y F. Relación 15 pareada por ratón de sus niveles de anticuerpos IgG1/IgG2a totales (E) o anti-SOD1 (F) en suero, medidos por ELISA. Non-carrier: animal no transgénico (control sano). Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M. con muestras provenientes de 3 ratones por grupo (N=3).

Figura 7: Evaluación del grado de protección en modelo murino de ALS (Tg SOD1) mediante la medición del peso y supervivencia de los animales vacunados de acuerdo

20 al Protocolo 4. Resultados preliminares. A. Representación de la evolución en el tiempo del peso corporal respecto del máximo peso alcanzado para cada ratón. B. Representación de la supervivencia respecto del tiempo (Gráfico de Kaplan-Meier). Non-carrier: animal no transgénico (control sano). Número de animales por grupo: 3 (N=3).

Figura 8: Caracterización de la respuesta inmunitaria generada por inmunización de

25 ratones C57BL/6 con una combinación/complejo de α Syn y Hsp70 en ausencia de adyuvante. A. Análisis por citometría de flujo de la población de esplenocitos CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ (Treg). B. Niveles de anticuerpos IgG anti- α Syn medidos en suero por ELISA. C. Representación de la relación pareada por ratón de los niveles de IL-10/IFN- γ medidos en suero, por ELISA. α S: α -synuclein (aSyn); '70': Hsp70; 'low': baja dosis; 'high': 30 alta dosis (ver Materiales y Métodos). Los valores corresponden al promedio \pm S.E.M. con muestras provenientes de 6-7 ratones por grupo (N=6-7).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han visto que la inmunización con mezclas de α -sinucleína (α Syn) y chaperona molecular son capaces de impulsar, modular y redirigir la respuesta inmune, pudiendo ser de gran beneficio para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y profilácticas contra las sinucleinopatías. Adicionalmente, los autores de la presente invención también han comprobado como el uso de otras proteínas agregantes en combinación con chaperonas moleculares se muestran como excelentes herramientas terapéuticas para la inmunización frente a diversas "proteínopatías", tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Huntington, las enfermedades por priones, y la diabetes tipo II.

Se proporciona, por tanto, anticuerpos y células (inmunización pasiva) y vacunas (inmunización activa) para su uso en varios métodos para el diagnóstico y la lucha contra (incluyendo retrasar la aparición de, el tratamiento de y o la prevención de) trastornos relacionados con proteínas agregantes, y más preferiblemente con la α -sinucleína o α -sinucleinopatías, tales como la enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia de sistemas múltiples (MSA) y otros trastornos neurodegenerativos relacionados con la α -sinucleína. Además, los anticuerpos, las células y las vacunas se pueden utilizar para retrasar la aparición de, el tratamiento y / o prevención de otros trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica (ALS o ELA), demencia frontotemporal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Huntington, la enfermedad de priones, la enfermedad de Creutzfeldt Jakob, esclerosis múltiple, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, el insomnio familiar fatal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con el envejecimiento, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y/o trastornos similares a la esquizofrenia, neurodegeneración debida a agregación de proteínas relacionado con la edad. Los anticuerpos, las células y vacunas también se pueden usar en métodos de detección para, entre otras cosas, con fines de terapia de diagnóstico o de seguimiento de dichas enfermedades.

COMPOSICIONES DE LA INVENCION

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende:

- a) una mezcla de péptidos/polipéptidos/proteínas que comprenda i) al menos un péptido/polipéptido/proteína cuya secuencia aminoacídica se corresponda a un péptido/polipéptido/proteína agregante (de ahora en adelante "secuencia A de la invención"), o cualquiera de las variantes y fragmentos biológicamente activos de dicha secuencia, y ii)

un péptido/polipéptido/proteína cuya secuencia aminoacídica se corresponda a una chaperona molecular (de ahora en adelante “secuencia B de la invención”), o a cualquiera de las variantes y fragmentos biológicamente activos de dicha secuencia; y/o

5 b) un péptido/polipéptido/proteína de fusión, de ahora en adelante “secuencia aminoacídica de fusión de la invención”, que comprende las secuencias aminoacídicas de al menos un péptido/polipéptido/proteína agregante (“secuencia A de la invención), o cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos, y de un péptido/polipéptido/proteína cuya secuencia aminoacídica se corresponda a una chaperona (“secuencia B de la invención”), o a cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos.

10 En esta memoria se entiende por “secuencia A” o “péptido agregante” y/o “proteína agregante” los péptidos, polipéptidos o proteínas que se encuentran comúnmente formando agregados en las enfermedades ‘conformacionales’, especialmente en las neurodegenerativas (Knowles TP et al. 2014. Nat Rev Mol Cell Biol. 15:384-96.). Entre estas proteínas se encuentran, pero sin limitarnos, la α -sinucleína (SEQ ID NO: 1), huntingtina
15 (SEQ ID NO: 2), péptido beta-amiloide (SEQ ID NO: 3), TDP-43 (SEQ ID NO: 4), FUS (SEQ ID NO: 5), tau (SEQ ID NO: 6), Prion Protein (SEQ ID NO: 7), Fibronectin (SEQ ID NO: 8), y superóxido dismutasa o SOD1, (SEQ ID NO: 9).

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la proteína agregante o secuencia A de la composición de la invención se selecciona de la lista que
20 consiste en α -sinucleína, huntingtina, péptido beta-amiloide, TDP-43, FUS, tau, Prion Protein, Fibronectin, SOD1, o cualquiera de sus combinaciones.

Más preferiblemente, la proteína agregante es la α -sinucleína, o cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos.

En otra realización preferida, la proteína agregante es SOD1, o cualquiera de sus variantes
25 y fragmentos biológicamente activos.

En esta memoria se entiende por α -sinucleína (SNCA, NACP, PARK1, PARK4, PD1, alpha-synuclein; non A-beta component of AD amyloid; synuclein alpha-140) a un miembro de la familia de las sinucleínas, que también incluye la beta- y la gamma-sinucleína. Las sinucleínas se expresan abundantemente en el cerebro y la alfa- y la beta-sinucleína D2
30 inhiben la fosfolipasa selectivamente. La α -sinucleína puede servir para integrar la señalización y el tráfico de membrana presináptica. Los defectos en α -sinucleína han sido implicados en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. La α -sinucleína es un componente principal de las placas amiloides en el cerebro de pacientes con enfermedad de

Alzheimer. Se han identificado dos isoformas diferentes para este gen. Su secuencia aminoacídica (la de la α -sinucleína) se corresponde con la SEQ ID NO: 1.

En el contexto de la presente invención, el gen α -sinucleína se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1 ,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína α -sinucleína. Dentro de esta actividad también se encuentra la actividad inmunogénica.

Además de utilizar la proteína recombinante o péptidos sintéticos, α -sinucleína se puede derivar directamente de los cuerpos de Lewy presentes en la autopsia post mortem del tejido cerebral humano de los casos con α -sinucleinopatías. Tanto soluble (es decir, preparaciones solubles en solución salina tamponada con Tris) e insoluble (es decir, preparaciones insolubles en solución salina tamponada con Tris) las fracciones de α -sinucleína se purifican. Estas preparaciones de muestras se pueden inyectar en animales como tal, o fraccionado por métodos cromatográficos antes de la inyección. Los anticuerpos generados se pueden utilizar para el tratamiento de los pacientes en un esquema de vacunación pasiva o en inmunoensayos de diagnóstico.

En la presente invención α -sinucleína se refiere tanto a la forma nativa no plegada y soluble como a aquella con modificaciones conformacionales y postraslacionales. Además, la α -sinucleína nativa puede ser modificada mediante, por ejemplo pero sin limitarnos, a la sustitución de Ser/Ala por Cys, por ejemplo, a través de mutagénesis dirigida al sitio. Un ejemplo de este tipo se expone en la siguiente solicitud de patente Chang, EE.UU. 2006/0018918 A1.

En esta memoria se entiende por SOD1 (también denominada ALS; SOD; ALS1; IPOA; hSod1; HEL-S-44; homodimer) una proteína que se une a iones de cobre y zinc y es uno de los isoenzimas responsables de la destrucción de los radicales superóxido libres en el cuerpo. La isoenzima codificada es una proteína citoplasmática soluble, que actúa como un homodímero para convertir de origen natural, pero dañinos radicales superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. La otra isoenzima es una proteína mitocondrial. Las mutaciones en este gen han sido implicadas como causas de la esclerosis lateral amiotrófica familiar. Su secuencia aminoacídica (la de la SOD1) se recoge en la secuencia del GenBank NP_000445.1, NM_000454.4

10 En el contexto de la presente invención, el gen *SOD1* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la secuencia NP_000445.1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

15 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la NP_000445.1,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

20 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la NP_000445.1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína SOD1. Dentro de esta actividad también se encuentra la actividad inmunogénica.

25 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la chaperona o secuencia B de la invención pertenece a la familia de las de las Hsp70, Hsp90, de las inmunofilinas, de la peptidasa C56, de la PPIasa, de la familia 14-3-3, del grupo de las *small heat-shock proteins*, de la familia de las *small GTPase*, de la Hsp40(DnaJ), o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, las chaperonas de la familia de las Hsp90 se
30 seleccionan de entre la Grp94 (SEQ ID NO: 10), y la Hsp90 (SEQ ID NO: 11), o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización preferida las chaperonas de la familia de las Hsp70 se seleccionan de entre la Hsp70 (SEQ ID NO: 12), Hsc70 (SEQ ID NO: 13) y la Grp75 (SEQ ID NO: 14), o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización preferida las chaperonas de la familia de las Inmunofilinas se seleccionan de entre la FKBP12 (SEQ

ID NO: 15) y la FKBP4/FKBP52 (SEQ ID NO: 16), o su combinación. En otra realización preferida la chaperona de la familia de las Peptidasas C56 es la DJ1/PARK7 (SEQ ID NO: 17). En otra realización preferida las chaperonas de la familia de la PPIasa se seleccionan de entre la Pin1 (SEQ ID NO: 18), CypA (SEQ ID NO: 19), Cyp40 (SEQ ID NO: 20) o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización preferida, las chaperonas de la familia de la 14-3-3 se seleccionan de entre la 14-3-3 gamma (SEQ ID NO: 21), 14-3-3 epsilon (SEQ ID NO: 22), 14-3-3 tau (SEQ ID NO: 23) o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización preferida, la chaperona del grupo de las *small heat-shock* es la Hsp27 (SEQ ID NO: 24). En otra realización preferida, la chaperona de la familia de las *small GTPase* es la Rab11A (SEQ ID NO: 25). En otra realización preferida las chaperonas de la familia de las Hsp40 (DnaJ) se seleccionan de entre la Hsp40 (SEQ ID NO: 26) y la CSP (SEQ ID NO: 27), o su combinación. En otra realización preferida la chaperona es Clusterin (SEQ ID NO: 28), Grp170 (SEQ ID NO: 29), Calreticulin (SEQ ID NO: 30), Hsp105 (SEQ ID NO: 31), CHIP (SEQ ID NO: 32), alpha-crystallin (SEQ ID NO: 33), o cualquiera de sus combinaciones. En la composición de la invención también puede ser posible la combinación de distintas chaperonas, incluso de distinto grupo o familia.

En una realización más preferida, la chaperona es la Grp94, o cualquiera de sus variantes biológicamente activas, y combinaciones de las mismas. Aún más preferiblemente, la chaperona es la Grp94.

Grp94 (*Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1*, ECGP; GP96; TRA1; GRP94) es un gen que codifica un miembro de una familia de trifosfato de adenosina (ATP)-metabolización de chaperones moleculares con papeles en la estabilización y plegado de otras proteínas. La proteína codificada se localiza en melanosomas y en el retículo endoplásmico. La expresión de esta proteína se asocia con una variedad de estados patogénicos, incluyendo la formación de tumores. Hay un gen microARN situado dentro de la 5' del exón de este gen. Hay pseudogenes para este gen en los cromosomas 1 y 15.

En el contexto de la presente invención, el gen Grp94 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 10, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 10,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 10, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína Grp94.

Se encuentran disponibles varias secuencias de aminoácidos en las bases de datos para los péptidos y las proteínas de la invención, que difieren en uno o más aminoácidos de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33. Estas variantes de péptidos y proteínas están compuestas por la presente invención, siempre que tengan una actividad y un comportamiento estructural similar a la secuencia aminoacídica de la que deriva. Como se usa en este documento, las variantes de la proteína de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33 son proteínas con una secuencia de aminoácidos que difiere de dichas secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos. En general, cualquier residuo de aminoácido de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33 puede ser sustituido por otro aminoácido, siempre que la variante de la proteína resultante exhiba una actividad y un comportamiento estructural similar a la secuencia aminoacídica de la que deriva. La determinación de la actividad y el comportamiento estructural de dichas proteínas se puede realizar, por métodos conocidos en el estado de la

técnica. En particular, se incluyen variantes de la proteína que difieren de las secuencias de aminoácidos mostradas en hasta 5, 10, 15, 20 o incluso 25 posiciones de aminoácidos.

Se prefiere que las sustituciones sean sustituciones conservadoras, es decir, sustituciones de un residuo de aminoácido por otro aminoácido de una polaridad similar, que actúe como un equivalente funcional. Preferiblemente, el residuo de aminoácido usado como un sustituto se selecciona entre el mismo grupo de aminoácidos que el residuo de aminoácido que va a ser sustituido. Por ejemplo, un residuo hidrófobo puede ser sustituido con otro residuo hidrófobo, o un residuo polar puede ser sustituido con otro residuo polar que tenga la misma carga. Los aminoácidos funcionalmente homólogos que pueden ser utilizados para una sustitución conservadora comprenden, por ejemplo, aminoácidos no polares tales como glicina, valina, alanina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, fenilalanina y triptófano. Los ejemplos de aminoácidos polares no cargados incluyen serina, treonina, glutamina, asparagina, tirosina y cisteína. Los ejemplos de aminoácidos polares cargados (básicos) incluyen histidina, arginina y lisina. Los ejemplos de aminoácidos polares cargados (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

También están comprendidas por el término "variante", secuencias aminoacídicas que incluyen más aminoácidos que la secuencia de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33, es decir, secuencias aminoacídicas en las que se han insertado uno o más aminoácidos. Tales inserciones pueden, en principio, tener lugar en cualquier posición de las secuencias aminoacídicas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33. Las inserciones pueden ser tramos de aminoácidos contiguos que comprenden, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o diez aminoácidos. Del mismo modo, el término "variante" también incluye secuencias de aminoácidos en las que se suprimen uno o más aminoácidos en comparación con las secuencias aminoacídicas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:

10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33. La supresión puede implicar varios residuos de aminoácidos contiguos de la las citadas secuencias por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o diez aminoácidos. Esta supresión no afecta la actividad y el comportamiento estructural de dichas variantes. Las variantes de las proteínas también pueden incluir modificaciones estructurales, por ejemplo, aminoácidos modificados, tales como los aminoácidos que han sido alterados por fosforilación, nitración, glicosilación, acetilación, tiolación, ramificación y/o ciclización.

Las variantes de las proteínas de secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33, que han sido modificadas por sustitución, adición o supresión de aminoácidos, normalmente muestran un grado considerable de identidad de secuencia de aminoácidos o de identidad con la proteína de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33. Preferiblemente, la homología o la identidad a nivel de aminoácidos es al menos del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% si la secuencia de la variante se alinea óptimamente con aquella de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33 respectivamente. Los métodos y programas de ordenador para determinar la homología de aminoácidos son bien conocidos en la técnica.

En el contexto de la invención, también se contempla el uso de fragmentos inmunológicamente activos, que o bien se derivan de la proteína de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33, o de sus variantes. Fragmentos inmunológicamente activos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33 o sus variantes incluyen péptidos o polipéptidos que difieren de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33, o de sus variantes por la ausencia de uno o más aminoácidos en el extremo terminal N y/o el extremo terminal C de la proteína. La persona normalmente capacitada será capaz de determinar otros fragmentos activos de la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o SEQ ID NO: 33 o sus variantes mediante la realización de los métodos de rutina descritos en gran detalle en el estado del arte.

Dentro de las variantes biológicamente activas se entiende, sin embargo, que una pérdida de actividad de la proteína del 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, o incluso hasta 80% puede ser tolerada en los casos en que una secuencia(A y/o B) o una secuencia aminoacídica de fusión particular exhiba otras características favorables, tales como una mayor estabilidad o vida útil o propiedades farmacológicas mejoradas. Una persona experta en la materia será

fácilmente capaz de determinar si una secuencia aminoacídica de fusión de la invención dada es adecuada para ser utilizada en un contexto terapéutico deseado.

En una realización más preferida de la invención, la proteína agregante y/o la chaperona se han obtenido de manera recombinante. Alternativamente, tanto la proteína agregante como la chaperona pueden obtenerse a partir de células o tejidos. A su vez, tanto la proteína o proteínas agregante/s como la o las chaperona/s que forman parte de la composición de la invención pueden ser de origen humano o animal, pudiendo ser cualquier orthólogo conocido de dicha o dichas proteína/s. Preferiblemente es de origen humano (o en el caso de haberse obtenido de manera recombinante, la secuencia aminoacídica presenta un alto porcentaje de identidad con la secuencia aminoacídica conocida de la proteína humana, preferiblemente de al menos un 70%, más preferiblemente de un 80%, 90%, 95%, 98%, o mucho más preferiblemente de un 90% con la secuencia aminoacídica humana conocida de dicha proteína.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos (o nucleótidos) idénticos entre dos secuencias aminoácídicas (o nucleotídicas) que se comparan.

Cuando comparamos la secuencia de una proteína agregante o de una chaperona humana con la secuencia de la misma proteína en otras especies, es evidente que existen ciertas regiones en que están más conservadas que otras. Esta información puede ser indicativa de que esas zonas son cruciales para mantener la estructura o función de la proteína. Tanto las regiones activas que determinan la actividad de dichas proteínas como las cisteínas conservadas entre las que se establecen puentes disulfuro, importantes para la conformación de la proteína, estarán con alta probabilidad conservadas entre ambas proteínas, mientras que en otras regiones la divergencia es más aparente.

El término "homología", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre los aminoácidos (o nucleótidos) de dos o más proteínas (polinucleótidos) o secuencias aminoácídicas (o nucleotídicas).

Puesto que dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo o si tienen función y estructura similares, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 30% indican estructuras homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80%, incluirán las regiones activas conservadas entre las distintas especies, y capaces de generar inmunogenicidad o poseer actividad de chaperona y en su caso, también actividad inmunológica.

La secuencia A y la secuencia B de la invención pueden encontrarse unidos en una proteína de fusión, o alternativamente pueden encontrarse unidos químicamente, por ejemplo, pero sin limitarnos a, mediante *crosslinking*.

En esta memoria se entiende por “*crosslinking*” una técnica química que une dos o más moléculas mediante un enlace covalente, contienen sustancias que poseen extremos reactivos a determinados grupos funcionales de las proteínas u otras moléculas. Estos pueden dividirse en homobifuncionales (iguales grupos reactivos) y heterobifuncional (diferentes grupos reactivos), que tienen enlaces químicos cruzados que pueden o no pueden ser invertidos. Los enlaces cruzados homobifuncionales tienen una desventaja potencial conectando dos grupos vecinos, ya sea en la superficie de las nanopartículas o en la inducción de las proteínas no deseadas del cross-linking. Los enlaces entrecruzados heterobifuncionales permiten conjugaciones secuenciales, minimizando la polimerización. Por ejemplo, sulfosuccinimidyl-4 (N-maleimidomethyl)-ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) se puede utilizar para acoplar el contenido de biomoléculas tiol con nanopartículas recubiertas con aminas, o viceversa; considerando que el enlace entrecruzado heterobifuncional 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) es comúnmente utilizado para conectar grupos NH₂ y-COOH (Jameson y Wong, 2009; Hurt et al., 2010 Chem Biol. April 24; 16(4): 372–381).

Adicionalmente, las secuencias A y B de la invención pueden obtenerse de manera sintética. El diseño de secuencias aminoacídicas sintéticas es conocido en el estado de la técnica. Así, el análisis de los datos de los sitios antigénicos determinados experimentalmente ha revelado que los residuos hidrofóbicos Leu y Val, si ocurren en la superficie de la proteína, tienen una gran tendencia a formar parte de los determinantes antigénicos. De esta manera se han desarrollado métodos semi-empíricos que hacen uso de las propiedades físico-químicas de los residuos aminoácidos y sus frecuencias y ocurrencia en segmentos de epítomos conocidos experimentalmente para determinar los determinantes antigénicos de una proteína.

Las secuencias aminoacídicas sintéticas tienen varias ventajas con respecto a la producción de anticuerpos específicos y reactividad. La secuencia exacta del péptido sintetizado puede ser seleccionada a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína como se determina por la secuencia de aminoácidos de la proteína, o por la secuencia de aminoácidos predicha determinada a partir de la secuencia de DNA codificada por la proteína.

El uso de péptidos sintéticos específicos elimina la necesidad de la proteína de longitud completa en vacunación y producción de un ensayo para anticuerpos. Además, las técnicas sintéticas de péptidos en fase sólida de Marrield permiten producir químicamente los

mismos, para cantidades no limitadas, esencialmente del péptido sintético de interés. Se ha producido un avance en dichas técnicas debido a la capacidad de los sintetizadores de péptidos automatizados.

5 *NUCLEÓTIDOS, CONSTRUCCIONES GENÉTICAS; VECTORES DE EXPRESIÓN Y CÉLULAS HOSPEDADORAS DE LA INVENCIÓN*

Las secuencias aminoacídicas sintéticas también pueden prepararse por expresión en una célula hospedadora que contiene una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que se transcribe a los péptidos o proteínas de la invención, unida
10 operativamente a una secuencia de control de la expresión, o un vehículo o vector de clonación de ADN recombinante que contiene tal molécula de ADN recombinante. Alternativamente, los péptidos pueden expresarse por inyección directa de una simple molécula de ADN en una célula hospedadora. Generalmente, los péptidos sintéticos producidos conforme a la invención representan secuencias antigénicas protectoras. La
15 expresión "antígeno protector", tal como se usa en la presente invención, define aquellos antígenos capaces de generar una respuesta inmunitaria (inmunogénica) protectora del hospedador, es decir, una respuesta del hospedador, que conduce a la generación de moléculas efectoras inmunes, anticuerpos o células que esterilizan suprimen o reducen la actividad de las proteínas agregantes que están provocando una enfermedad, "protegiendo"
20 así al hospedador de una enfermedad clínica o sub-clínica y/o de una pérdida de productividad. Tal respuesta inmune protectora puede manifestarse comúnmente por la generación de una respuesta protectora mediada por células inmunocompetentes, y de anticuerpos,, que son capaces de inhibir la función, el mecanismo de citotoxicidad, o la propagación de célula a célula, de las proteínas agregantes, conduciendo a su eliminación o
25 a una pérdida de su efecto negativo sobre el hospedador. Dicho hospedador es preferiblemente un mamífero, y aún mucho más preferiblemente, un humano.

Por tanto otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos , de ahora en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, que comprenden una o más secuencias de nucleótidos, que codifican a toda o a una fracción de la secuencia A, de la
30 secuencia B, o de la secuencia aminoacídica de fusión de la invención.

La provisión de una molécula de ácido nucleico o secuencia de nucleótido conforme a la invención hace así posible obtener las secuencias A y B, y/o la/s secuencias aminoacídicas de fusión de la invención, así como sus variantes biológicamente activas o sus fragmentos inmunogénicos, en cantidades hasta ahora no disponibles, permitiendo de este modo el
35 desarrollo de composiciones, preferiblemente de composiciones farmacéuticas.

En este aspecto de la invención se proporciona un método para preparar una proteína o péptido recombinante codificado por una molécula de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos de la invención, que comprende el cultivo de una célula eucariótica o procariótica que contiene una molécula de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos de la invención, en condiciones en que se expresa dicha proteína o péptido, y la recuperación de dicho péptido así producido.

Este método incluye los vectores de clonación y expresión que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos de la invención. Tales vectores de expresión incluyen secuencias de control adecuadas, tales como, por ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión, etc.). Los vectores conforme a la invención pueden incluir plásmidos y virus (comprendiendo bacteriófagos y virus eucarióticos), de acuerdo con procedimientos bien conocidos y documentados en la técnica, y pueden expresarse en una variedad de sistemas de expresión diferentes, asimismo bien conocidos y documentados en la técnica. Los vectores virales adecuados incluyen, baculovirus y también adenovirus y virus vacunales. Muchos otros vectores virales y no virales están descritos y son conocidos en la técnica.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un vector de expresión aislado (de ahora en adelante vector de expresión de la invención), que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención.

Se conoce, así mismo, una variedad de técnicas que pueden utilizarse para introducir tales vectores en células procarióticas o eucarióticas para la expresión, o en una línea germinal o en células somáticas, para formar animales transgénicos. Técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en la bibliografía.

Las células hospedadoras eucarióticas o procarióticas transformadas o transfectadas, que contienen una molécula de ácido nucleico o la secuencia de nucleótidos conforme a la invención, como se definió anteriormente, también forman parte de este aspecto de la invención.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora aislada, (de ahora en adelante célula hospedadora de la invención), que comprende un vector de expresión de la invención, o una secuencia de nucleótidos de la invención.

ANTICUERPOS DE LA INVENCION

Las composiciones de la invención se formulan para usar como inmunógenos. Estos inmunógenos pueden también ser usados como vacunas en animales, y más particularmente en mamíferos, incluyendo humanos, o para producir una respuesta en la producción de anticuerpos en animales. Para la formulación de tales composiciones, una
5 cantidad efectiva inmunológicamente de cada una de las secuencias A y B de la composición de la invención junto con la utilización de un transportador adecuado aceptable fisiológicamente para la administración a mamíferos incluyendo humanos, son necesarios. Las secuencias A y B pueden estar covalentemente ligadas entre ellas, a otros péptidos, a una proteína transportadora o con otros transportadores, incorporados en nanopartículas,
10 liposomas u otras vesículas similares, y/o mezclados con un adyuvante o absorbente como es bien conocido en el campo de las vacunas. Por ejemplo, las secuencias A y B pueden ser mezcladas con complejos inmunoestimuladores. Alternativamente, las secuencias A y B no están acoplados y están meramente mezcladas con un transportador aceptable fisiológicamente tal como un compuesto tampón o salino normal adecuado para la
15 administración a mamíferos incluyendo humanos.

Por tanto, y como se ha descrito anteriormente, las secuencias A y B sintéticas producidas conforme a la invención presentan secuencias antigénicas protectoras. Estos antígenos protectores son capaces de generar una respuesta inmune (inmunogénica) protectora del hospedador, es decir, una respuesta del hospedador que conduce a la generación de
20 moléculas efectoras inmunes, anticuerpos o células que inactivan o reducen la actividad o efectividad de las proteínas agregantes causantes de una enfermedad, "protegiendo" así al hospedador de una enfermedad clínica o sub-clínica y de una pérdida de productividad. Tal respuesta inmune protectora puede manifestarse comúnmente por la generación de poblaciones celulares inmunocompetentes y/o de anticuerpos que son capaces de inhibir la
25 función de la proteína agregante causante de la enfermedad.

Como con todas las composiciones inmunogénicas para producir una respuesta en anticuerpos, las cantidades efectivas inmunogénicamente de las secuencias A y B de la invención deben ser determinados empíricamente. Los factores que se consideran incluyen la inmunogenicidad del péptido natural, esté o no el péptido complejoado con un enlace
30 covalente a un adyuvante o una proteína transportadora o otro transportador y vía de administración para la composición, por ejemplo, y sin limitarse a estas, intravenosa, intramuscular, subcutánea, y como en una realización particular de la invención, intranasal, u oral, así como el número de la dosis de inmunización que se administraría. Tales factores son conocidos en el campo de las vacunas y está en conformidad con la habilidad del
35 inmunólogo que ha realizado tales determinaciones sin una experimentación indebida. Los

anticuerpos serán capaces de unirse a las secuencias A o B de la invención, o a la secuencia aminoacídica de fusión de la invención.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo, de ahora en adelante anticuerpo de la invención, o fragmento de anticuerpo de la invención, capaz de unirse a una de las secuencias A o B de la invención, o a la secuencia aminoacídica de fusión de la invención. En una realización preferida de este aspecto, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la invención se obtiene tras la inmunización de un animal, o de las células de un animal, con las secuencia aminoacídicas A y B de la invención, o con la secuencia aminoacídica de fusión de la invención. En una realización particular de este aspecto de la invención, el animal que se emplea para la inmunización es un mamífero, incluyendo al hombre.

En una realización preferida, el animal que se emplea para la inmunización es un mamífero, sin incluir al hombre.

Estos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. El anticuerpo de la invención puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores.

En otra realización particular de este aspecto de la invención, los anticuerpos son usados como medicamento.

Los anticuerpos de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas. Así, los anticuerpos pueden estar en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, nucleótidos, vitaminas y minerales. Alternativamente, los anticuerpos pueden prepararse para su administración en forma sólida. Los anticuerpos pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Los anticuerpos o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas. Tales medios incluyen, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

- 5 La dosificación de anticuerpos para obtener una cantidad farmacéuticamente eficaz depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, etc... del animal.

El término "antígeno" en esta memoria se refiere a una molécula (generalmente una proteína o un polisacárido) de superficie celular, que puede inducir la formación de anticuerpos. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar de antígenos,
10 como las proteínas o péptidos, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los ácidos nucleicos. En concreto, en esta memoria, el término antígeno haría referencia a las secuencias aminoacídicas A y B de la invención, así como a la secuencia aminoacídica de fusión de la invención, es decir, tanto a las proteínas agregantes, como a las chaperonas.

- 15 Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a fragmentos de los anticuerpos de la invención para utilizarse de la misma forma y manera que lo descrito para los anticuerpos de la presente invención. A continuación se muestran algunos ejemplos de fragmentos de los anticuerpos de la invención:

-fragmentos "Fab" que resultan de la digestión con papaína de un anticuerpo intacto y que
20 comprenden un único sitio de unión al antígeno y una región CL y una CH1,

-fragmentos "F(ab')₂" que resultan de la digestión con pepsina de un anticuerpo intacto y que contienen dos sitios de unión al antígeno,

-fragmentos "Fab'" que contienen el dominio constante de cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de cadena pesada y únicamente tiene un sitio de unión al antígeno. Los
25 fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo,

-"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un
30 domino variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación estrecha, no covalente. En esta configuración, las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad en la unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la

mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.

5 -FV de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpo "scFv" comprenden los dominios de anticuerpo VL y VH, estando presentes estos dominios en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, las regiones VL y VH están conectadas por un ligador polipeptídico que permite a scFv formar estructuras deseadas para la unión al antígeno.

10 -Los "diacuerpos" comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL) conectados mediante un ligador peptídico que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto fuerza el emparejamiento con los dominios complementarios de otra cadena y potencia el ensamblaje de una molécula dimérica con dos sitios de unión al antígeno funcionales.

15 -Los "anticuerpos biespecíficos" (BAb) son anticuerpos individuales, divalentes (o fragmentos eficaces en inmunoterapia de los mismos) que tienen dos sitios de unión al antígeno específicos de manera diferente. Los dos sitios de antígeno pueden estar acoplados entre sí químicamente o mediante métodos de ingeniería genética conocidos en la técnica.

20 Todos estos fragmentos de anticuerpos se pueden modificar adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando delección(es), inserción(es), sustitución(es), adición(es) de aminoácidos y/o recombinación(es) y/o cualquier otra modificación(es) (por ejemplo, modificaciones postraduccionales o químicas, tales como glicosidación y fosforilación) conocidas en la técnica, solas o en combinación.

25 *COMPOSICIÓN CELULAR INMUNOTERAPÉUTICA DE LA INVENCION*

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición celular inmunoterapéutica, de ahora en adelante composición celular inmunoterapéutica de la invención, que comprende al menos una célula presentadora de antígeno activada (APC o *antigen presenting cells*), de ahora en adelante célula presentadora de antígeno activada de la invención, en el que dicha APC se obtienen a partir de un paciente diagnosticado con una enfermedad provocada por una proteína agregante de la invención y en donde dicha APC es estimulada por la exposición *ex vivo* a la composición de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención la célula presentadora de antígeno activada aislada o APC es una célula dendrítica (DC ó *dendritic cell*).

Como se usa en este documento, el término "células presentadoras de antígeno" o "APCs" se refiere a células que son capaces de activar células T, e incluyen, pero no se limitan a, ciertos macrófagos, células B, y, lo más preferiblemente, células dendríticas (DC). "Células presentadoras de antígenos potentes" son células que, después de ponerse en contacto con un antígeno, pueden activar linfocitos T CD8 + citotóxicos (CTL naive) en una respuesta inmune primaria.

"Células dendríticas" o "DCS" son miembros de una población diversa de tipos de células morfológicamente similares encontradas en tejidos linfoides o no linfoides.

Estas células se caracterizan por su morfología distintiva y altos niveles de la superficie de la expresión de MHC-clase II. Steinman *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 9: 271 (1991). APC y DC se pueden aislar de una serie de fuentes de tejidos, y convenientemente, a partir de sangre periférica, como se describe, por ejemplo, en WO2004026238. Composiciones inmunoterapéuticas preferidas de la presente invención emplean las APC o DCS que están aislados de un paciente diagnosticado con una enfermedad provocada por una proteína agregante, o preferiblemente, de α -sinucleopatía.

Las APCs y DCs se pueden aislar mediante metodologías de rutina que se encuentran disponibles en la técnica. Una metodología adecuada ejemplar para el aislamiento de las CD se da a conocer en la patente de EE.UU. N ° 5976, 546, la N° 6, 080 409, y la N° 6,210, 662.

20 COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE LA INVENCION

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende la composición de la invención, la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula hospedadora de la invención, el anticuerpo de la invención, o la composición celular inmunoterapéutica de la invención. En una realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición farmacéutica además comprende un adyuvante. En otra realización preferida, la composición de la invención no comprende adyuvante.

30 En esta memoria, el término "adyuvante" se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por si mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Aunque sin limitarse a ellas, las sales de aluminio "fosfato de aluminio" e "hidróxido de aluminio" son los dos adyuvantes más comúnmente empleados en

las vacunas. Otras sustancias, como por ejemplo el escualeno, también se pueden emplear como adyuvantes.

Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende la composición de la invención.

- 5 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria contienen cantidades terapéuticamente eficaces de cada una de las secuencias A y B proporcionadas en la presente memoria que son útiles en el tratamiento o mejora de uno o más de los síntomas de enfermedades o trastornos asociados con la toxicidad de las proteínas agregantes.
- 10 Los vehículos farmacéuticos adecuadas para la administración de las composiciones proporcionadas en la presente memoria incluyen cualquiera de los vehículos conocidos por los expertos en la materia que se consideran adecuados para el modo de administración particular.

Además, las composiciones de la invención pueden combinarse con otros ingredientes
15 activos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular en preparaciones farmacéuticas adecuadas tales como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos o formulaciones de liberación sostenida o elixires, para administración oral, o en soluciones o suspensiones estériles para administración
20 parenteral, así como en preparaciones de parches transdérmicos e inhaladores de polvo seco. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan usando técnicas y procedimientos bien conocidos en este campo (véase, por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Cuarta Edición 1985, 126) .

Los ingredientes activos puede administrarse de una vez, o puede dividirse en varias dosis
25 más pequeñas para administrarse a intervalos de tiempo. Se entiende que la dosificación y la duración precisa del tratamiento son función de la enfermedad que se trata y pueden determinarse empíricamente usando protocolos de ensayos conocidos o por extrapolación a partir de datos de ensayo *in vivo* o *in vitro*. Debe indicarse que las concentraciones y valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Además,
30 debe entenderse que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en la presente memoria son

sólo ilustrativos y no pretenden limitar el alcance o práctica de las composiciones reivindicadas.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto. En la presente invención se refiere, principalmente pero sin limitarse a, la combinación de las secuencias A y B de la invención, así como a la secuencia aminoacídica de fusión de la invención, los anticuerpos de la invención, y la célula presentadora de antígeno activada de la invención.

En otra realización preferida de la invención, la composición farmacéutica de la invención es una vacuna.

PREPARACIÓN COMBINADA DE LA INVENCION

Las secuencias A y B de la invención pueden encontrarse unidas en una misma composición, o yuxtapuestas para su administración simultánea, combinada o secuencial a un mamífero, incluyendo al hombre.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una preparación combinada, de ahora en adelante preparación combinada de la invención, que comprende las secuencias A y B de la invención, o cualquiera de sus fragmentos y/o variables biológicamente activos.

Debe enfatizarse que el término "preparación combinada" o también denominada "yuxtaposición", en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición verdadera, para poder encontrarse disponibles para su aplicación combinada, separada o secuencial. De esta manera, la expresión "yuxtapuesta" implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

En otra realización preferida de la invención, la preparación combinada de la invención es una vacuna.

USOS DE LA INVENCION

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las secuencias A y B de la invención, la composición de la invención, la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula hospedadora de la invención, el anticuerpo de la invención, la composición celular inmunoterapéutica de la invención, la composición farmacéutica de la invención, o la preparación combinada de la invención, en la elaboración de un medicamento. En una realización preferida, el medicamento es una vacuna. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una vacuna, de ahora en adelante vacuna de la invención, que comprende las secuencias A y B de la invención, la composición de la invención, la secuencia de nucleótido de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula hospedadora de la invención, el anticuerpo de la invención, la composición celular inmunoterapéutica de la invención, la composición farmacéutica de la invención, o la preparación combinada de la invención.

En el contexto de la presente invención el término "vacuna" se refiere a una preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Son preparados de antígenos que una vez dentro del organismo provocan la respuesta del sistema inmunitario, mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

La vacuna puede contener un único tipo de péptido o una diversidad de péptidos que cubren epitopos diferentes o similares. Además, o como alternativa, puede proporcionarse un único polipéptido con múltiples epitopos. Este último tipo de vacuna se denomina vacuna polivalente. Un epitopo múltiple incluye dos o más epitopos de repetición.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de las secuencias A y B de la invención, la composición de la invención, la secuencia de nucleótido de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula hospedadora de la invención, el anticuerpo de la invención, la composición celular inmunoterapéutica de la invención, la composición farmacéutica de la invención, o la preparación combinada de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos relacionados con las proteínas agregantes.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la proteína agregante es la α -sinucleína o α -sinucleinopatías. En una realización preferida de este aspecto, la enfermedad o trastorno relacionado con la α -sinucleína se selecciona de la lista que consiste en: enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia de sistemas múltiples (MSA), enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica (ELA),

demencia frontotemporal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Huntington, la enfermedad de priones, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, esclerosis múltiple, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, el insomnio familiar fatal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, neurodegeneración debida a agregación de proteínas relacionado con el envejecimiento, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y/o trastornos similares a la esquizofrenia. Más preferiblemente es el Parkinson (EP).

En otra realización preferida, la proteína agregante es la SOD1, y aún más preferiblemente la enfermedad es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA o ALS).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la preparación combinada de la invención, que comprende las secuencias A y B de la invención, en la elaboración de un medicamento para su administración combinada, simultánea o secuencial, para el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos relacionados con una proteína agregante de la invención. En una realización preferida, la proteína agregante es la α -sinucleína, o *sinucleinopatías*.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere, también, a una composición capaz de generar una respuesta inmune frente a una proteína agregante dada que está causando una enfermedad en el hombre o los animales. Incluye, por tanto, lo que se conoce como vacuna, tal y como se ha definido previamente en esta memoria.

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LA INVENCION

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de detección *in vitro* de una proteína agregante de la invención que comprende la adición del anticuerpo de la invención a una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende dicha proteína agregante, y la detección y la medición de una concentración de cualquier complejo formado entre el anticuerpo y la proteína agregante. En una realización preferida, dicha proteína agregante es la α -sinucleína. Más preferiblemente el anticuerpo está marcado con un marcador detectable, y la presencia del complejo formado entre el anticuerpo y la α -sinucleína se realiza por la detección del marcador. En otra realización preferida, la detección de la proteína agregante puede servir para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de una

enfermedad relacionada con dicha proteína agregante. Dichas proteínas y enfermedades han sido descritas, pero sin limitarse, previamente en la memoria.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Sobreexpresión y purificación de la α -sinucleína

La α -sinucleína (α Syn) humana silvestre fue sobreexpresada en células de *E. coli* BL21(DE3) utilizando el plásmido pT7-7 y purificada como se ha descrito antes (Roodveldt *et al.*, 2010. PLoS One 5(10): e13481; Roodveldt *et al.*, 2013. PLoS One. 8(11):e79160). La pureza (>95%) y estado monomérico de la preparación fue evaluado por SDS-PAGE 15%, espectrometría de masas, electroforesis nativa en gradiente 4-10% (Lonza, Basel, Suiza), como se ha descrito (Roodveldt *et al.*, PLoSOne 2010). Previo a su uso y para la eliminación de cualquier posible contenido de endotoxina, la proteína en solución fue sometida a filtración por centrifugación con Amicon Ultra-100 kDa (Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, IRL). El contenido de endotoxinas en la preparación de proteína se ha medido con el ToxiSensorChromogenic LAL Assay Kit (GenScript, Piscataway, EE.UU.), y los valores obtenidos fueron <1 EU/mg proteína. La concentración de proteína de la α Syn fue determinada con Micro BCA Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

Preparación y caracterización de oligómeros de α -sinucleína

La preparación y caracterización de oligómeros solubles de α Syn se llevó a cabo como se ha descrito (Roodveldt *et al.*, 2012. *Biochemistry* 51(44):8771-8) y la fracción oligomérica purificada fue almacenada a 4 °C hasta un máximo de 24 hrs. La concentración de proteína se determinó como se describe arriba.

5

Proteína Grp94

Se utilizó la proteína Grp94 (Gp96) recombinante completa (*full length*) canina expresada en baculovirus (*endotoxin-free*) de Abcam (Cambridge, Reino Unido; #ab92290).

10 **Proteína Hsp70**

Se utilizó la proteína Hsp70 citosólica (HSPA1A) recombinante completa (*full length*) humana sobre-expresada en *E. coli* y purificada según se ha descrito (Roodveldt *et al.*, 2009. *EMBO J.* 28(23):3758-70). La pureza (>95%) de la preparación fue evaluada por SDS-PAGE 15%, Previo a su uso y para la eliminación de cualquier posible contenido de endotoxina, la proteína en solución fue sometida a filtración por centrifugación con Amicon Ultra-100 kDa (Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, Irlanda). El contenido de endotoxinas en la preparación de proteína se ha medido con el ToxiSensor Chromogenic LAL Assay Kit (GenScript, Piscataway, EE.UU.), y los valores obtenidos fueron <1 EU/mg proteína. La concentración de proteína de la α Syn fue determinada con Micro BCA Reagent Kit (Pierce, 20 Rockford, IL, EE.UU.).

Proteína SOD1

Se utilizó la proteína Superóxido Dismutasa 1 (SOD1) recombinante completa (*full length*) humana sobre-expresada en *E. coli* purificada por cromatografía y con una pureza de >95% (ProSpec, Rehovot, Israel). 25

Protocolos de inmunización de ratones

Protocolo 1:

Los ratones fueron inmunizados con 5 μg de Grp94 y/o con 0,8 μg de αSyn no agregada. Preparación de la solución proteica para la inmunización: tras incubar Grp94 y αSyn con una relación molar 1:1 chaperona: αSyn (en HEPES 20 mM, pH 7.5) en combinación o solas (en el caso de los controles) durante 2 horas a 42 °C, la solución se llevó a un volumen final de 150 μl de DPBS por cada ratón. A continuación, se mezcló con otros 150 μl de Adyuvante Completo de Freund y la mezcla se agitó vigorosamente hasta obtener una emulsión. A cada ratón se le administraron los 300 μl de emulsión, repartidos en tres inyecciones subcutáneas: una en la parte superior de cada pata trasera y otra en la zona cervical. Tras 7 días se realizó el mismo proceso pero en este caso empleando Adyuvante Incompleto de Freund. A los 7 días de la segunda inmunización los ratones fueron sacrificados.

Protocolo 2:

Los ratones fueron inoculados con 8 μg de Grp94 y/o 13 μg de oligómeros de αSyn , Preparación de la solución proteica para la inmunización: tras incubar Grp94 y αSyn oligomérica con una relación molar 1:10 chaperona:protómero de αSyn (en HEPES 20 mM, pH 7.5) en combinación o solas (en el caso de los controles) durante 2 horas a 42 °C, la solución se llevó a un volumen total de 100 μl por cada ratón. Esta solución, en ausencia de adyuvante, fue inoculada en una única inyección subcutánea aplicada en la zona lumbar. El mismo proceso fue repetido a los 7 días y a los 21 días tras la primera inmunización. 7 días después de la última inmunización, es decir 28 días después del inicio del proceso, los animales fueron sacrificados.

En ambos casos a los ratones se les extrajo entre 500 y 700 μl de sangre para obtener el suero y analizar la presencia de anticuerpos, y el bazo para extraer los esplenocitos que se emplearon para analizar la población de linfocitos T reguladores (Treg) y la respuesta inmune frente a αSyn .

Protocolo 3:

Los ratones fueron inmunizados con una combinación de 11 μg de Hsp70 y 2,5 μg de SOD1 no agregada, o alternativamente con 11 μg de Hsp70, o 2,5 μg de SOD1, o vehículo, como controles. Preparación de la solución proteica para la inmunización: tras incubar Hsp70 y SOD1 con una relación molar 1:1 chaperona: SOD1 (en Tris 20 mM, pH 7.4) en combinación o solas (en el caso de los controles) durante 2 horas a temperatura ambiente, la solución se llevó a un volumen final de 150 μl de PBS por cada ratón. A continuación, se mezcló con

otros 150 μ l de Adyuvante Completo de Freund y la mezcla se emulsionó transvasando la mezcla entre dos jeringas durante 5 minutos. A cada ratón se le administraron los 300 μ l de emulsión, repartidos en tres inyecciones subcutáneas: una en la parte superior de cada pata trasera y otra en la zona cervical. El mismo proceso pero en este caso empleando
5 Adyuvante Incompleto de Freund, fue realizado a los 14 y 28 días tras la primera inyección con el objeto de potenciar la respuesta.

Protocolo 4: inmunización con aSyn y Hsp70 sin adyuvante (manuscrito).

Los ratones fueron inmunizados con 5 μ g o 50 μ g de Hsp70 (baja y alta dosis
10 respectivamente) y/o con 1,06 μ g o 10,6 μ g de α Syn no agregada (baja y alta dosis respectivamente). Preparación de la solución proteica para la inmunización: las proteínas Hsp70 y α Syn fueron incubadas con una relación molar 1:1 chaperona: α Syn (50 mM Tris/HCl pH 7.4; 150 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$) en combinación o solas (en el caso de los controles) a 37 $^{\circ}$ C durante 2 horas en presencia de 4mM de ATP tras las que se le añadió
15 2,5 mM ADP y se incubó 2 horas más. La solución se llevó a un volumen final de 200 μ l de PBS por cada ratón y se le administraron en una única inyección subcutánea en la zona lumbar. Tras 7 días se realizó el mismo proceso. A los 7 días de la segunda inmunización los ratones fueron sacrificados.

Transferencia adoptiva de esplenocitos

20 Tras el proceso de Inmunización de acuerdo a los Protocolos 1 y 2 y luego del sacrificio de los ratones inmunizados, se mezcló un número igual de esplenocitos procedentes de cada ratón de un mismo grupo y se transfirieron 10 millones de esplenocitos a cada ratón receptor mediante una única inyección intraperitoneal. Tras la transferencia se dió a los ratones un margen de 10 días antes de iniciar el tratamiento con MPTP con el objetivo de permitir a los
25 esplenocitos establecerse en el huésped.

Tratamiento de ratones con MPTP

Los animales receptores de la transferencia adoptiva fueron tratados con MPTP de manera crónica como se ha descrito anteriormente (Villadiego J. *et al* 2005. 25, 4091 - 4098). Tras el tratamiento se dejó a los animales recuperarse durante un mes antes de proceder con las
30 pruebas comportamentales.

Evaluaciones comportamentales de los animales tratados con MPTP

El análisis comportamental (*footprinting*) fue llevado a cabo tras dejar a los ratones recuperarse durante un mes luego del tratamiento crónico con MPTP y fue llevado a cabo

luego de la administración de anfetaminas, siguiendo el protocolo anteriormente descrito en Muñoz-Manchado A.B. *et al*, 2013. *Neurobiol Aging* 34(3):902-15.

Sacrificio de animales tratados y extracción de muestras

Tras el tratamiento con MPTP y posterior recuperación y evaluación comportamental se dejó
5 a los ratones durante 10 días para asegurar la completa eliminación de las anfetaminas y descartar cualquier interacción no deseada. Los ratones fueron sacrificados y se les extrajo sangre para obtener suero, y el bazo para el aislamiento de esplenocitos.

Evaluación de la respuesta inmune en animales inmunizados y receptores

-Determinación de células Treg por citometría de flujo:

10 Los esplenocitos se aislaron del bazo usando un protocolo estándar mediante perfusión descrito más arriba. 10^6 células fueron marcadas siguiendo las recomendaciones del fabricante empleando el *Mouse Foxp3 Buffer Set* (BD Pharmigen™) y anticuerpos anti-CD4 FITC, anti-CD25 APC y anti-Foxp3 PE todos de BD Pharmigen™. Fueron analizados empleando un citómetro de flujo FACS Calibur y el software CellQuest Pro (BD
15 Pharmigen™).

-Estimulación *in vitro* con antígeno y determinación de citoquinas (IFN- γ , IL-10 e IL-17):

3x10⁶ células fueron divididas en tres pocillos y estimuladas según el caso, con medio de
20 cultivo solo, α Syn (15 μ g por pocillo), SOD1 (20 μ g or pocillo), o LPS (0,5 μ g por pocillo) en 1 ml de medio de cultivo. Tras 36 horas los sobrenadantes fueron recogidos y centrifugados para eliminar restos celulares y células, y guardados a -80°C para el posterior análisis de citoquinas.

Para la medición de IFN- γ , IL-10 e IL-17 se emplearon kits específicos de ELISA, *BD OptEIA™ Set Mouse IFN-gamma*, *BD OptEIA™ Set Mouse IL-10* (BD Pharmigen™) y *BD OptEIA™ Set Mouse IL17*(BD Pharmigen™) y se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

-Determinación de IgG total y anti- α Syn o anti-SOD1 en suero:

La sangre extraída en el momento del sacrificio se dejó una hora a temperatura ambiente y
30 otra hora a 4 °C permitiendo así que se coagulara. Posteriormente se centrifugó a 21,000 g durante 15 minutos con el objetivo de obtener suero sin células, que fue congelado a -80°C para su posterior análisis. Para medir los niveles, de IgG1 e IgG2a así como de IgG e IgM

total los sueros fueron diluidos 1:240000 en PBS, 100 µl por pocillo fueron transferidos a una placa de 96 pocillos MaxiSorp (NUNC) e incubado durante 1 hora a 37 °C, posteriormente fueron lavados con PBST (0,05% Tween 20), bloqueados durante 1 hora a 37 °C con AssayDiluent (BD Pharmigen™). Tras lavar los pocillos nuevamente se empleó un anticuerpo específico anti IgG (Promega), IgG1 (AbCam), IgG2a (AbCam) o IgM (Miltenyi) conjugado con HRP diluido 1:4000 en AssayDiluent e incubado durante 1 hora a 37 °C. Tras lavar los pocillos se empleó TMB SubstrateReagent (BD Pharmigen™) para determinar la cantidad de IgG, IgG1, IgG2a o IgM presente en los sueros.

Para medir la cantidad de anticuerpos específicos anti-αSyn se empleó un protocolo similar pero con variaciones. Brevemente, se pretrató la placa o bien con αSyn diluida en PBS o bien un anticuerpo anti-αSyn (N19, Santa Cruz) a 1 µg por pocillo en 100 µl y se incubó 2 horas a 37°C, posteriormente los pocillos fueron lavados y bloqueados como en el protocolo anterior. En el caso de haber pretratado con anticuerpo anti-αSyn los pocillos se incubaron con 10 µg por pocillo de αSyn durante 1h a 37°C y fueron lavados con PBST. En ambos casos fueron incubados, 100 µl por pocillo, con los sueros diluidos 1:50 en Assay Diluent durante una hora 37 °C, posteriormente el lavado, la detección y el revelado se llevaron a cabo de la misma manera que en el anterior protocolo.

Para medir la cantidad de anticuerpos específicos anti-SOD1 se empleó un protocolo similar pero con variaciones. Brevemente, se pretrató la placa con SOD1 diluida en PBS a 0,5 µg por pocillo en 100 µl y se incubó 2 horas a 37°C, posteriormente los pocillos fueron lavados y bloqueados como en el protocolo anterior e incubados, 100 µl por pocillo, con los sueros diluidos 1:50 en Assay Diluent durante una hora 37 °C, posteriormente el lavado, la detección y el revelado se llevó a cabo de la misma manera que en el anterior protocolo.

Resultados

Estimulación *in vitro* de esplenocitos con una combinación de Grp94/Gp96 y α-sinucleína para evaluar su potencial inductor de la respuesta inmune.

Con el fin de promover una respuesta inmune frente a la α-sinucleína (αSyn) que pueda potencialmente actuar como neuroprotectora en el contexto de una sinucleionopatía, se procedió en primer lugar a evaluar el efecto de una combinación de αSyn y Grp94 *in vitro*.

Para ello, se incubó un cultivo de esplenocitos murinos con una combinación de Grp94 y αSyn (1:1 relación molar), o las cantidades equivalentes de Grp94 o αSyn como controles, durante 24 hrs. Luego de separar las células, éstas se analizaron por citometría de flujo cuantificando la expresión de marcadores de superficie de activación celular, en particular MHC II y CD86, observándose una reducción del 50% y un aumento de 2 veces en la

expresión de estos marcadores en el caso de la estimulación con α Syn y Grp94, respectivamente, respecto del control de estimulación con solución tampón (**Figura 1A**). Por otra parte, la estimulación de los esplenocitos con una combinación de α Syn y Grp94 (α Syn+Grp94) produjo un aumento de 4.5 veces en la expresión de estos marcadores, respecto del control (**Figura 1A**). Además, se midieron en los sobrenadantes los niveles de las citoquinas IFN- γ , IL-10, e IL-17, por ELISA (**Figuras 1B, 1C, 1D**), detectándose también aumentos relativos para las dos primeras en el caso de la estimulación con la combinación de proteínas (**Figuras 1B y 1C**).

Inmunización de ratones con una combinación de Grp94/Gp96 y α -sinucleína, transferencia adoptiva de sus esplenocitos a ratones receptores y posterior administración de MPTP (modelo de Enfermedad de Parkinson), para evaluar su potencial protector contra EP.

Habiéndose observado una respuesta diferencial de los esplenocitos en cultivo como resultado de la estimulación con la combinación de proteínas, se procedió a efectuar inmunizaciones de ratones C57BL/6 macho sanos de 5-7 semanas de edad (5 ratones por grupo) con dichas preparaciones (α Syn, Grp94, una combinación de α Syn y Grp94, y el tampón como control) para evaluar la respuesta *in vivo*. Para ello se diseñaron dos protocolos de vacunación (Protocolo 1 y 2). 7 días después de terminar de aplicar el **Protocolo 1** de inmunización, los ratones fueron sacrificados para el análisis de los esplenocitos y del suero. En primer lugar, no se observaron variaciones en el contenido de células T reguladoras (Treg) en relación a las células CD4⁺ totales (**Figura 2A**). A continuación, los esplenocitos fueron cultivados e incubados alternativamente con α Syn o con solución tampón como referencia, luego de lo cual se separaron los sobrenadantes para el análisis de los niveles de ciertas citoquinas (**Figuras 2B y 2C**). En este caso, también se observó una respuesta diferencial para la combinación de α Syn y Grp94, evidenciándose una mínima reducción de los niveles de IFN- γ (**Figura 2B**) y valores equivalentes de IL-10 (**Figura 2C**) para α Syn+Grp94, como resultado de la estimulación *in vitro* de los esplenocitos con α Syn. Finalmente, se midieron los niveles y proporción de anticuerpos anti- α Syn en suero. En primer lugar, y sorprendentemente, se observó una reducción significativa en el contenido de anticuerpos IgG anti- α Syn en el caso de los ratones inmunizados con α Syn sola (**Figura 2D**), mientras que la inmunización con α Syn+Grp94 produjo niveles intermedios de anticuerpos IgG anti- α Syn en relación a las inmunizaciones con α Syn y Grp94 (**Figura 2D**).

Por otra parte, como estrategia para evaluar el potencial terapéutico contra una sinucleinopatía, se transfirieron los esplenocitos provenientes de los ratones inmunizados según el Protocolo 1 de vacunación a ratones C57BL/6 sanos, a los que posteriormente se

les aplicó un tratamiento crónico con MPTP durante 3 meses como modelo de Enfermedad de Parkinson (ver Materiales y Métodos). 43 días después de la administración de la última dosis de MPTP para todos los grupos (excepto para el control 'Salino') y después de haber realizados las pruebas comportamentales, los ratones fueron sacrificados y los bazos y el suero, extraídos para su análisis. Los esplenocitos aislados fueron analizados por citometría de flujo, y cultivados y estimulados *in vitro* con α Syn o tampón para el análisis de la respuesta mediada por citoquinas (**Figura 3 A-D**). Según los resultados, los animales tratados con MPTP que no han recibido esplenocitos (control MPTP) tenían menores niveles de células Treg que los animales no tratados con MPTP ni con esplenocitos (control 'sano' o 'Salino') (**Figura 3A**). Los animales receptores tratados con esplenocitos provenientes de animales inmunizados con α Syn o Grp94 mostraron valores algo mayores y menores que 'Salino', respectivamente, mientras que los receptores de esplenocitos de ratones inmunizados con α Syn+Grp94 mostraban los mayores porcentajes de Treg (**Figura 3A**). El mismo perfil, pero opuesto, se observó para las células T efectoras (Teff, **Figura 3B**), con niveles coincidentes para los ratones ' α Syn+Grp94' y 'Salino'.

Por otra parte, se evaluó la respuesta de los esplenocitos cultivados frente a la estimulación con α Syn o LPS, *in vitro*. En este caso, se observó una reducción en los niveles en sobrenadante de IFN- γ e IL-10 para los esplenocitos de los receptores de células de animales inmunizados con α Syn+Grp94, en relación a los equivalentes de α Syn y Grp94 solos (**Figuras 3B y 3C**), demostrando una efecto diferencial de la vacunación con la combinación de α Syn y Grp94.

Finalmente, los resultados de la prueba comportamental en los animales receptores (*footprinting*) arrojaron valores mínimos y máximos del parámetro medido ('stridevariation') de promedio \pm S.E.M. de 0.76 ± 0.26 (N=4) y 1.43 ± 0.25 (N=5) para los controles 'Salino' y 'MPTP', respectivamente, y de un valor cercano al control 'sano' por parte del tratamiento ' α Syn+Grp94' de 0.83 ± 0.17 (N=7), menor al obtenido con el tratamiento de ' α Syn' o 'Grp94' solos (**Figura 3E**).

A continuación, se procedió a probar un segundo protocolo de inmunización (**Protocolo 2**) en ratones C57BL/6 macho sanos de 5-7 semanas de edad (5 ratones por grupo), en el que se realizaron 3 inmunizaciones en ausencia de adyuvante, y se utilizó la α Syn en estado oligomérico/agregada. En este caso, no se observaron diferencias en el contenido de Treg respecto del total de células CD4⁺ (**Figura 4A**), aunque se detectó una cierta tendencia hacia un mayor contenido de células Teff en los ratones inmunizados con 'Ol. α Syn+Grp94' respecto de los inmunizados con Ol. α Syn y Grp94 por separado (**Figura 4B**). Al igual que antes, se midieron los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes de esplenocitos cultivados y estimulados *in vitro* con α Syn o solución tampón como referencia, observándose un

aumento en las muestras provenientes de la inmunización con Ol. α Syn, y valores similares al control para 'Grp94' y 'Ol. α Syn+Grp94' (**Figura 4C**). Además, los resultados del contenido de anticuerpos séricos IgG anti- α Syn en relación a IgG total, y de anticuerpos IgM anti- α Syn mostraron mayores niveles en el caso de los ratones inmunizados con 'Ol. α Syn+Grp94' que aquellos inmunizados con Ol. α Syn o Grp94 por separado (**Figuras 4D y 4E**).

Al igual que antes, se transfirieron esplenocitos de los ratones inmunizados según el Protocolo 2 a ratones C57BL/6 macho sanos, a los cuales se les administró posteriormente MPTP durante 3 meses como modelo de Parkinson. Los resultados de la prueba comportamental en los animales receptores (*footprinting*) (**Figura 5**) arrojaron valores mínimos y máximos del parámetro medido (*'stride variation'*) de promedio \pm S.E.M. de 1.06 ± 0.16 (N=5) y 1.79 ± 0.26 (N=5) para los controles 'Salino' y 'MPTP', respectivamente, y de un valor similar al del control 'sano' por parte del tratamiento ' α Syn+Grp94' de 1.02 ± 0.23 (N=5), a diferencia del obtenido con el tratamiento de ' α Syn' o 'Grp94' solos (1.98 ± 0.39 , N=5; 2.01 ± 0.55 , N=5) (**Figura 5**).

Estos resultados demuestran que la inmunización con una combinación de α Syn (tanto en su forma no agregada como oligomérica) y la chaperona Grp94 produce efectos diferenciales en la respuesta inmune de los ratones inmunizados. y que la transferencia adoptiva de los esplenocitos provenientes de dicha inmunización son capaces de prevenir o contrarrestar el desarrollo de síntomas relacionados con la Enfermedad de Parkinson en los ratones receptores.

Vacunación de ratones transgénicos modelo de ELA (SOD1 G93A) con una combinación de Hsp70 y SOD1, para evaluar su capacidad terapéutica/profiláctica contra ELA.

Se realizó un experimento preliminar para evaluar el potencial terapéutico de la inmunización con una combinación de SOD1 y la chaperona Hsp70. Para ellos, se efectuaron inmunizaciones de ratones transgénicos que modelan el ELA (Tg SOD1 G93A, Jackson Laboratories Inc., USA) de 9 semanas de edad (3 ratones por grupo; N=3) de acuerdo al **Protocolo 3**. A continuación, los ratones fueron monitorizados cuidadosamente mediante la medición de diversos parámetros estándar de los modelos murinos de ELA, comenzando antes del inicio de la enfermedad (típicamente en la semana 12-13), y hasta el final de la enfermedad de acuerdo al criterio de 'punto final' (típicamente en la semana 18-19, cuando el animal reduce su peso hasta $<80\%$ respecto de su peso máximo). Luego de

ser sacrificados en el 'punto final', se extrajeron el bazo y la sangre para el análisis de los esplenocitos y del suero.

Los esplenocitos aislados fueron analizados por citometría de flujo para analizar las poblaciones celulares CD4+, T reguladoras (Treg) y efectoras (Teff) (**Figura 6**). Según este análisis, la inmunización con SOD1+Hsp70 produce un aumento de la población CD4+ y del contenido de células Teff, respecto de los animales tratados con vehículo, mientras que no se observan cambios en el contenido de células Treg. Por otra parte, los esplenocitos aislados fueron estimulados *in vitro* con SOD1 para cuantificar la secreción de IFN- γ , como indicador del tipo de respuesta antígeno-específica (**Figure 6**). Los datos obtenidos revelan un aumento de 3 veces los niveles de IFN- γ secretada frente al estímulo de SOD1 respecto del control. Finalmente, se midieron los niveles de anticuerpos IgG en suero para analizar la relación IgG1/IgG2a en los distintos grupos. Los resultados de esta cuantificación indican un aumento de dicho cociente en el caso del grupo SOD1+Hsp70 tanto para anticuerpos IgG totales, como para la población de anticuerpos SOD1-específicos (**Figura 6**), sugiriendo una preponderancia de respuesta tipo Th2 o 'neuroprotectora' en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas.

Por otra parte, el análisis de la evolución del peso y supervivencia de cada ratón permite observar una cierta protección frente a la caída del peso en los ratones inmunizados con SOD1+Hsp70 respecto de los controles (**Figura 7**), así como un aumento de la supervivencia (**Figura 7**). Estos resultados preliminares indican una respuesta inmunitaria diferencial inducido por SOD1+Hsp70 y un potencial efecto beneficioso de esta estrategia de vacunación contra ELA.

Inmunización de ratones C57BL/6 con una complejo/combinación de α Syn y Hsp70 sin adyuvante, y caracterización de la respuesta inmunitaria generada.

Primeramente, se demostró la formación de un complejo entre α Syn y Hsp70 por medio de PAGE-Western blot y Biacore luego de pre-incubar las proteínas en tampón. Se inmunizaron ratones C57BL/6 sanos (N=6-7) con dos dosis diferentes ('low' y 'high') de dicha preparación o con los controles correspondientes preparados de la misma manera, en ausencia de adyuvante, de acuerdo al **Protocolo 4**. 7 días luego de la finalización del protocolo de inmunización, los ratones fueron sacrificados y el bazo y la sangre fueron extraídos para el aislamiento de esplenocitos y la obtención de suero. El análisis de esplenocitos por citometría de flujo reveló que, mientras que la inmunización con α Syn o Hsp70 solas produce un aumento de la población Treg, el grupo α Syn+Hsp70 es capaz de suprimir dicho efecto, manteniendo esa población dentro de los niveles 'normales' respecto del control (**Figura 8**). Por otra parte, se observó un efecto similar y diferencial para α Syn+Hsp70 en los

niveles de anticuerpos anti- α Syn IgG, indicando que la respuesta inducida por el complejo es potencialmente capaz de suprimir una respuesta humoral antigénica específica para el autoantígeno α Syn (**Figura 8**). Finalmente, se cuantificaron los niveles de IL-10 e IFN- γ en suero, y se analizaron los cocientes IL-10/IFN- γ pareados para cada ratón (**Figura 8**). Los resultados obtenidos demuestran claramente un aumento diferencial de dicho cociente para los animales inmunizados con la combinación α Syn+Hsp70, indicando que la respuesta inducida es de tipo Th2 o 'neuroprotectora' en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas.

REIVINDICACIONES

1.- Una composición que comprende:

5 a) una mezcla de péptidos/polipéptidos/proteínas que comprenda i) al menos un péptido/polipéptido/proteína cuya secuencia aminoacídica se corresponda con un péptido/polipéptido/proteína agregante (“secuencia A de la invención”), o con cualquiera de las variantes y fragmentos biológicamente activos de dicha secuencia, y ii) un péptido/polipéptido/proteína cuya secuencia aminoacídica se corresponda con una chaperona molecular (“secuencia B de la invención”), o con cualquiera de las variantes y
10 fragmentos biológicamente activos de dicha secuencia; y/o

b) un péptido/polipéptido/proteína de fusión, “secuencia aminoacídica de fusión de la invención”, que comprende i) las secuencias aminoacídicas de al menos un péptido/polipéptido/proteína agregante (“secuencia A de la invención”), o cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos, y ii) las secuencias de al menos un
15 péptido/polipéptido/proteína cuya secuencia aminoacídica se corresponda con una chaperona (“secuencia B de la invención”), o con cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos.

2.- La composición según la reivindicación anterior, donde el péptido/polipéptido/proteína agregante se selecciona de la lista que consiste en α -sinucleína, huntingtina, péptido beta-amiloide, TDP-43, FUS, tau, Prion Protein, Fibronectin, y SOD1.
20

3.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el péptido/polipéptido/proteína agregante es la α -sinucleína, o cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos.

4.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la chaperona se
25 selecciona de la lista que consiste en la familia de las Hsp90, de las Hsp70, de las inmunofilinas, de la peptidasa C56, de la PPIasa, de la familia 14-3-3, del grupo de las *small heat-shock proteins*, de la familia de las *small GTPase*, de la Hsp40(DnaJ), y las Clusterin, Grp170, Calreticulin, Hsp105, CHIP, alpha-crystallin o cualquiera de sus combinaciones.

5.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona
30 pertenece a la familia de las Hsp90 y se selecciona de la lista que consiste en la Grp94, la Grp96 y la Hsp90, o cualquiera de sus combinaciones.

- 6.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona pertenece a la familia de las Hsp70 y se selecciona de la lista que consiste en la Hsp70, Hsc70 y la Grp75, o cualquiera de sus combinaciones.
- 7.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona pertenece a la familia de las Inmunofilinas y se selecciona de la lista que consiste en la FKBP12 y la FKBP4/FKBP52, o su combinación.
- 8.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona es la DJ1/PARK7.
- 9.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona pertenece a la familia de la PPIasa y se selecciona de la lista que consiste en la Pin1, CypA, Cyp40 o cualquiera de sus combinaciones.
- 10.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona pertenece a la familia de la 14-3-3 y se selecciona de la lista que consiste en la 14-3-3 gamma, 14-3-3 epsilon, 14-3-3 tau o cualquiera de sus combinaciones.
- 11.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona es la Hsp27.
- 12.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona es la Rab11A.
- 13.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona de la familia de las Hsp40 (DnaJ) se seleccionan de entre la Hsp40 y la CSP, o su combinación.
- 14.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona se selecciona de la lista que consiste en Clusterin, Grp170, Calreticulin, Hsp105, CHIP, alpha-crystallin, o cualquiera de sus combinaciones.
- 15.- La composición según la reivindicación 1, donde el péptido/polipéptido/proteína agregante es la α -sinucleína o el SOD1 y la chaperona se selecciona entre cualquiera de las definidas en las reivindicaciones 4-14.
- 16.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la chaperona es la Grp94, o cualquiera de sus variantes biológicamente activas, y combinaciones de las mismas.
- 17.- La composición según la reivindicación 1, donde el péptido/polipéptido/proteína agregante es la α -sinucleína y la chaperona es la Grp94, la Grp96 o la Hsp70 o donde el péptido/polipéptido/proteína agregante es SOD1 y la chaperona es la Hsp70.

18.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde al menos uno de las secuencias A y/o B son recombinantes.

19.- Una secuencia de nucleótidos que comprende una o más secuencias de nucleótidos, que codifican para la proteína de fusión tal y como esta se define en cualquiera de las
5 reivindicaciones 1-18.

20.- Un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de la reivindicación anterior.

21.- Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión según la reivindicación 20, o la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 19.

10 22.- Un anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de unirse a una de las secuencias A o B, o a la secuencia aminoacídica de fusión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

15 23.- Un anticuerpo o un fragmento del mismo obtenido u obtenible tras la inmunización de un animal, o de las células de un animal, con la composición tal y como ésta se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-18.

24.- El anticuerpo según la reivindicación anterior, donde el animal empleado para la inmunización es un mamífero.

20 25.- Una composición celular inmunoterapéutica que comprende al menos una célula presentadora de antígeno activada aislada (APC), en el que dicha APC se obtiene a partir de un paciente diagnosticado con una enfermedad provocada por una proteína agregante de la invención, y en donde dicha APC es estimulada por la exposición *ex vivo* a una composición tal y como ésta se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-18.

26.- La composición celular inmunoterapéutica según la reivindicación anterior, donde la célula presentadora de antígeno activada aislada o APC es una célula dendrítica (DC).

25 27.- Una composición farmacéutica que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 19, el vector de expresión según la reivindicación 20, la célula hospedadora según la reivindicación 21, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 22-24, o la composición celular inmunoterapéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25-26.

30 28.- La composición farmacéutica según la reivindicación anterior, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

29.- La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 27-28, donde dicha composición es una vacuna que comprende opcionalmente un adyuvante.

30.- Una preparación combinada que comprende las secuencias A y B según se describen estas en cualquiera de las reivindicaciones 1-18.

5 31.- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 19, el vector de expresión según la reivindicación 20, la célula hospedadora según la reivindicación 21, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 22-24, o la composición celular inmunoterapéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25-26, en la elaboración de un medicamento.

10 32.- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, la secuencia de nucleótido según la reivindicación 19, el vector de expresión según la reivindicación 20, la célula hospedadora según la reivindicación 21, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 22-24, o la composición celular inmunoterapéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25-26, en la elaboración de un medicamento, donde el medicamento es una
15 vacuna.

33.- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, la secuencia de nucleótido según la reivindicación 19, el vector de expresión según la reivindicación 20, la célula hospedadora según la reivindicación 21, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 22-24, o la composición celular inmunoterapéutica según cualquiera de las
20 reivindicaciones 25-26, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos relacionados con una proteína agregante.

34.- El uso de la preparación combinada según la reivindicación 30, que comprende la secuencia A y la secuencia B, en la elaboración de un medicamento para su administración combinada, simultánea o secuencial, para el tratamiento o la prevención de enfermedades o
25 trastornos relacionados con una proteína agregante.

35.- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 33-34, donde la proteína agregante es la α -sinucleína y la chaperona se selecciona de entre cualquiera de las definidas en las reivindicaciones 4-14

36.- El uso según cualquier de las reivindicaciones 33-35, donde la enfermedad o trastorno
30 relacionado con la proteína agregante se selecciona de la lista que consiste en: enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), la variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, atrofia de sistemas múltiples (MSA), enfermedad de Alzheimer, fallo autonómico puro (FAP), síndrome de Down, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia frontotemporal, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Huntington,

Diabetes tipo II, la enfermedad de priones, la enfermedad de Creutzfeldt Jakob, esclerosis múltiple, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Kuru, el insomnio familiar fatal, amiloidosis cerebrovascular, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, neurodegeneración debida a agregación de proteínas relacionado con la edad, síndromes psiquiátricos, esquizofrenia y/o trastornos similares a la esquizofrenia.

5 37.- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, la secuencia de nucleótido según la reivindicación 19, el vector de expresión según la reivindicación 20, la célula hospedadora según la reivindicación 21, el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 22-24, o la composición celular inmunoterapéutica según cualquiera de las
10 reivindicaciones 25-26, donde la secuencia A es la α -sinucleína o cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos, la secuencia B es la chaperona según se define en cualquiera de las reivindicaciones 4-14, y la enfermedad se selecciona de la lista que consiste en: Parkinson (EP), Demencia con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples (MSA), síndrome de Gaucher, fallo autonómico puro (FAP), y la enfermedad de
15 Alzheimer.

38. El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, la secuencia de nucleótido según la reivindicación 19, el vector de expresión según la reivindicación 20, la célula hospedadora según la reivindicación 21, el anticuerpo según cualquiera de las
20 reivindicaciones 22-24, o la composición celular inmunoterapéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25-26, donde la secuencia A es la α -sinucleína o cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos, la secuencia B es la chaperona Grp94 o cualquiera de sus variantes y fragmentos biológicamente activos, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la prevención del Parkinson.

39. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 33-34, donde la proteína agregante es la
25 SOD1 y la chaperona se selecciona de entre cualquiera de las definidas en las reivindicaciones 4-14, preferiblemente la chaperona es la Hsp70.

40. El uso según la reivindicación 39, donde la enfermedad o trastorno relacionado con la SOD1 es la ELA.

FIGURAS

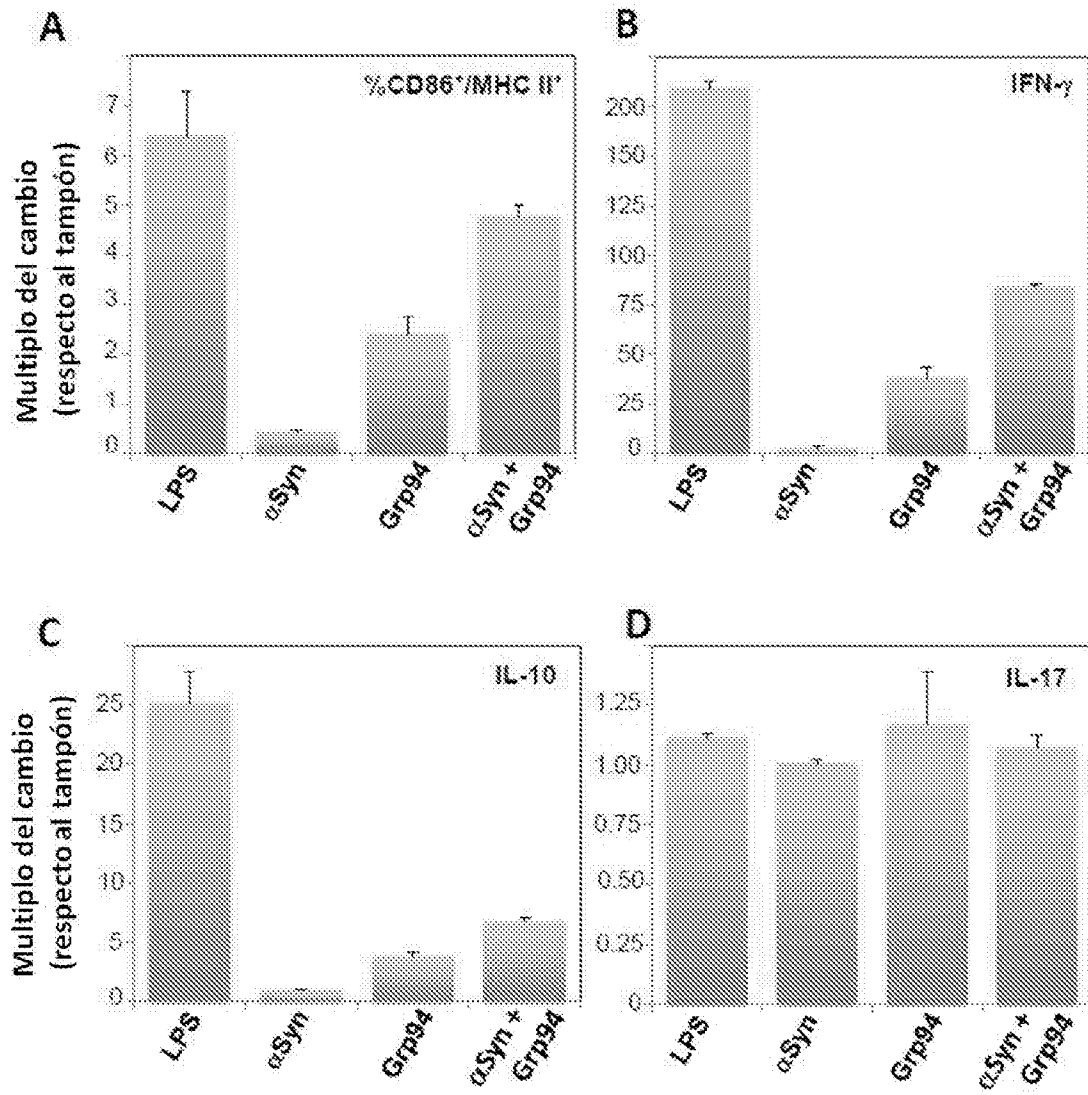


FIG. 1

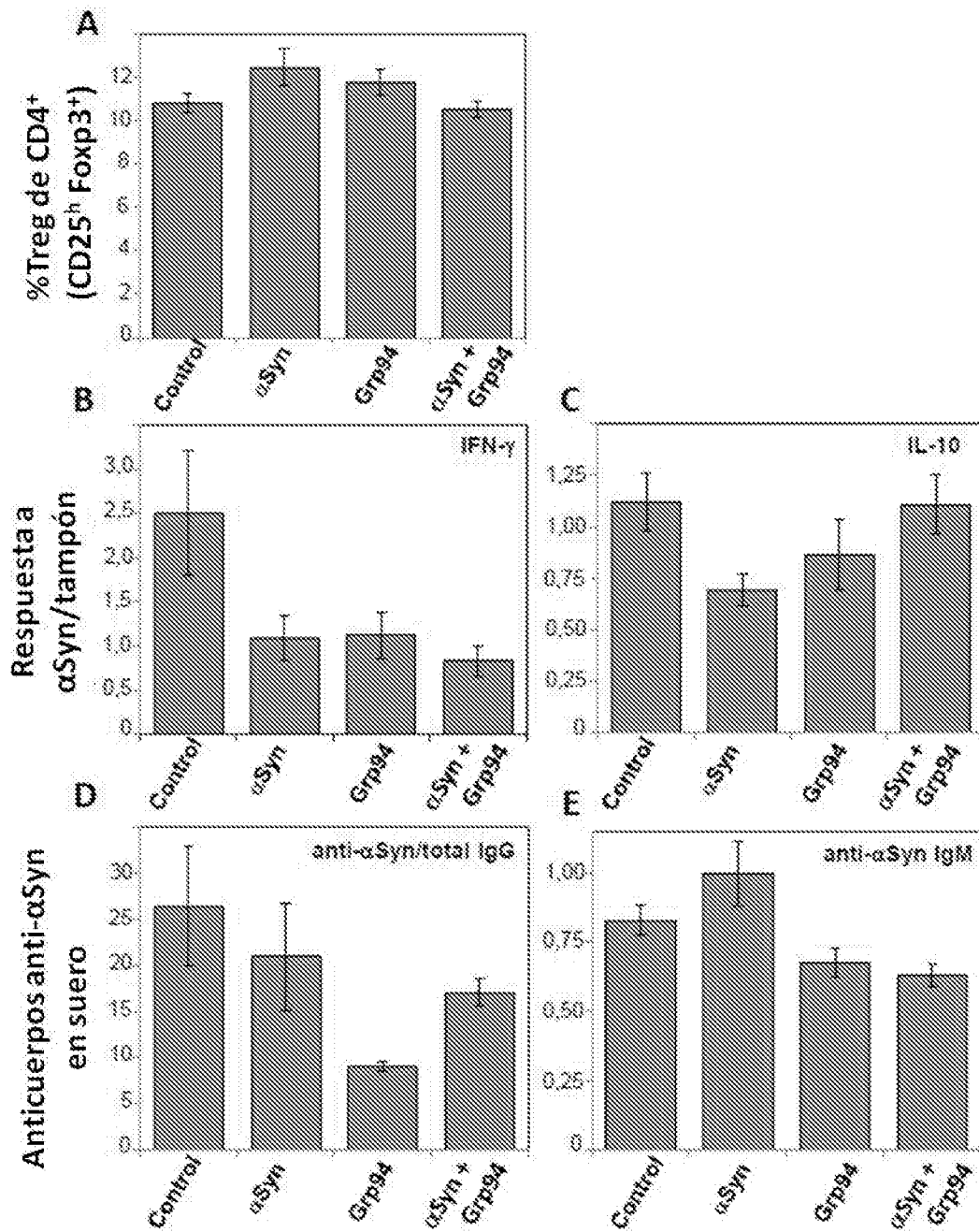


FIG.2

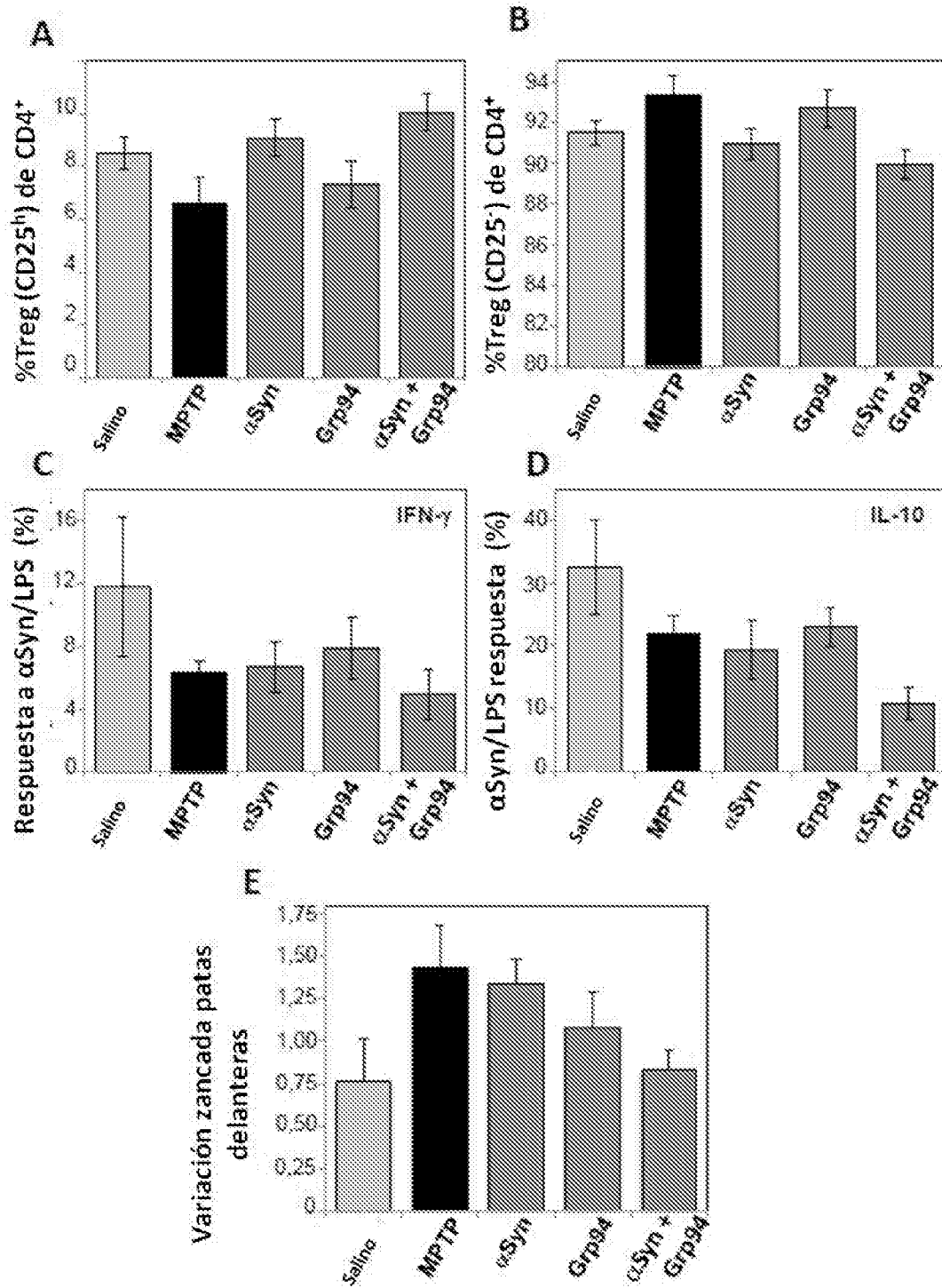


FIG. 3

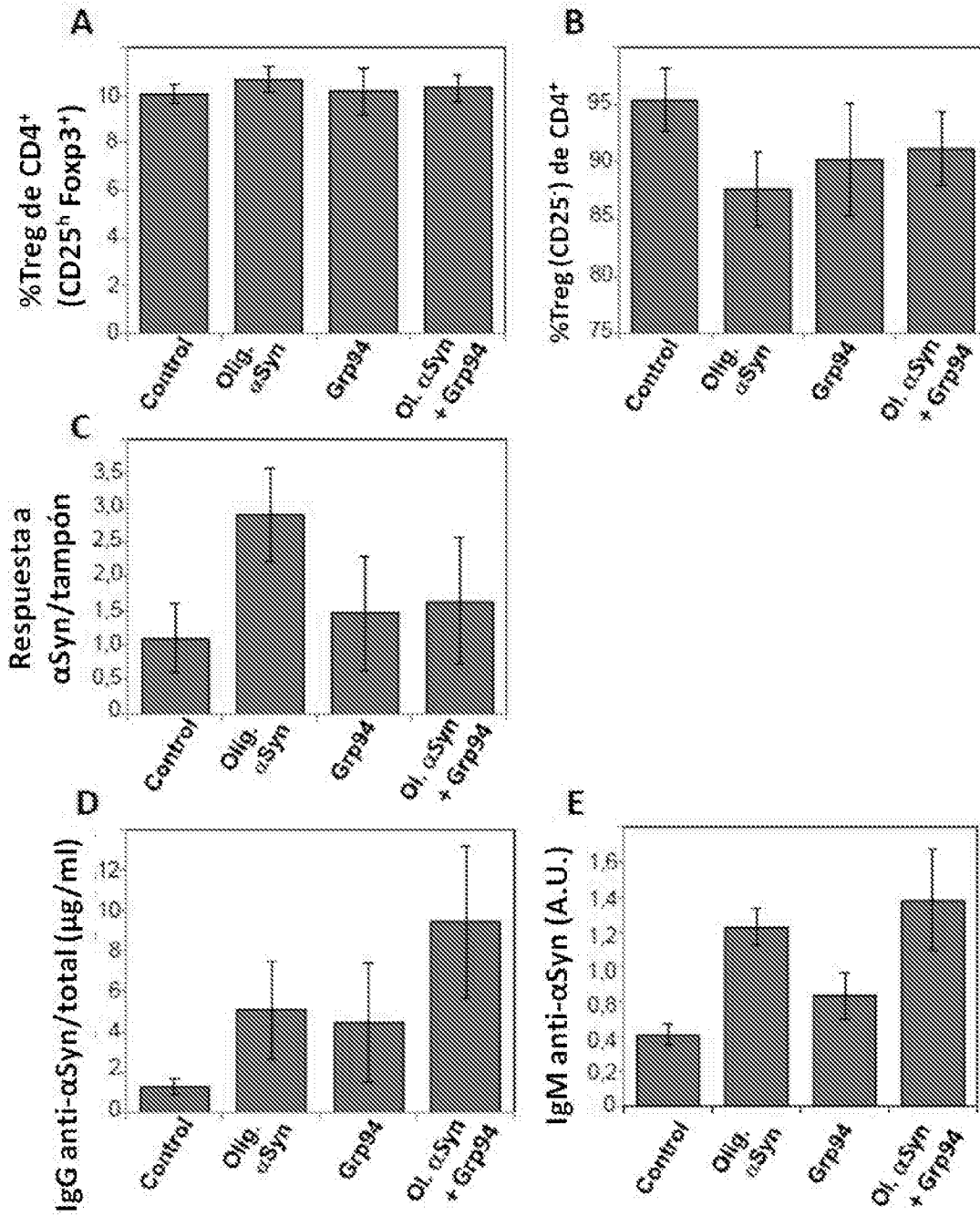


FIG. 4

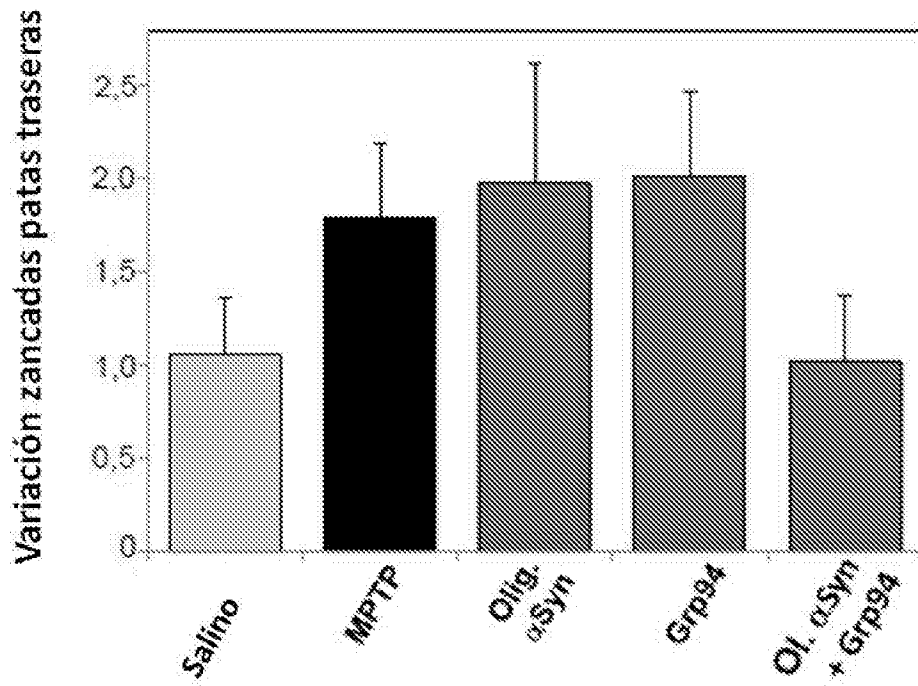


FIG. 5

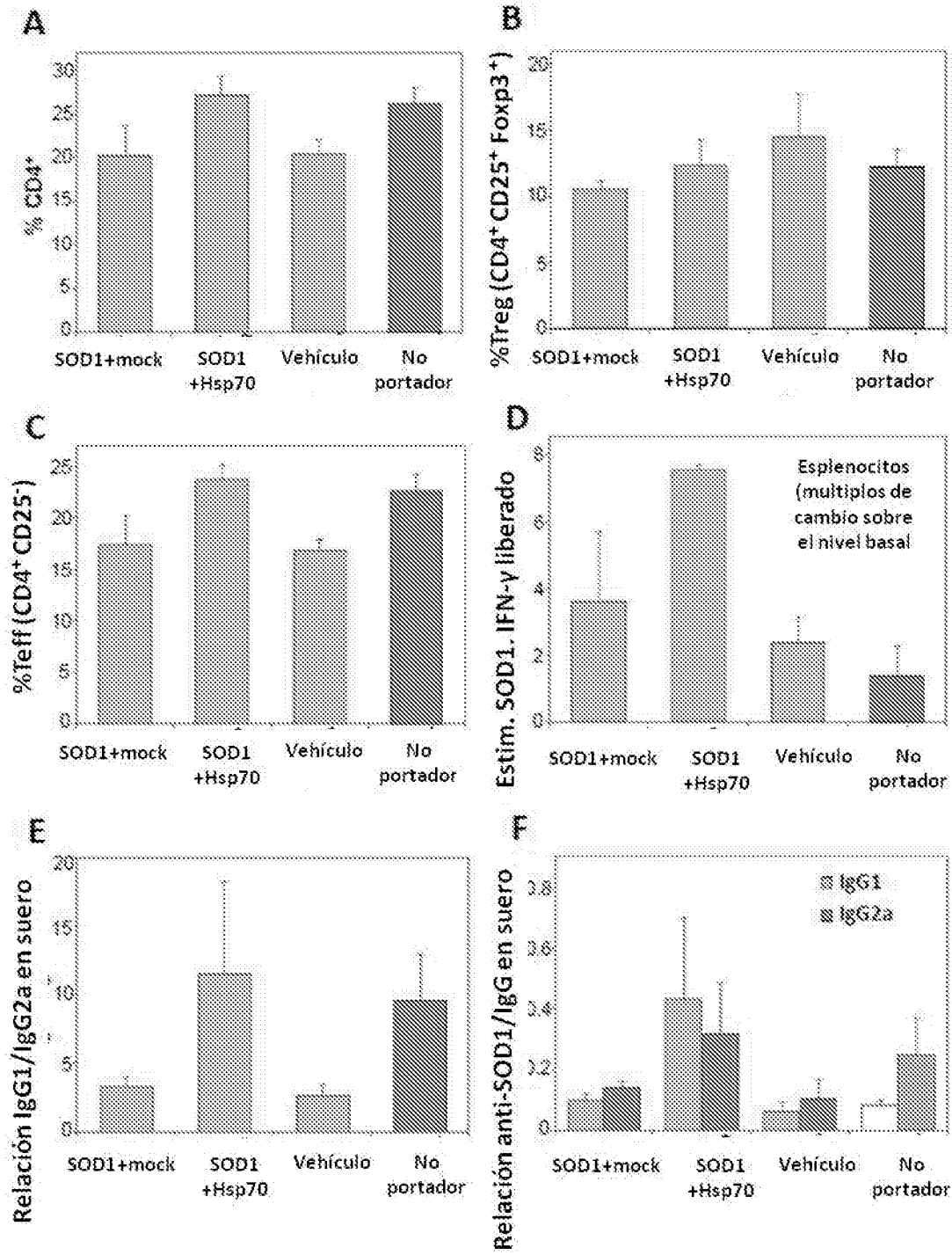


FIG. 6

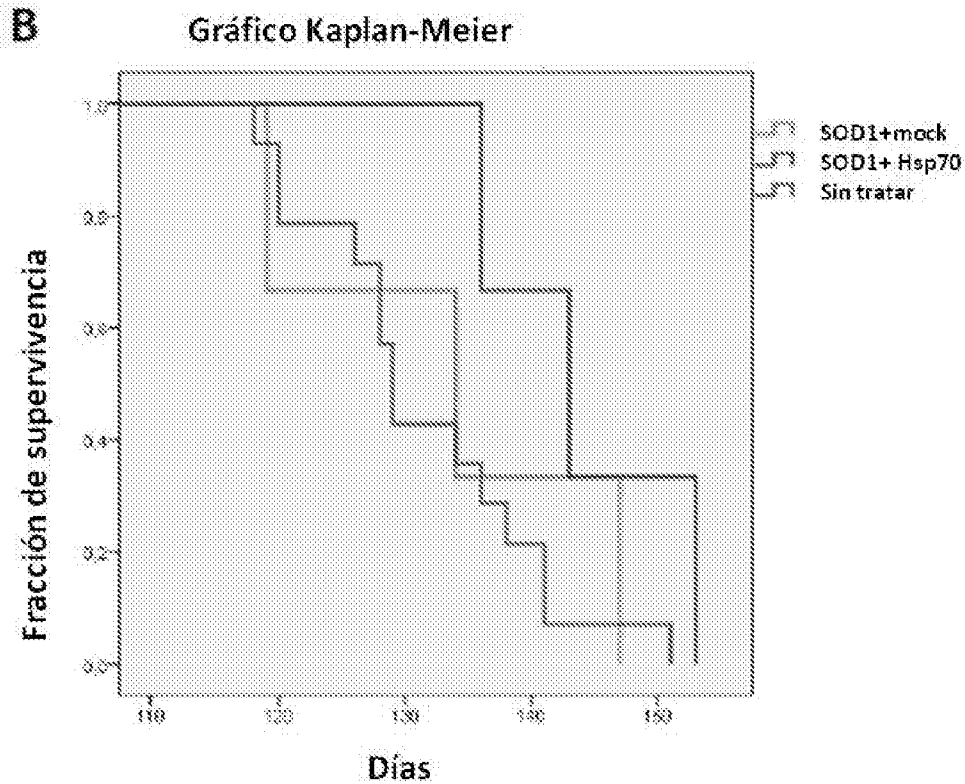
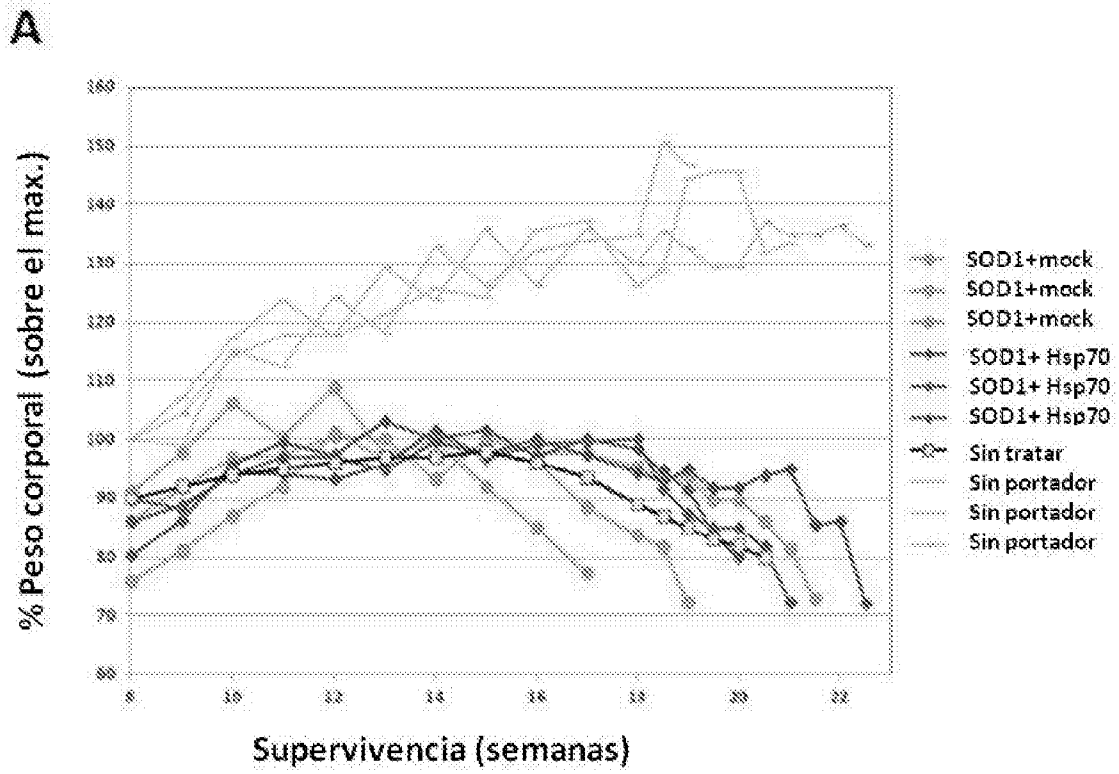


FIG. 7

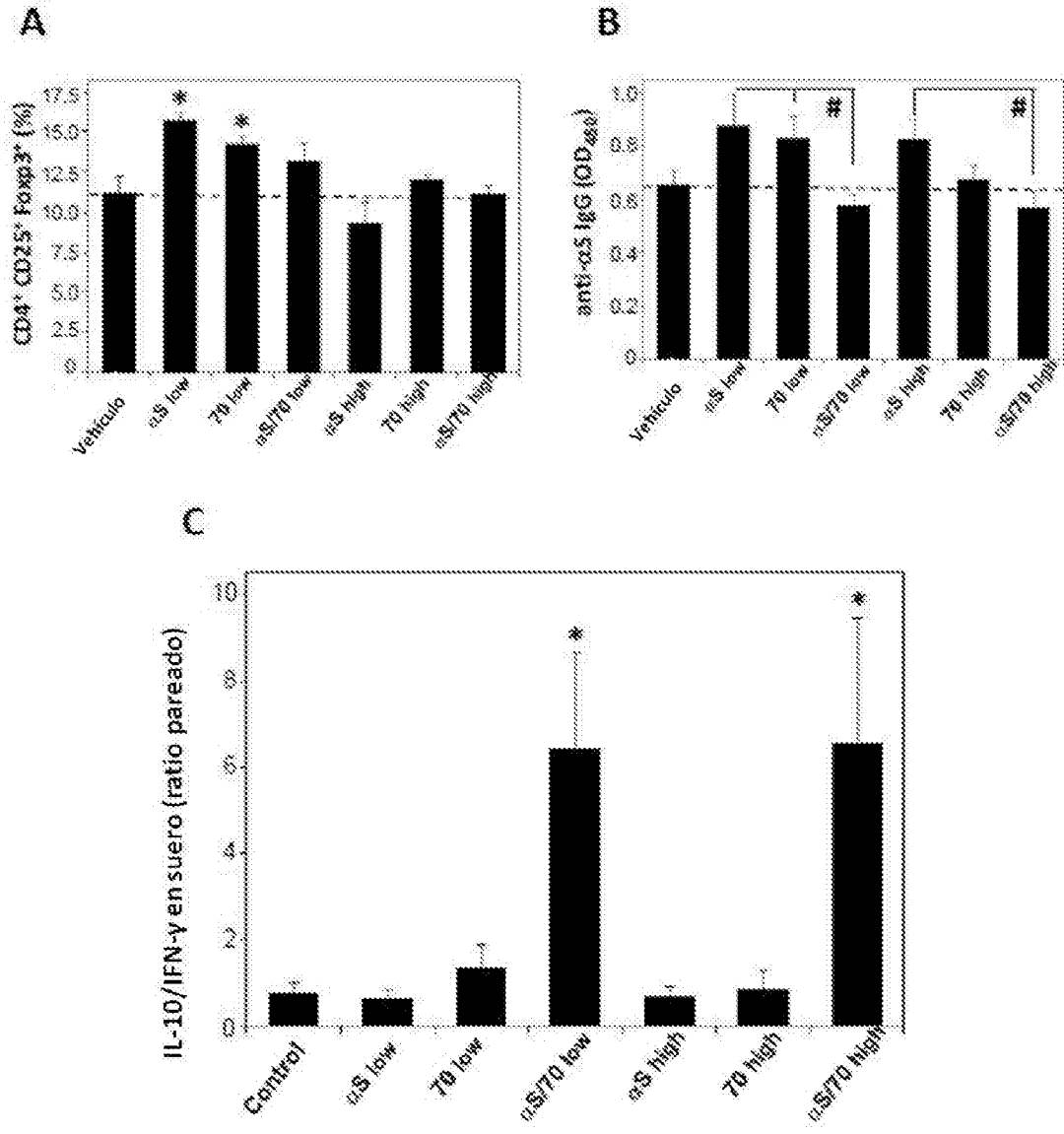


FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2014/070704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K, C07K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROODVELDT, C. et al. "Chaperone proteostasis in Parkinson's disease: stabilization of the Hsp70/ α -synuclein complex by Hip". THE EMBO JOURNAL. 02.12.2009. Vol. 28, N° 23, pages 3758-3770, the whole document.	1-4, 15, 17, 27-38
X	MANNINI, B. et al. "Molecular mechanisms used by chaperones to reduce the toxicity of aberrant protein oligomers". PNAS. 31.07.2012. Vol. 109, N° 31, pages 12479-12484, the whole document.	1, 2, 4, 27-34, 36-38
X	JIN, J. et al. "Identification of novel proteins associated with both α -synuclein and DJ-1*". MOLECULAR AND CELLULAR PROTEOMICS. May 2007. Vol. 6, N° 5, pages 845-859, abstract; page 849, Table 1.	1-5, 15-17, 27-38

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
04/02/2015

Date of mailing of the international search report
(04/02/2015)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. Novoa Sanjurjo

Telephone No. 91 3498466

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070704

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SMITH, L.M. et al. "α- synuclein and anti-α-synuclein antibodies in Parkinson's disease, atypical Parkinson syndromes, REM sleep behavior disorder, and healthy controls". PLOS ONE. December 2007. Vol. 7, N° 12, e52285, abstract.	22-24
X	SALWAY, K.D. et al. "Higher levels of heat shock proteins in longer-lived mammals and birds". MECHANISMS OF AGEING AND DEVELOPMENT. June-July 2011. Vol. 32, N°s 6-7, pages 287-297, abstract.	22-24
Y	BLACHERE, N.E. et al. "Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity". J. EXP. MED. 20.10.1997. Vol. 186, n° 8, pages 1315-1322, abstract.	27-38
X	WO 2004041067 A2 (ELAN PHARM INC & UNIV CALIFORNIA) 21.05.2004, claims.	22-24
Y	WO 03015812 A2 (PHARMEXA AS ET AL.) 27.02.2003, page 12, lines 11-22; page 40, lines 11-14.	27-38

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070704

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos. 1-5 (in part), 6-14, 18-21,
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 1-5 (in part), 6-14, 18-21, and the other claims, insofar as they are dependent thereon, are not supported by the description and are not related to any of the inventions as defined in the additional sheet.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

ADDITIONAL SHEET, CONTINUATION

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Nos.: **3, 16 y (1, 2, 4, 5, 15, 17, 22-24, 27-38) parcialmente.**

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

LACK OF UNITY OF INVENTION

Invention 1 - α -sinuclein/Grp94 composition, antibodies and use thereof. Claims: 3, 16 (in full) and 1, 2, 4, 5, 15, 17, 22-24, 27-38 (in part)

Invention 2 - SOD1/ Hsp70 composition, antibodies and use thereof. Claims: 1, 2, 4, 6, 15, 17, 22-24, 27-37, 39, 40 (in part)

Invention 3 - Immunotherapeutic cell composition obtained from the α -sinuclein/Grp94 composition. Claims: 25-29, 31-33, 35-38 (in part)

Invention 4 - Immunotherapeutic cell composition obtained from the SOD1/ Hsp70 composition. Claims: 25-33, 35-37, 39-40 (in part)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2014/070704

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2004041067 A2	21.05.2004	JP2014012700 A	23.01.2014
		US2012201842 A1	09.08.2012
		JP2012041338 A	01.03.2012
		JP2010280663 A	16.12.2010
		US2011135660 A1	09.06.2011
		US2006058233 A1	16.03.2006
		US8506959 B2	13.08.2013
		US2005037013 A1	17.02.2005
		US8697082 B2	15.04.2014
		US2004136993 A1	15.07.2004
		US7727957 B2	01.06.2010
		US2004146521 A1	29.07.2004
		JP2006516116 A	22.06.2006
		JP4899037B B2	21.03.2012
		EP2361629 A1	31.08.2011
		EP1578253 A2	28.09.2005
		EP1578253 A4	12.11.2008
		CA2503561 A1	21.05.2004
		AU2003290548 A1	07.06.2004
		AU2003290548 A8	07.06.2004
AR041725 A1	26.05.2005		
-----	-----	-----	-----
WO03015812 A2	27.02.2003	KR20040044465 A	28.05.2004
		HRP20120283 A2	30.06.2012
		AU2010212381 A1	09.09.2010
		AU2010212381B B2	19.01.2012
		JP2009280582 A	03.12.2009
		JP5114455B B2	09.01.2013
		US2010047262 A1	25.02.2010
		US8871212 B2	28.10.2014
		AU2007249087 A1	10.01.2008
		AU2007249087B B2	20.05.2010
		IS8643 A	10.05.2007
		HK1064934 A1	16.03.2007
		HRP20040218 A2	31.08.2004
		CO5560581 A2	30.09.2005
		US2005163744 A1	28.07.2005
		MXPA04001467 A	17.02.2005
		ZA200400895 A	03.05.2005
		NO335602B B1	16.04.2004
		NO20040431 A	16.04.2004
		IS7133 A	29.01.2004
		US2004191264 A1	30.09.2004
		YU13304 A	17.08.2006
		US2003157117 A1	21.08.2003
		SI1420815T T1	31.12.2006
		RS51699 B	31.10.2011
		PT1420815E E	29.12.2006
		PL215125B B1	18.04.2005
PL369099 A1	18.04.2005		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2014/070704

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		NZ547224 A	30.06.2008
		NZ530940 A	30.11.2007
		MEP43208 A	10.02.2011
		KR20100086520 A	30.07.2010
		KR20090074830 A	07.07.2009
		KR101057488B B1	19.08.2011
		JP2004538332 A	24.12.2004
		HU0400669 A2	28.01.2005
		HU0400669 A3	28.07.2011
		ES2269749T T3	01.04.2007
		EP1685847 A1	02.08.2006
		EP1420815 A2	26.05.2004
		EP1420815 B1	02.08.2006
		EA200600974 A1	27.10.2006
		EA011610 B1	28.04.2009
		EA007533 B1	27.10.2006
		DK1420815T T3	04.12.2006
		DE60213615T T2	09.08.2007
		CN101675992 A	24.03.2010
		CN101675992B B	21.05.2014
		CN1893970 A	10.01.2007
		CN100562338C C	25.11.2009
		CA2457140 A1	27.02.2004
		CA2457140 C	05.08.2014
		BR0212047 A	17.08.2004
		AU2002325199B B2	20.09.2007
		AT334698T T	15.08.2006
		AR036270 A1	25.08.2004
		MY144532 A	30.09.2011
		US2002119162 A1	29.08.2002
		US7097837 B2	29.08.2006
		NZ527720 A	24.03.2005
		JP2004529881 A	30.09.2004
		EP1363664 A2	26.11.2003
		WO02066056 A2	29.08.2002
		WO02066056 A3	03.01.2003
		CA2440197 A1	29.08.2002
		AU2002233166B B2	29.06.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070704

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/17 (2006.01)
C07K16/18 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)
A61P25/16 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070704

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ROODVELDT, C. et al. "Chaperone proteostasis in Parkinson's disease: stabilization of the Hsp70/ α -synuclein complex by Hip". THE EMBO JOURNAL. 02.12.2009. Vol. 28, Nº 23, páginas 3758-3770, todo el documento.	1-4, 15, 17, 27-38
X	MANNINI, B. et al. "Molecular mechanisms used by chaperones to reduce the toxicity of aberrant protein oligomers". PNAS. 31.07.2012. Vol. 109, Nº 31, páginas 12479-12484, todo el documento.	1, 2, 4, 27-34, 36-38
X	JIN, J. et al. "Identification of novel proteins associated with both α -synuclein and DJ-1*". MOLECULAR AND CELLULAR PROTEOMICS. Mayo 2007. Vol. 6, Nº 5, páginas 845-859, resumen; página 849, Tabla 1.	1-5, 15-17, 27-38

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
04/02/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
04 de febrero de 2015 (04/02/2015)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Novoa Sanjurjo
Nº de teléfono 91 3498466

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070704

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	SMITH, L.M. et al. “ α - synuclein and anti- α -synuclein antibodies in Parkinson’s disease, atypical Parkinson syndromes, REM sleep behavior disorder, and healthy controls”. PLOSONE. Diciembre 2007. Vol. 7, N° 12, e52285, resumen.	22-24
X	SALWAY, K.D. et al. “Higher levels of heat shock proteins in longer-lived mammals and birds”. MECHANISMS OF AGEING AND DEVELOPMENT. Junio-Julio 2011. Vol. 32, N°s 6-7, páginas 287-297, resumen.	22-24
Y	BLACHERE, N.E. et al. “Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity”. J. EXP. MED. 20.10.1997. Vol. 186, n° 8, páginas 1315-1322, resumen.	27-38
X	WO 2004041067 A2 (ELAN PHARM INC & UNIV CALIFORNIA) 21.05.2004, reivindicaciones.	22-24
Y	WO 03015812 A2 (PHARMEXA AS ET AL.) 27.02.2003, página 12, líneas 11-22; página 40, líneas 11-14.	27-38

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1 En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:

a. Medios

en papel

en formato electrónico

b. Cuando

en la solicitud internacional tal y como se presentó

junto con la solicitud internacional en formato electrónico

posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales:

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones n^{os}: **1-5 (parcialmente), 6-14, 18-21**
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

Las reivindicaciones 1-5 (parcialmente), 6-14, 18-21, y las demás en la medida en que dependen de ellas, no se basan en la descripción y no están relacionadas con ninguna de las invenciones definidas en el Recuadro Suplementario.

3. Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver Recuadro Suplementario

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}: **3, 16 y (1, 2, 4, 5, 15, 17, 22-24, 27-38) parcialmente.**

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2014/070704

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2004041067 A2	21.05.2004	JP2014012700 A	23.01.2014
		US2012201842 A1	09.08.2012
		JP2012041338 A	01.03.2012
		JP2010280663 A	16.12.2010
		US2011135660 A1	09.06.2011
		US2006058233 A1	16.03.2006
		US8506959 B2	13.08.2013
		US2005037013 A1	17.02.2005
		US8697082 B2	15.04.2014
		US2004136993 A1	15.07.2004
		US7727957 B2	01.06.2010
		US2004146521 A1	29.07.2004
		JP2006516116 A	22.06.2006
		JP4899037B B2	21.03.2012
		EP2361629 A1	31.08.2011
		EP1578253 A2	28.09.2005
		EP1578253 A4	12.11.2008
		CA2503561 A1	21.05.2004
		AU2003290548 A1	07.06.2004
		AU2003290548 A8	07.06.2004
AR041725 A1	26.05.2005		
-----	-----	-----	-----
WO03015812 A2	27.02.2003	KR20040044465 A	28.05.2004
		HRP20120283 A2	30.06.2012
		AU2010212381 A1	09.09.2010
		AU2010212381B B2	19.01.2012
		JP2009280582 A	03.12.2009
		JP5114455B B2	09.01.2013
		US2010047262 A1	25.02.2010
		US8871212 B2	28.10.2014
		AU2007249087 A1	10.01.2008
		AU2007249087B B2	20.05.2010
		IS8643 A	10.05.2007
		HK1064934 A1	16.03.2007
		HRP20040218 A2	31.08.2004
		CO5560581 A2	30.09.2005
		US2005163744 A1	28.07.2005
		MXPA04001467 A	17.02.2005
		ZA200400895 A	03.05.2005
		NO335602B B1	16.04.2004
		NO20040431 A	16.04.2004
		IS7133 A	29.01.2004
		US2004191264 A1	30.09.2004
		YU13304 A	17.08.2006
		US2003157117 A1	21.08.2003
		SI1420815T T1	31.12.2006
		RS51699 B	31.10.2011
		PT1420815E E	29.12.2006
		PL215125B B1	18.04.2005
PL369099 A1	18.04.2005		

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K38/17 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/16 (2006.01)

SUPLEMENTARIO DE REC. III

FALTA DE UNIDAD DE INVENCION

Invención 1.- Composición de α -sinucleína /Grp94, anticuerpos y su uso. Reivindicaciones: 3, 16 y (1, 2, 4, 5, 15, 17, 22-24, 27-38) parcialmente.

Invención 2.- Composición de SOD1/ Hsp70, anticuerpos y su uso. Reivindicaciones (1, 2, 4, 6, 15, 17, 22-24, 27-37, 39, 40) parcialmente.

Invención 3.- Composición celular inmunoterapéutica obtenida con la composición α -sinucleína/Grp94. Reivindicaciones (25-29, 31-33, 35-38) parcialmente.

Invención 4.- Composición celular inmunoterapéutica obtenida con la composición SOD1/Hsp70. Reivindicaciones (25-33, 35-37, 39, 40) parcialmente.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2014/070704

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		NZ547224 A	30.06.2008
		NZ530940 A	30.11.2007
		MEP43208 A	10.02.2011
		KR20100086520 A	30.07.2010
		KR20090074830 A	07.07.2009
		KR101057488B B1	19.08.2011
		JP2004538332 A	24.12.2004
		HU0400669 A2	28.01.2005
		HU0400669 A3	28.07.2011
		ES2269749T T3	01.04.2007
		EP1685847 A1	02.08.2006
		EP1420815 A2	26.05.2004
		EP1420815 B1	02.08.2006
		EA200600974 A1	27.10.2006
		EA011610 B1	28.04.2009
		EA007533 B1	27.10.2006
		DK1420815T T3	04.12.2006
		DE60213615T T2	09.08.2007
		CN101675992 A	24.03.2010
		CN101675992B B	21.05.2014
		CN1893970 A	10.01.2007
		CN100562338C C	25.11.2009
		CA2457140 A1	27.02.2004
		CA2457140 C	05.08.2014
		BR0212047 A	17.08.2004
		AU2002325199B B2	20.09.2007
		AT334698T T	15.08.2006
		AR036270 A1	25.08.2004
		MY144532 A	30.09.2011
		US2002119162 A1	29.08.2002
		US7097837 B2	29.08.2006
		NZ527720 A	24.03.2005
		JP2004529881 A	30.09.2004
		EP1363664 A2	26.11.2003
		WO02066056 A2	29.08.2002
		WO02066056 A3	03.01.2003
		CA2440197 A1	29.08.2002
		AU2002233166B B2	29.06.2006