

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 608**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 33/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07732419 .2**

96 Fecha de presentación: **13.04.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2029120**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

54 Título: **NANOPARTÍCULAS QUE CONTIENEN TRES LIGANDOS DIFERENTES PARA PROPORCIONAR RESPUESTAS INMUNITARIAS FRENTE A AGENTES INFECCIOSOS.**

30 Prioridad:  
**13.04.2006 US 791746 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.12.2011**

73 Titular/es:  
**MIDATECH LTD.  
4 & 5 DUNMORE COURT, WOOTTON ROAD  
ABINGDON, OXFORD OXFORDSHIRE OX13 6BH,  
GB**

72 Inventor/es:  
**RADEMACHER, Thomas William y  
WILLIAMS, Philip**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 369 608 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nanopartículas que contienen tres ligandos diferentes para proporcionar respuestas inmunitarias frente a agentes infecciosos

5

**Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere a nanopartículas y, más en particular, a nanopartículas para proporcionar respuestas inmunitarias para el tratamiento o profilaxis de la infección por agentes infecciosos como virus, parásitos, bacterias, priones y hongos.

10

**Antecedentes de la invención**

**[0002]** El uso de antígenos de hidratos de carbono y peptídicos en vacunas se ha visto muy dificultado por su falta de inmunogenicidad cuando se inyectan directamente a un paciente. Estos antígenos, cuando se inyectan solos, normalmente son ignorados por las células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés), se aclaran rápidamente y no inducen una respuesta inmunitaria.

15

**[0003]** En la mayoría de los casos, también es necesario administrar el antígeno en combinación con un adyuvante. El adyuvante puede ser un sistema de administración sencillo, como los liposomas, que reduce el aclaramiento del antígeno y hace más probable que alcance y sea ingerido por las APC. Sin embargo, esto por sí solo no es muy eficaz y normalmente es necesaria su combinación con agentes que estimulan el sistema inmunitario, como productos bacterianos que estimulan la formación de citocinas. También pueden administrarse conjuntamente las citocinas por sí mismas. Muchos de estos productos son demasiado tóxicos o demasiado experimentales para ser utilizados en seres humanos y los adyuvantes más eficaces no están aprobados para su uso en seres humanos. La mayoría de los adyuvantes disponibles para su uso en seres humanos tiene una eficacia limitada. Supone un desafío continuado encontrar adyuvantes eficaces adecuados para los seres humanos.

20

25

**[0004]** Los antígenos de hidratos de carbono tienen una inmunogenicidad especialmente débil debido a que pueden estimular sólo respuestas de células B y no de células T. Esto normalmente se obvia conjugando los hidratos de carbono a un vehículo proteico. Sin embargo, para desarrollar una respuesta inmunitaria también es necesario utilizar un adyuvante.

30

**[0005]** Muchas bacterias y otros patógenos también se distinguen mediante antígenos de hidratos de carbono que podría ser una mejor diana para las vacunas, si los hidratos de carbono no fueran tan poco inmunogénicos. Por tanto, la mejora de la inmunogenicidad de los antígenos de hidratos de carbono podría tener aplicaciones en una amplia variedad de campos terapéuticos.

35

**[0006]** En el documento WO 02/32404 (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) se describen nanopartículas formadas a partir de átomos metálicos o semiconductores en los que los ligandos que comprenden hidratos de carbono están unidos covalentemente al núcleo de las nanopartículas. Estas nanopartículas se usan para modular las interacciones mediadas por hidratos de carbono y son solubles y no tóxicas. En el documento WO 2004/108165 (Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Midatech Limited) se describen nanopartículas magnéticas que tienen núcleos que comprenden átomos metálicos pasivos y magnéticos, están el núcleo unido covalentemente a ligandos. En el documento WO 2005/116226 (Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Midatech Limited) se describen nanopartículas que están conjugadas con ligandos de ARN, en concreto ligandos de ARNsi.

40

45

**[0007]** En el documento WO200511622 se describe una nanopartícula que comprende un núcleo a base de átomos metálicos y/o semiconductores (Au, Ag, Cu, Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd, Au/Ag/Cu/Pd, Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd, Au/Fe/Cu/Gd) y diversos ligandos. Entre los ligandos se incluyen un grupo de hidrato de carbono, ARN y pueden tener un enlazador.

50

**[0008]** En Wei Chen y col. The Journal of Immunology. 1998. 1999, 162. 3212-3219, la proteína de choque térmico humana de 60 kDa se reconoce como una señal de peligro para el sistema inmunitario innato; también se muestra la importante implicación de su liberación en la inflamación tisular crónica dependiente de Th1.

55

**[0009]** Se mantiene una necesidad continua en la materia de medios de administración de antígenos a los pacientes para vacunarlos frente a una infección por organismos patogénicos como bacterias, virus y parásitos. En

especial, a menudo es necesario administrar las vacunas en dosis múltiples a los individuos para proporcionar protección adecuada frente a la infección y contienen péptidos o antígenos proteicos que son difíciles de formular en composiciones estables, especialmente cuando es necesario conservar las vacunas y utilizarlas en ambientes difíciles.

5

### **Resumen de la invención**

**[0010]** En líneas generales, la presente invención se refiere a nanopartículas que se diseñan para proporcionar respuestas inmunitarias para la profilaxis o tratamiento de la infección por agentes como virus, bacterias, parásitos y hongos. Las nanopartículas de la presente invención generalmente proporcionan una respuesta inmunitaria potente cuando se administran a individuos y pueden mejorar la necesidad de múltiples vacunaciones. Como las nanopartículas se construyen mediante síntesis y, generalmente, incluyen antígenos peptídicos, también pueden presentar la ventaja de proporcionar una composición para vacuna que tiene una estabilidad mejorada en comparación con las vacunas proteicas utilizadas con frecuencia en la técnica previa.

15

**[0011]** Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una nanopartícula que comprende un núcleo que incluye átomos metálicos y/o semiconductores, en la que el núcleo está unido covalentemente a diversos ligandos, los ligandos y la corona de ligandos se especifican como se describe en la reivindicación 1.

**[0012]** Las nanopartículas pueden incorporar uno o más ligandos adicionales que son capaces de producir una respuesta específica a agentes infecciosos diana. A modo de ejemplo, el ligando puede comprender un antígeno, p. ej., un antígeno peptídico, de un agente infeccioso como los virus de la gripe, VIH, tuberculosis o malaria. Los procedimientos para la identificación de antígenos adecuados procedentes de agentes infecciosos son bien conocidos por los expertos en la materia y pueden usarse como ligandos cuando se diseñan y fabrican las nanopartículas de la presente invención. En los ejemplos siguientes se proporciona un ejemplo relacionado con el diseño de nanopartículas que tienen antígenos peptídicos de la cepa H5N1 de la gripe aviar: Esta vacuna puede ser útil para el tratamiento o profilaxis de infecciones en seres humanos, o en animales, como aves incluyendo poblaciones de pájaros salvajes y aves de corral como pollos, pavos, patos y gansos.

**[0013]** De acuerdo con la presente invención, el primer componente ligando de la nanopartícula, el resto de hidrato de carbono capaz de estimular una respuesta inmunitaria innata, se diseña para hacer que la nanopartícula aparezca ante el sistema inmunitario como un fragmento de un agente infeccioso, como una bacteria, levadura, insecto o un parásito. A modo de ejemplo, los ligandos de hidratos de carbono que comprenden N-acetilglucosamina (GlcNAc) pueden hacer que las nanopartículas aparezcan ante el sistema inmunitario como el grupo superficial del grupo A de *Streptococcus*. Entre otros ejemplos se incluyen el uso de ligandos que comprenden ligandos de hidratos de carbono como manosa, que hacen que las nanopartículas aparezcan como levaduras; o xilosa o fucosa. Por tanto, a diferencia de las nanopartículas en las que los ligandos que contienen hidratos de carbono ayudan a proteger a las nanopartículas de su reconocimiento por el sistema inmunitario, la incorporación de estos restos de hidratos de carbono a la corona de las nanopartículas ayuda a estimular la respuesta inmunitaria innata a partir del sistema de reconocimiento basado en hidratos de carbono, lo que normalmente tiene como resultado la lectinofagocitosis de la partícula bacteriana o de la levadura y la posterior estimulación de la respuesta inmunitaria innata. Véase Rademacher y col., capítulo 11. Abnormalities in IgG Glycosylation and Immunological Disorders. Ed. Isenberg & Rademacher, John Wiley, 1996, pág. 221-252.

**[0014]** El segundo componente ligando de las nanopartículas es un ligando que comprende un péptido de células T colaboradoras, como los péptidos T colaboradores promiscuos empleados en los ejemplos descritos en este documento que derivan de la toxina tetánica (TT). Este componente de la nanopartícula dará lugar a la estimulación de las ramas de células T de memoria y colaboradoras de la respuesta inmunitaria ya que la mayoría de los individuos ya han sido inmunizados en su niñez, por ejemplo, contra el tétanos. También podrían usarse otros péptidos como, por ejemplo, del virus de las paperas. Un ejemplo de un resto peptídico preferido comprende la secuencia de aminoácidos FKLQTMVKLFNRIKNNVA (SEC ID N° 1).

**[0015]** El tercer componente ligando de las nanopartículas es un ligando que comprende una señal de peligro como una endotoxina que es capaz de iniciar una respuesta de peligro necesaria para producir una respuesta inmunitaria neutralizante y eficaz. Las señales peligrosas son reconocidas por el organismo como extrañas, aunque generalmente no inician respuestas anticorpales o de células T específicas, sirviendo en su lugar para preparar al sistema inmunitario ante la amenaza de una posible infección. Entre los ejemplos de estas "señales de peligro" se incluyen endotoxinas, proteínas de choque térmico, nucleótidos, intermediarios reactivos de oxígeno, productos de degradación de la matriz extracelular, neuromediadores y citocinas como interferones, y restos lipídicos como lípidos

gram negativos. En el ejemplo mostrado en la Figura 1, una endotoxina que es un agonista del receptor Toll 4 se usa para que el sistema inmunitario inicie la respuesta de peligro necesaria para iniciar una respuesta inmunitaria neutralizante y eficaz. Las señales de peligro se describen en Matzinger P. (1994) Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Ann. Reviews of Immunology*, vol. 12:991-1045 y el papel de los agonistas de receptores de tipo toll se discute en Aderem, A y Ulevitch, RJ (2000) *Nature*, vol. 406, 782-787.

**[0016]** Además, las nanopartículas básicas descritas anteriormente pueden modificarse genéticamente para contener ligandos adicionales y, especialmente, para comprender ligandos que son capaces de producir una respuesta específica frente a un agente infeccioso diana. A modo de ejemplo, el ligando puede comprender un antígeno, p. ej., un antígeno peptídico, procedente de un agente infeccioso. Entre los antígenos peptídicos de diversos agentes infecciosos se incluyen, pero sin limitaciones, virus de la gripe incluyendo virus de la gripe (p. ej., virus de la gripe aviar como la cepa H5N1), de la tuberculosis, VIH y malaria. Las nanopartículas de la Figura 1 muestran una nanopartícula que incluye ligandos que comprenden secuencias peptídicas sintéticas del virus de la gripe aviar H5N1. En algunas realizaciones, pueden emplearse una o más especies de nanopartículas que presentan ligandos antigénicos para presentar epítopes de una mezcla de organismos infecciosos, por ejemplo, péptidos de la gripe aviar, tuberculosis, malaria y VIH, tuberculosis, etc., a través del uso de nanopartículas que incluyen diversos ligandos antigénicos y/o una composición que comprende diversas especies diferentes de nanopartículas, incluyendo las especies diferentes ligandos antigénicos dirigidos frente a diferentes agentes infecciosos, teniendo así la ventaja de proporcionar una única vacuna que protege frente a una gama de agentes infecciosos. Los ligandos preferidos de este tipo comprenden secuencias peptídicas pequeñas derivadas de agentes infecciosos, que tienen por ejemplo 30 aminoácidos o menos, más preferiblemente 20 aminoácidos o menos y, más preferiblemente, entre 5 y 15 aminoácidos.

**[0017]** Además de estos tres componentes descritos anteriormente, también puede ser útil incluir ligandos adicionales para proteger otros elementos de la nanopartícula de su reconocimiento por el sistema inmunitario, de modo que la respuesta inmunitaria producida por las nanopartículas *in vivo* es específica del agente infeccioso diana. Más convenientemente, esto puede conseguirse incluyendo un ligando de hidratos de carbono, p. ej., los ligandos de glucosa del tipo descrito anteriormente.

**[0018]** Los ligandos descritos en este documento pueden proporcionarse como especies independientes unidas al núcleo de la nanopartícula o una única especie de ligando puede tener partes o segmentos diferentes que proporcionan las funciones diferentes anteriores. Por ejemplo, esto podría hacerse reduciendo el número de especies de ligando diferentes conjugadas al núcleo de la nanopartícula. Los ligandos pueden purificarse de una fuente natural, o producirse de forma sintética o recombinante usando técnicas conocidas en la materia. Preferiblemente, los ligandos se producen usando la química sintética.

**[0019]** Típicamente, los ligandos comprenden antígenos de hidratos de carbono o peptídicos. Las nanopartículas pueden usarse para administrar los antígenos y tienen aplicación en una amplia gama de aplicaciones, en particular, como vacunas en aplicaciones terapéuticas. En realizaciones preferidas, las nanopartículas también se unen a adyuvantes, por ejemplo, péptidos o hidratos de carbono estimuladores de células T colaboradoras que estimulan la red inmunitaria innata.

**[0020]** El sistema de vacunación descrito en este documento tiene varias ventajas con respecto a procedimientos técnicos previos. La nanopartícula en sí puede mejorar la respuesta inmunitaria frente al antígeno previniendo la degradación o aclaramiento del antígeno y proporcionando el antígeno en forma particulada.

**[0021]** Cuando se usan adyuvantes adicionales, la invención permite el uso de un único vehículo de administración para administrar tanto el antígeno como los adyuvantes, o múltiples antígenos o adyuvantes.

**[0022]** Las nanopartículas son de pequeño tamaño, suficientemente pequeño como para su captación por las células lo que permite la presentación del antígeno en la superficie celular. Cuando un péptido T colaborador también está conjugado con la nanopartícula, el péptido T colaborador también puede presentarse.

**[0023]** Preferiblemente, las nanopartículas de la invención son solubles en agua. En realizaciones preferidas, las nanopartículas de la invención tienen un núcleo con un diámetro medio entre 0,5 y 10 nm, más preferiblemente entre 1 y 2,5 nm. Preferiblemente, las nanopartículas que incluyen sus ligandos tienen un diámetro medio entre 10 y 30 nm.

**[0024]** Además de los ligandos descritos anteriormente, las nanopartículas pueden comprender uno o más tipos

- de ligandos adicionales. Por ejemplo, los ligandos adicionales, o grupos o dominios de ligandos, pueden incluir uno o más péptidos, un dominio proteico, una molécula de ácido nucleico, un grupo lipídico, un grupo de hidrato de carbono, cualquier grupo orgánico, aniónico o catiónico. El grupo de hidrato de carbono puede ser un polisacárido, un oligosacárido o un grupo monosacárido. Entre los ligandos preferidos se incluyen glucoconjugados, formando de este modo gluconanopartículas. Cuando se presenta una molécula de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico puede comprender ADN o ARN de cadena sencilla o doble. En una realización especialmente preferida, las nanopartículas comprenden una señal de translocación de membrana que les ayuda a permear a través de una membrana celular.
- 10 **[0025]** Las partículas pueden tener más de una especie de ligando inmovilizado sobre ellas, p. ej., 2, 3, 4, 5, 10, 20 o 100 ligandos diferentes. Alternativa o adicionalmente, pueden emplearse conjuntamente diversos tipos de nanopartículas diferentes. En realizaciones preferidas, el número medio de ligandos totales unidos a un núcleo metálico individual de la partícula es al menos un ligando, más preferiblemente 20 ligandos, más preferiblemente 50 ligandos, más preferiblemente 60 ligandos y, los más preferible, 100 ligandos.
- 15 **[0026]** La nanopartícula también puede comprender un marcador, como un grupo fluorescente, un radionucleido, un marcador magnético, un colorante, un átomo activo en RMN o un átomo que es capaz de detectarse usando resonancia de plasmón superficial. Entre los marcadores magnéticos preferidos se incluyen los grupos paramagnéticos que comprenden  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  o lantánidos<sup>+3</sup>. Entre los átomos activos en RMN preferidos se incluyen  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  o lantánidos<sup>+3</sup>.
- 20 **[0027]** El núcleo de la nanopartícula puede ser un núcleo metálico. Preferiblemente, el núcleo metálico comprende Au, Ag o Cu, por ejemplo, una aleación seleccionada entre Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd, Au/Ag/Cu/Pd, Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd o Au/Fe/Cu/Gd.
- 25 **[0028]** En algunas realizaciones, el núcleo de la nanopartícula es magnético. Un núcleo de nanopartícula magnético preferido puede comprender átomos metálicos pasivos y átomos metálicos magnéticos en el núcleo en una proporción de entre aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 2:5. El metal pasivo puede ser, por ejemplo, oro, platino, plata o cobre y el metal magnético es hierro o cobalto.
- 30 **[0029]** En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden poblaciones de una o más nanopartículas como se describe en este documento. En algunas realizaciones, las poblaciones de nanopartículas pueden tener densidades diferentes del mismo ligando o ligandos diferentes unidos al núcleo. En algunos casos, puede ser deseable encapsular las nanopartículas para permitir la administración de diversas nanopartículas a un sitio diana. Las tecnologías de encapsulación adecuadas son bien conocidas por los expertos en la materia. La población encapsulada de nanopartículas puede ser de uno, dos, tres o diversos tipos diferentes. En una realización preferida, la composición comprende las nanopartículas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 **[0030]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una nanopartícula como se describe en este documento. Convenientemente, el procedimiento comprende la conjugación de los ligandos con el núcleo de la nanopartícula derivatizando el ligando con un enlazador e incluyendo el ligando derivatizado en una mezcla de reacción a partir de la cual se sintetiza la nanopartícula. Durante el autoensamblaje de las nanopartículas, los núcleos de la nanopartícula se unen al ligando a través del enlazador. El enlazador puede comprender un grupo tiol, un grupo alquilo, un grupo glicol o un grupo peptídico. Un ejemplo de grupo enlazador está representado por la fórmula general  $HO-(CH_2)_n-S-S-(CH_2)_m-OH$  en la que n y m son independientemente entre 1 y 5. Cuando se sintetizan las nanopartículas, el -S-S- del enlazador se rompe para formar dos enlazadores tio que pueden unirse covalentemente cada uno al núcleo de la nanopartícula a través de un grupo -S-. En realizaciones preferidas, el grupo enlazador comprende alquilo C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13 o C15 y/o glicol C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13 o C15. El enlazador puede ser un enlazador mixto, por ejemplo, hexaetilenglicol-alquilo C11.
- 40 **[0031]** Enlazadores diferentes pueden controlar si el péptido se libera o se mantiene unido a la nanopartícula. Por ejemplo, los ligandos pueden modificarse por ingeniería genética para incluir un sitio de escisión, por ejemplo, incluyendo un motivo peptídico que pueda ser reconocido y escindido *in vivo*. Un ejemplo de esto son los aminoácidos FK, un sitio de escisión de catepsina.
- 45 **[0032]** En una realización, las nanopartículas que tienen núcleos que comprenden átomos de oro pueden sintetizarse usando el primer protocolo descrito en el documento WO 02/32404 en el que se emplean enlazadores
- 50

disulfuro para derivatizar los ligandos y los ligandos derivatizados reaccionan con H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (ácido tetracloráurico) en presencia de agente reductor para producir las nanopartículas. En este procedimiento, el ligando disulfuro protegido en metanol o agua puede añadirse a una solución acuosa de ácido tetracloroáurico. Un agente reductor preferido es borohidruro de sodio. Estas y otras características del procedimiento se describen en el documento WO 02/32404.

5

**[0033]** En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona nanopartículas como se describen en este documento para su uso en tratamiento preventivo o paliativo y, especialmente, para el tratamiento o profilaxis de la infección. En particular, las nanopartículas pueden ser para su uso como vacuna.

10 **[0034]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona nanopartículas como las descritas en este documento para tratar una infección, como una infección bacteriana, vírica o parasitaria. A continuación se proporcionan ejemplos de estas enfermedades y afecciones infecciosas.

15 **[0035]** En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de las nanopartículas definidas anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección que mejora con la administración de las nanopartículas. Por ejemplo, las nanopartículas descritas en este documento o sus derivados pueden formularse en composiciones farmacéuticas y administrarse a pacientes en diversas formas, en particular para tratar afecciones mejoradas por la administración de un antígeno.

20 **[0036]** También se proporciona el uso de nanopartículas de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas. El patógeno que causa la enfermedad puede ser vírico, bacteriano o parasitario.

25 **[0037]** A continuación se describen ejemplos de usos específicos que pueden ser tratados según la presente invención junto con otras aplicaciones de nanopartículas, usos tanto *in vitro* como *in vivo*.

**[0038]** Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora a modo de ejemplo y no de limitación con referencia a las figuras acompañantes.

### 30 **Breve descripción de las figuras**

**[0039]**

35 En la **Figura 1** se muestra un diagrama esquemático de un ejemplo de una nanopartícula para su uso en la inmunización frente a la gripe aviar. Los ligandos son:

Glc = glucosa  
 GlcNAc = n-acetilglucosamina  
 TT = toxina tetánica (péptido T colaborador promiscuo)  
 40 H5 = antígeno peptídico del virus de la gripe aviar  
 N1 = antígeno peptídico del virus de la gripe aviar  
 M = antígeno de la malaria  
 Adj = señal lipídica de peligro

45 En la **Figura 2** se muestran las estructuras de los ligandos individuales mostrados esquemáticamente en la Figura 1.

50 **2a** Glc = glucosa  
**2b** GlcNAc = n-acetilglucosamina  
**2c** TT = toxina tetánica (péptido T colaborador promiscuo)  
**2d** N1 = antígeno peptídico del virus de la gripe aviar  
**2e** H5 = antígeno peptídico del virus de la gripe aviar  
**2f** M = antígeno de la malaria  
**2g** Adj = señal lipídica de peligro

### 55 **Descripción detallada**

#### Nanopartículas

**[0040]** Las nanopartículas son partículas pequeñas, por ejemplo, agrupamientos de átomos metálicos o

semiconductores, que pueden ser utilizados como sustrato para ligandos inmovilizados. Pueden prepararse usando la metodología incluida en los documentos WO 02/32404 y WO 2004/108165.

- [0041]** Las nanopartículas de la invención son solubles en la mayoría de los solventes orgánicos y, especialmente, en agua. Esto puede usarse en su purificación y, de manera importante, significa que pueden usarse en solución para presentar el ligando inmovilizado sobre la superficie de la partícula. El hecho de que las nanopartículas sean solubles tiene la ventaja de que los ligandos se presentan en una conformación natural. Para las aplicaciones terapéuticas, las nanopartículas no son tóxicas, son solubles y estables en condiciones fisiológicas.
- 10 **[0042]** Preferiblemente, las nanopartículas tienen núcleos con diámetros medios de entre 0,5 y 50 nm, más preferiblemente entre 0,5 y 10 nm, más preferiblemente entre 0,5 y 5 nm, más preferiblemente entre 0,5 y 3 nm y, aún más preferiblemente, entre 0,5 y 2,5 nm. Cuando se consideran los ligandos además de los núcleos, preferiblemente el diámetro medio total de las partículas es de entre 5 y 100 nm, más preferiblemente entre 5 y 50 nm y, lo más preferible, entre 10 y 30 nm. El diámetro medio puede medirse usando técnicas bien conocidas en la materia como un microscopio electrónico de transmisión.
- 15 **[0043]** El material del núcleo puede ser un metal o un semiconductor y puede estar formado por más de un tipo de átomos. Preferiblemente, el material del núcleo es un metal seleccionado entre Au, Fe o Cu. Los núcleos de la nanopartícula también pueden formarse a partir de aleaciones como Au/Fe, AuCu, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd y Au/Fe/Cu/Gd y pueden ser utilizados en la presente invención. Los materiales del núcleo preferidos son Au y Fe, siendo el material más preferido el Au. Los núcleos de las nanopartículas comprenden preferiblemente entre aproximadamente 100 y 500 átomos (p. ej., átomos de oro) para proporcionar diámetros del núcleo en el intervalo de nanómetros. Otros materiales del núcleo especialmente útiles están mezclados con uno o más átomos que son activos en RMN, lo que permite que las nanopartículas se detecten usando RMN, tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre los ejemplos de átomos activos en RMN se incluyen  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  y lantánidos<sup>+3</sup> o los puntos cuánticos descritos en otra parte de este solicitud.
- 20 **[0044]** Los núcleos de nanopartículas que comprenden átomos de semiconductor pueden detectarse como cristales semiconductores a escala nanométrica y son capaces de actuar como puntos cuánticos, es decir, que pueden absorber la luz excitando de este modo a los electrones en los materiales a niveles energéticos superiores, liberando posteriormente fotones de luz a frecuencias características del material. Un ejemplo de material de un núcleo semiconductor es seleniuro de cadmio, sulfuro de cadmio y telurio de calcio. También se incluyen los compuestos de cinc como el sulfuro de cinc.
- 30 **[0045]** En algunas realizaciones, el núcleo de las nanopartículas puede ser magnético y comprender átomos metálicos magnéticos, opcionalmente en combinación con átomos metálicos pasivos. A modo de ejemplo, el metal pasivo puede ser oro, platino, plata o cobre y el metal magnético puede ser hierro o gadolinio. En realizaciones preferidas, el metal pasivo es oro y el metal magnético es hierro. En este caso, convenientemente, la proporción de átomos metálicos pasivos con respecto a átomos metálicos magnéticos en el núcleo está entre aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 2:5. Más preferiblemente, la proporción es de aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 5:1. Según se usa en este documento, el término "metales pasivos" se refiere a metales que no muestran propiedades magnéticas y son químicamente estables a la oxidación. Los metales pasivos pueden ser diamagnéticos y superparamagnéticos. Preferiblemente, estas nanopartículas son superparamagnéticas.
- 40 **[0046]** Entre los ejemplos de nanopartículas que tienen núcleos que comprenden un metal paramagnético, se incluyen aquellos que contienen  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  y lantánidos<sup>+3</sup>.
- 45 **[0047]** Otras nanopartículas magnéticas pueden estar formadas a partir de materiales como MnFe (ferrita de magnesio) o CoFe (ferrita de cobalto) que pueden formarse como nanopartículas (fluido magnético, con o sin la adición de un material de núcleo adicional como se define anteriormente). Ejemplos de la química de unión para autoensamblaje en la producción de estas nanopartículas se proporcionan en *Biotechnol. Prog.*, 19:1095-100 (2003), *J. Am. Chem. Soc.* 125:9828-33 (2003), *J. Colloid Interface Sci.* 255:293-8 (2002).
- 50 **[0048]** En algunas realizaciones, la nanopartícula de la presente invención o uno o más de sus ligandos comprende un marcador detectable. El marcador puede ser un elemento del núcleo de la nanopartícula o del ligando. El marcador puede ser detectable debido a una propiedad intrínseca de este elemento de la nanopartícula o por estar ligado, conjugado o asociado con un resto adicional que es detectable. Entre los ejemplos de marcadores se incluye un marcador que es un grupo fluorescente, un radionucleido, un marcador magnético o un colorante. Entre los grupos fluorescentes se incluyen fluoresceína, rodamina o tetrametil rodamina, rojo Texas, Cy3, Cy5, etc.,

pueden detectarse mediante excitación del marcador fluorescente y detección de la luz emitida usando espectroscopia de dispersión Raman (Y.C. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin, Science 2002, 297: 1536-1539).

**[0049]** En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden comprender un radionucleido para su uso en la detección de la nanopartícula usando la radioactividad emitida por el radionucleido usando p. ej., PET, SPECT o para terapia, es decir, para matar las células diana. Entre los ejemplos de radionúclidos utilizados normalmente en la técnica que podría adaptarse fácilmente para su uso en la presente invención se incluyen  $^{99m}\text{Tc}$ , que se encuentra en diversos estados de oxidación aunque el más estable es  $\text{TcO}_4^-$ ;  $^{32}\text{P}$  o  $^{33}\text{P}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{67}\text{Cu}$  que a menudo se usa como sales  $\text{Cu}^{2+}$ ;  $^{67}\text{Ga}$  que normalmente se utiliza como sal  $\text{Ga}^{3+}$ , p. ej., citrato de galio;  $^{68}\text{Ge}$ ;  $^{82}\text{Sr}$ ;  $^{99}\text{Mo}$ ;  $^{103}\text{Pd}$ ;  $^{111}\text{In}$  que generalmente se utiliza como sales  $\text{In}^{3+}$ ;  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  que generalmente se utiliza como yoduro sódico;  $^{137}\text{Cs}$ ;  $^{153}\text{Gd}$ ;  $^{153}\text{Sm}$ ;  $^{158}\text{Au}$ ;  $^{186}\text{Re}$ ;  $^{201}\text{Tl}$  utilizado generalmente como sal  $\text{Tl}^+$  como el cloruro de talio;  $^{39}\text{Y}^{3+}$ ;  $^{71}\text{Lu}^{3+}$  y  $^{24}\text{Cr}^{2+}$ . El uso general de radionúclidos como marcadores y trazadores es bien conocido en la materia y podría ser adaptado fácilmente por el experto para su uso en los aspectos de la presente invención. Los radionúclidos pueden emplearse más fácilmente mezclando los núcleos de las nanopartículas o incluyéndolos como marcadores presentes como parte de ligandos inmovilizados en las nanopartículas.

**[0050]** Adicional o alternativamente, las nanopartículas de la presente invención, o los resultados de sus interacciones con otras especies, pueden detectarse usando diversas técnicas bien conocidas en la materia usando un marcador asociado con la nanopartícula como se indica anteriormente o empleando una propiedad de los mismos. Estos procedimientos de detección de nanopartículas pueden ir desde la detección de la agregación que resulta cuando las nanopartículas se unen a otras especies, p. ej., mediante una inspección visual sencilla o usando dispersión de la luz (transmitancia de una solución que contiene las nanopartículas), a usar técnicas sofisticadas como la microscopia de transmisión electrónica (MTE) o microscopia de fuerza atómica (MFA) para visualizar las nanopartículas. Un procedimiento adicional de detección de partículas metálicas es emplear resonancia de plasmón que es la excitación de electrones en la superficie de un metal, normalmente causada por radiación óptica. El fenómeno de resonancia de plasmón superficial (RPS) se produce en la interfaz de un metal (como Ag o Au) y un material dieléctrico como aire o agua. Como los cambios en la RPS tienen lugar cuando los analitos se unen al ligando inmovilizado en la superficie de una nanopartícula cambiando el índice de refracción de la interfaz. Una ventaja adicional de la RPS es que puede usarse para controlar las interacciones en tiempo real. Como se mencionó anteriormente, si las nanopartículas incluyen o están mezcladas con átomos que son activos en RMN, entonces esta técnica puede usarse para detectar las partículas, tanto *in vitro* como *in vivo*, usando técnicas bien conocidas en la materia. Las nanopartículas también pueden detectarse usando un sistema basado en la amplificación cuantitativa de la señal usando la reducción de plata (I) promovida por la nanopartícula. Puede usarse espectroscopia de fluorescencia si las nanopartículas incluyen ligandos como sondas fluorescentes. También puede usarse marcaje isotópico de los hidratos de carbono para facilitar su detección.

**[0051]** Entre los ligandos puede incluirse un componente de hidrato de carbono inerte (p. ej., glucosa) que permite controlar a voluntad la densidad de los antígenos y el vehículo en la construcción final.

#### 40 Agentes infecciosos

**[0052]** En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden incorporar uno o más ligandos adicionales que son capaces de producir una respuesta específica frente a agentes infecciosos diana. A modo de ejemplo, el ligando puede comprender un antígeno, p. ej., un antígeno peptídico, procedente de un agente infeccioso como los virus de la gripe, VIH, tuberculosis o malaria.

**[0053]** En la presente invención, "agente infeccioso" incluye la colonización perjudicial de un organismo hospedador por una especie extraña. Típicamente, el organismo infectante o patógeno busca utilizar los recursos del hospedador para multiplicarse a expensas del hospedador, interfiriendo con el funcionamiento normal del hospedador. Entre los agentes infecciosos se incluye una gama de organismos microscópicos como bacterias, virus, parásitos y hongos. Los antígenos procedentes de antígenos infecciosos son bien conocidos por los expertos en la materia y pueden usarse como ligandos cuando se diseñan y fabrican las nanopartículas de la presente invención.

**[0054]** A modo de ejemplo, la presente invención incluye el uso de nanopartículas que tienen ligandos antigénicos para tratar enfermedades infecciosas víricas como SIDA, complejo relacionado con el SIDA, varicela, resfriado común, infección por citomegalovirus, fiebre transmitida por garrapata de Colorado, fiebre del Dengue, fiebre hemorrágica de Ébola, parotitis epidémica, gripe, enfermedad de las aftas, hepatitis, herpes simple, herpes zóster, papilomavirus humano, gripe, fiebre de lassa, sarampión, fiebre hemorrágica de Marburgo, mononucleosis infecciosa, paperas, poliomielititis, leucenfalopatía multifocal progresiva, rabia, rubéola, síndrome respiratorio agudo



grave (SARS), viruela, encefalitis vírica, gastroenteritis vírica, meningitis vírica, neumonía vírica, enfermedad del Nilo occidental y fiebre amarilla. En una realización preferida, la presente invención está dirigida al tratamiento de la gripe y, en particular, la gripe aviar representada por cepas como las del virus H5N1.

5 **[0055]** A modo de ejemplo, la presente invención incluye el uso de nanopartículas que tienen ligandos antigénicos para el tratamiento y profilaxis de enfermedades infecciosas bacterianas como ántrax, meningitis bacteriana, brucelosis, peste bubónica, campilobacteriosis, cólera, difteria, tífus epidémico, gonorrea, impétigo, enfermedad de Hansen, legionela, lepra, leptospirosis, listeriosis, enfermedad de Lyme, melioidosis, infección por MRSA, nocardiosis, pertusi, neumonía neumocócica, psitacosis, fiebre Q, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas  
10 (RMSF), salmonelosis, escarlatina, shigelosis, sífilis, tétano, tracoma, tuberculosis, tularemia, fiebre tifoideas, tífus y tos ferina.

**[0056]** A modo de ejemplo, la presente invención incluye el uso de nanopartículas que tienen ligandos antigénicos para el tratamiento y profilaxis de enfermedades infecciosas parasitarias como tripanosomiasis africana, amebiasis,  
15 infección amoebica, ascariasis, babesiosis, enfermedad de Chagas, clonorquiasis, criptosporidiosis, cisticercosis, difilobotriasis, dracunculiasis, equinococosis, enterobiasis, fascioliasis, fasciolopsiasis, filariasis, giardiasis, gnatostomiasis, himenolepiasis, isosporiasis, kala-azar o leishmaniasis visceral, leishmaniasis, malaria, metagonimiasis, miasis, oncocercosis, pediculosis, sarna, esquistosomiasis, teniasis, toxocariasis, toxoplasmosis, triquinelosis, triquinosis, tricuriasis y tripanosomiasis.

20 **[0057]** A modo de ejemplo, la presente invención incluye el uso de nanopartículas que tienen ligandos antigénicos para tratar enfermedades infecciosas fúngicas como aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, coccidioidomicosis, criptococosis, histoplasmosis y tiña del pie.

25 **[0058]** A modo de ejemplo, la presente invención incluye el uso de nanopartículas que tienen ligandos antigénicos para tratar enfermedades infecciosas priónicas como encefalopatía espongiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y kuru.

#### Gripe

30 **[0059]** Las vacunas de nanopartículas descritas en este documento pueden ser especialmente útiles para la profilaxis y/o tratamiento de la gripe, p. ej., la gripe aviar como la cepa H5N1. Se presentan múltiples opciones por sí mismas para el uso de las nanopartículas descritas en este documento, aunque pueden clasificarse en dos áreas básicas, tratamiento y prevención.

35 **[0060]** Las vacunas de nanopartículas podrían diseñarse como se describe en este documento. Podrían probarse nanopartículas con péptidos cortos de regiones proteicas externas probablemente conservadas como la proteína H, N y, posiblemente, la M2. Aunque podrían emplearse secuencias peptídicas sencillas, se prefiere el uso de secuencias múltiples de 2-3 proteínas de superficie principales para mejorar los cambios de una vacunación eficaz.  
40 Estas secuencias peptídicas pueden requerir revisión anual en su mayor parte de la misma forma que las actuales vacunas de la gripe debido a la deriva antigénica, pero su naturaleza completamente sintética podría hacer que su producción sea más fácil y rápida que las actuales técnicas *in vivo*.

#### *Virus de la gripe*

45 **[0061]** Existen tres serotipos del virus de la gripe: A, B y C. Los virus de la gripe A se clasifican además en subtipos basados en los antígenos de superficie, neuraminidasa (N) y hemaglutinina (H). Adicionalmente, las cepas se clasifican por la localización geográfica de su primer aislamiento, número de serie y año de aislamiento. Los virus de la gripe A y B causan la mayoría de las enfermedades clínicas. La gripe A aparece con mayor frecuencia y es  
50 más virulenta. Es responsable de la mayoría de las principales epidemias y pandemias. La gripe B a menudo cocircula con la gripe A durante los brotes anuales. Generalmente, la gripe B causa menos enfermedades clínicas graves, aunque puede seguir siendo responsable de los brotes. La gripe C normalmente causan una infección leve o asintomática similar a un resfriado común.

55 **[0062]** El virus de la gripe está compuesto de una membrana lipídica que rodea a una cubierta proteica y a un núcleo de moléculas de ARN independientes. Hay tres proteínas embebidas en la membrana lipídica de los virus de la gripe de tipos A y B; dos glucoproteínas que actúan como el determinante antigénico principal de los virus de la gripe de tipos A y B (antígeno N y antígeno H) y una proteína de canal de membrana pequeña. La neuraminidasa facilita la liberación de nuevos viriones a partir de células hospedadoras infectadas, mientras que la hemaglutinina

facilita la entrada del virus en las células epiteliales respiratorias. El canal de membrana del virus de la gripe A se conoce como la proteína M2 y en el virus de la gripe B se conoce como la proteína NB. Las diferencias en la estructura del canal de membrana se asocian con susceptibilidad diferente frente al agente antiviral amantadina.

- 5 **[0063]** El virus de la gripe se une a las células epiteliales de las vías respiratorias superiores e inferiores, invade la célula hospedadora y, a continuación, se reproduce usando a esta. Los viriones se liberan cuando la célula hospedadora se lisa. Las brechas posteriores en el epitelio respiratorio dan lugar a un aumento de la susceptibilidad a la infección vírica y bacteriana secundaria.

10 *Vacunas frente al virus de la gripe*

**[0064]** Hay dos tipos de vacunas que protegen frente a la gripe. La bien conocida "vacuna antigripal" es una vacuna inactivada (que contiene virus muertos) que se administra con una aguja, normalmente en el brazo. Un tipo de vacunas diferente, conocidas como las vacunas antigripales de tipo aerosol nasal (denominadas en ocasiones como LAIV por las siglas en inglés de la expresión vacuna de virus de la gripe vivos atenuados) se aprobó en 2003. La vacuna antigripal de tipo aerosol nasal contiene virus vivos atenuados (debilitados) y se administra mediante un aerosol nasal. Está aprobada para su uso sólo entre personas sanas de edades comprendidas entre 5 y 49 años. La vacuna antigripal está aprobada para su uso en todas las personas de más de 6 meses de edad, incluyendo personas sanas y aquellas con afecciones médicas crónicas.

20 **[0065]** Cada una de las dos vacunas contiene tres virus de la gripe, representando a uno de los tres grupos de virus que circulan entre personas en un determinado año. Cada una de las tres cepas de vacunas en ambas vacunas, por ejemplo; un virus A (H3N2), un virus A (H1N1) y un virus B que son representativos de las cepas de vacunas de la gripe están recomendadas para este año. Los virus de ambas vacunas se crecen en huevos de gallinas. Todas las vacunas antigripales actuales, con la excepción de las enumeradas a continuación y las experimentales, son virus enteros atenuados. Hay dos razones principales para que se usen virus enteros; existen muchas mutaciones/cambios que ocurren en las proteínas de la cubierta N/H de la gripe durante una epidemia, una mutación única puede hacer que las vacunas del año en curso sean inútiles, se piensa que serían necesarias muchas mutaciones para que las vacunas de virus enteros no sirvan y los péptidos secundarios no son muy inmunogénicos.

*Fármacos antigripales utilizados contra la gripe*

35 **[0066]** Hay muy pocos tratamientos que funcionen con los virus, aquellos que funcionan en el caso de la gripe tienen que ser administrados en las primeras 48 horas de inicio del ataque, a menudo si es posible antes de estar absolutamente seguros del diagnóstico, estos sólo acortan y reducen la gravedad de la afección. La prevención con las vacunas antigripales es la mejor opción.

40 **[0067]** En la actualidad hay tres tratamientos antigripales aprobados para su uso en el Reino Unido: amantidina (Synmetrel, Lysovir) y oseltamivir (Tamiflu), ambos se toman por vía oral y zanamivir (Relenza), que se proporciona como un polvo que se inhala. Oseltamivir y zanamivir son inhibidores de la neuraminidasa y se aprueban para el tratamiento de los dos tipos principales de gripe en seres humanos (tipo A y tipo B). Amantidina y su derivado rimantadina tienen la ventaja de ser más baratas, pero sólo funcionan con la gripe de tipo A.

45 **[0068]** Una vez que las nuevas partículas víricas se forman, abandonan la célula epitelial y se dispersan a otras células, donde se repite el proceso infeccioso. La enzima de superficie que permite que los nuevos virus abandonen las células, permitiendo entonces que la infección se extienda a las células vecinas de las vías respiratorias, es la neuraminidasa vírica. Esta acción enzimática es bloqueada por zanamivir y oseltamivir. Sin la neuraminidasa, el virus es incapaz de extenderse a otras células y a los subsitios de infección.

50 **[0069]** La amantidina se clasifica como un bloqueante del canal iónico M2, no se receta con frecuencia debido al rápido desarrollo de variantes de la gripe resistentes al fármaco y al hecho de que no tiene actividad frente a la gripe de tipo B.

55 *Directrices clínicas actuales*

**[0070]** Ninguno de estos fármacos (amantidina, oseltamivir y zanamivir) se recomienda para el tratamiento o prevención de la gripe en niños o adultos a no ser que pertenezcan a grupos de riesgo. Tanto oseltamivir como zanamivir están recomendados para el tratamiento de adultos en riesgo que pueden iniciar el tratamiento durante las

primeras 48 horas de inicio de los síntomas. Oseltamavir también está recomendado para el tratamiento de niños en riesgo que pueden iniciar el tratamiento durante las primeras 48 horas de inicio de los síntomas. La amantidina no está recomendada para el tratamiento o prevención de la gripe.

## 5 Administración y tratamiento

**[0071]** Las composiciones de nanopartículas de la invención pueden administrarse a pacientes mediante cualquiera de las diferentes vías, incluyendo las vías enteral o parenteral. La administración parenteral incluye la administración por las siguientes vías: intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal y tópica (incluyendo dérmico, ocular, rectal, nasal, inhalación y aerosol) y vías sistémicas rectales.

**[0072]** La administración se realiza, p. ej., mediante inyección, o balísticamente usando una pistola de administración para acelerar su paso transdérmico a través de la capa más externa de la epidermis. A continuación, las nanopartículas pueden ser captadas p. ej., por células dendríticas, que maduran al tiempo que migran a través del sistema linfático, lo que tiene como resultado la modulación de la respuesta inmunitaria y la vacunación frente al antígeno. Las nanopartículas también pueden administrarse en aerosoles. Esto se hace posible debido al pequeño tamaño de las nanopartículas.

**[0073]** El tamaño excepcionalmente pequeño de las nanopartículas de la presente invención es una gran ventaja para su administración a células y tejidos, ya que pueden ser captadas por las células incluso cuando están unidas a moléculas de reconocimiento o terapéuticas.

**[0074]** Las nanopartículas de la invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas que pueden estar en las formas de composiciones sólidas o líquidas. Estas composiciones comprenderán generalmente un vehículo de determinado tipo, por ejemplo, un vehículo sólido como gelatina o un adyuvante o un diluyente inerte, o un vehículo líquido como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, o glicoles como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Estas composiciones y preparaciones generalmente contienen al menos el 0,1% en peso del compuesto.

**[0075]** Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el lugar de la dolencia, el principio activo estará en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que no contenga pirógenos y tenga el pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia están bien capacitados para preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, soluciones de los compuestos o un derivado de los mismos, p. ej., en solución salina fisiológica, una dispersión preparada con glicerol, polietilenglicol líquido o aceites.

**[0076]** Además de uno o más de los compuestos, opcionalmente en combinación con otro principio activo, las composiciones pueden comprender uno o más de entre un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador, agente isotonzante, conservante o antioxidante, u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la materia. Estos materiales deberían no ser tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, p. ej., por vía oral o parenteral.

**[0077]** Las composiciones farmacéuticas líquidas se formulan típicamente para que tengan un pH de entre aproximadamente 3,0 y 9,0; más preferiblemente entre aproximadamente 4,5 y 8,5 y, aún más preferiblemente, entre aproximadamente 5,0 y 8,0. El pH de una composición puede mantenerse mediante el uso de un tampón como acetato, citrato, fosfato, succinato, Tris o histidina, empleando típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 50 mM. El pH de las composiciones puede ajustarse por otro lado usando ácidos o bases fisiológicamente aceptables.

**[0078]** Generalmente, los conservantes se incluyen en las composiciones farmacéuticas para retrasar el crecimiento microbiano, extendiendo la vida de las composiciones y permitiendo el uso múltiple de la presentación. Entre los ejemplos de conservantes se incluyen fenol, metacresol, alcohol de bencilo, ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetronio. Típicamente, los conservantes se emplean en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1,0% (p/v).

**[0079]** Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran a un individuo en una cantidad profilácticamente eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz (según sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse tratamiento), siendo esto suficiente para que se muestre un beneficio para el individuo. Típicamente,

esto causará una actividad terapéuticamente útil proporcionando beneficio al individuo. La cantidad real de los compuestos administrada y la proporción y transcurso de la administración dependerán de la naturaleza y gravedad de la afección que se está tratando. La prescripción del tratamiento, p. ej. las decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos de medicina general y de otros médicos, y típicamente considera los trastornos que están siendo tratados, la afección del paciente individual, el sitio de administración, el procedimiento de administración y otros factores conocidos por los médicos. Pueden encontrarse ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª Edición (eds. M. Ash y I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE.UU.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, pub Lippincott, Williams & Wilkins y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994. A modo de ejemplo, y las composiciones se administran preferiblemente a pacientes en dosis de entre aproximadamente 0,01 y 100 µg de principio activo por kg de peso corporal y, más preferiblemente, entre aproximadamente 0,5 y 10 µg/kg de peso corporal.

**[0080]** Las composiciones de las nanopartículas de la presente invención pueden usarse como vacunas. En la presente invención, el término "vacunación" incluye una inmunización activa, es decir, una inducción de una respuesta inmunitaria específica debido a la administración, p. ej. por las vías subcutánea, intradérmica, intramuscular, oral o nasal, de pequeñas cantidades de un antígeno que es reconocido por el individuo vacunado como extraño y es, por tanto, inmunogénico en una formulación adecuada. Por tanto, el antígeno se usa como "detonante" de la respuesta inmunitaria para construir una respuesta inmunitaria específica frente al antígeno. La vacunación puede ser terapéutica o profiláctica.

#### Experimental

##### *Vacunas de nanopartículas*

**[0081]** Los reactivos  $\text{HAuCl}_4$  y  $\text{NaBH}_4$  para producir las nanopartículas pueden obtenerse de la compañía química Aldrich. Para todos los experimentos y soluciones, puede usarse agua Nanopure (18,1 mΩ). Las nanopartículas descritas en este documento pueden prepararse usando la metodología descrita en los documentos WO 02/32404 y WO 2004/108165. Los diámetros medios de estas construcciones pueden determinarse usando un microscopio electrónico de transmisión (MET).

**[0082]** La preparación y caracterización de nanopartículas cargadas con los ligandos que incluye (a) un primer ligando que comprende un antígeno de hidratos de carbono capaz de estimular una respuesta inmunitaria innata, (b) un segundo ligando que comprende un péptido de célula T colaboradora y (c) un tercer ligando que comprende una señal de peligro es como sigue. Las nanopartículas pueden incluir también ligandos de glucosa y, opcionalmente, también uno o más ligandos adicionales que sean capaces de producir una respuesta específica frente a un agente infeccioso diana. La selección de antígenos adecuados para desarrollar las respuestas inmunitarias frente a la gripe aviar y, en especial, frente a la cepa H5N1, se describe a continuación.

**[0083]** Los ligandos de hidratos de carbono, bien los ligandos de glucosa o el primer ligando que comprende un antígeno de hidratos de carbono capaz de estimular una respuesta inmunitaria innata (GlnAc), pueden incorporarse en las nanopartículas usando un espaciador alifático  $\text{C}_{2-5}$  para unir los ligandos a la superficie de oro.

**[0084]** Otros ligandos, como el ligando del péptido T colaborador o la señal de peligro (la endotoxina marcada como "Adj" en la Figura 1) pueden prepararse uniendo las especies relevantes usando un espaciador alifático  $\text{C}_{11}$ , p. ej., el epítipo del péptido de células T promiscuo (FKLQTMVKLFNRIKNNVA) del toxoide tetánico a través del grupo aminoterminal a un espaciador alifático  $\text{C}_{11}$ .

**[0085]** Pueden obtenerse espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las soluciones de las nanopartículas a 500 MHz para identificar señales inequívocamente pertenecientes a los componentes individuales del ligando y confirmar que la intensidad de estas señales se corresponde con las previstas según la proporción de los diferentes ligandos en la solución original. Tras diluir con metanol, las gluconanopartículas pueden purificarse repetidamente mediante filtración por centrifugación.

**[0086]** Se diseñó una nanopartícula para la vacunación profiláctica o terapéutica frente a la cepa H5N1 de la gripe aviar. La nanopartícula tiene un núcleo metálico, p. ej., formado por átomos de oro, y se produce mediante autoensamblaje de ligandos tiolados. La nanopartícula tiene una corona de ligandos de glucosa (Glc, Figura 1) que ayuda a hacer invisibles al sistema inmunitario a las partes de esta distintas a los cuatro ligandos descritos a continuación. El primer ligando comprende restos del azúcar N-acetilglucosamina (GlnAc, Figura 1) para hacer que

la nanopartícula se parezca a un fragmento bacteriano para estimular la respuesta inmunitaria innata del sistema de reconocimiento basado en hidratos de carbono que normalmente tienen como resultado la lectinofagocitosis de la bacteria o levadura (véase Rademacher y col., Capítulo 11, Abnormalities in IgG Glycosylation and Immunological Disorders, Ed. Isenberg & Rademacher, John Wiley, 1996, pág. 221-252). El segundo ligando es un péptido T colaborador y se muestra en la Figura 1 como "TT" y, en este ejemplo, es una secuencia peptídica promiscua de la toxina tetánica. El tercer ligando es la señal de peligro que se muestra en la Figura 1 como "Adj" y es un ligando lipídico como se muestra en la Fig. 2g. El cuarto tipo de ligandos comprende péptidos antigénicos de la cepa H5N1 de la gripe aviar (H5 y N1 en la Figura 1). La vacuna de nanopartículas también puede ser polivalente incluyendo diferentes ligandos antigénicos, p. ej., en la Figura 1 se incluyen los epítopes de la malaria (M). Los cuartos ligandos pueden comprender epítopes de células B o de células T, o de ambas, deducidos del agente infeccioso frente al que va dirigida la vacuna.

#### *Identificación de epítopes antigénicos de la gripe aviar*

15 **[0087]** Las secuencias completas de las proteínas de la cepa H5N1 de la gripe se proporcionan en Puthavathana y col., "Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand", J. Gen. Virol. 86 (Parte 2): 423-433, (2005), (PUBMED [15659762](#)). Esta secuencia puede usarse como se describe en este documento o usando otras técnicas bien conocidas en la materia para encontrar secuencias peptídicas adecuadas para su uso como ligandos según las vacunas de nanopartículas de la presente invención.

20 **[0088]** Se analizaron las secuencias de A/Tailandia/2(SP-33)/2004(H5N1), que se aislaron de un niño de 7 años, en busca de secuencias peptídicas antigénicas para su uso como ligandos en las vacunas de nanopartículas de la presente invención. Los aminoácidos del sitio de unión al receptor HA de esta y otras cepas están muy conservados y son 91 Y, 130-34 GVSSA, 149 W, 151 I, 179 H, 186 E, 190-1 LY y 220-25 NGQSGR que aparecen subrayados en la secuencia de la Figura 3 y en las secuencias peptídicas siguientes. Esta secuencia incluye la secuencia líder 16  $\alpha$  (negrita), la numeración anterior procede de la proteína real a la que se ha quitado la secuencia líder, por tanto, se añade 16 para relacionarla con la secuencia siguiente: Q6Q791 de SWISSPROT.

30 **[0089]** Cuando se están intentado dirigirse a regiones para vacunas a base de anticuerpos, son dianas útiles los aminoácidos del sitio de unión al receptor HA, ya que los anticuerpos no sólo pueden aclarar la carga viral sino que también se unen a los hospedadores además de ser secuencias muy conservadas. Se usó el programa Abie Pro 3.0 para seleccionar péptidos antigénicos de HA, con una longitud mínima de 10 aminoácidos, alta especificidad, evitando aminoácidos CHM, aminoácidos unidos a N y sitios cinasa. Esto encontró:

YIVEKANPVNDL  
 YPGDFNDYEEL  
 EKIQIIPKSS  
 PYQGKSSFFRNV  
 PNDAAEQTKLYQ  
 STLNQRLVPR  
 LKPNDAINFESNGNFIA  
 ESNGNFIAPEYA  
 APEYAYKIVKKG DSTI  
 SNEQGGGYAAA  
 AVGREFNNLER  
 DSNVKNLYDKVRLQ  
 EARLKREEISGVKLESI

35

**[0090]** A continuación se presentan posibles oligómeros de 10 aminoácidos que incluyen  $\alpha$  implicados en el sitio de unión a HA con la hidrofobicidad del péptido dada entre paréntesis.

**[0091]** En estos dos péptidos, algunos de los aminoácidos están parcialmente escondidos en la estructura de HA.

40

YPGDFNDYEE (0.5) 107-116 localizado en el sitio de la cabeza.  
 DAAEQTKLYQ (0.4) 199-208 próximo a la parte superior de la cabeza.

**[0092]** Además, los siguientes dos oligómeros de 10 aminoácidos se identificaron como próximos a los segmentos lineales expuestos en la cabeza de HA usando AstexViewer en SWISSPROT 3D.

RIATRSKVNG (0.5) 228-237  
 NDAINFESNG (0.2) 252-261

5

**[0093]** Los péptidos antigénicos también pueden determinarse usando el procedimiento de Kolaskar y Tongaonkar (1990), FEBS lett. 1990 dic. 10, 276 (1-2):172-4. Las predicciones se basan en una tabla que refleja la aparición de restos de aminoácidos en epítopes segmentarios experimentalmente conocidos. Los segmentos se presentan sólo si tienen un tamaño mínimo de 8 restos. La precisión presentada del procedimiento es de aproximadamente el 75%.

10

**[0094]** Esto permitió encontrar 22 péptidos candidatos (véase la Tabla 1) de los que muchas de las secuencias eran principalmente internas y, por tanto, no eran dianas adecuadas. Otros pertenecen a HA2 y, probablemente, son dianas difíciles o malas al estar en las regiones de la cola, transmembrana o citosólica. El procedimiento sugería una sección del péptido 2 DLDGVKPLIL, que está arriba en la cola HA, que es un posible candidato a diana, el péptido 6 EKIQIIPKSS se ha alargado a un oligómero de 10 aminoácidos mediante la adición de SS que aparece en el sitio más inferior/medio de la cabeza de HA, el péptido 12 STLNQRLVPR parece el mejor situado en la parte superior/media de la cabeza y, esencialmente, es completamente externo y se le añadió ST para obtener un oligómero de 10 aminoácidos- Por tanto, mediante este procedimiento, se seleccionaron tres péptidos que se presentan en orden de preferencia empezando por el primero:

20

STLNQRLVPR 219-228 (0.1)	
EKIQIIPKSS 128-137 (0.4)	
DLDGVKPLIL 59-68 (0.0)	

**[0095]** Observe que LIL es una cola muy hidrofóbica que hace a la secuencia menos atractiva ya que puede ser difícil de sintetizar mediante técnicas químicas.

25

**[0096]** En resumen, la selección de oligómeros de 10 aminoácidos mediante los tres criterios diferentes encuentra que, si tiene que sintetizarse sólo un péptido de cada uno de los tres grupos, se sugiere que se elijan aquellos marcados con \* debido principalmente a sus posiciones y propiedades fisicoquímicas. No se han incluido posibles aminoácidos de escisión/unión.

30

**[0097]** Se usó una búsqueda Short Blast para comprobar la presencia de secuencias similares en proteínas humanas y no se encontraron coincidencias completas, sin embargo, todos los péptidos proporcionaron valores bajos de puntuaciones coincidentes (como se muestra a continuación).

YPGDFNDYEE	(0,5)	107-116	(puntuación máxima en la búsqueda Blast 26,9 máx 5 aa)
DAAEQTKLYQ	(0,4)	199-208*	(23,1 varios 5 aa)
RIATRSKVNG	(0,5)	228-237	(21,4 varios 6 aa)
NDAINFESNG	(0,2)	252-261*	(25,7 principalmente 4 aa)
STLNQRLVPR	(0,1)	219-228*	(24,4 algunos 6 aa)
EKIQIIPKSS	(0,4)	128-137	(24 algunos 6 aa)
DLDGVKPLIL	(0,0)	59-68	(22,7 algunos 6 aa)

35

**[0098]** Finalmente, usando la herramienta de alineamiento SIM para las secuencias HA de una cepa H5N1 de Escocia en 1959 (P09345) y la secuencia de 2004 (Q6Q791), se realizó una selección de secuencias peptídicas conservadas o muy mutadas para comprobar y determinar si los péptidos seleccionados mediante los criterios anteriores eran propensos a mutación. A continuación se muestran las numeraciones y posiciones de las mutaciones (en negrita).

40

YPGDFNDYEE	0
DAAEQTKLYQ	0
RIATRSKVNG	2
NDAINFESNG	0
STLNQRLVPR	3
EKIQIIPKSS	2
DLDGVKPLIL	2

**[0099]** Dado los criterios previos establecidos anteriormente, estos datos resaltan la idoneidad de los péptidos DAAEQTKLYQ y NDAINFESNG, aunque sugieren que quizás pueda incluirse YPGDFNDYEE en lugar de 5 STLNQRLVPR.

**[0100]** Con respecto a la neuraminidasa, son posibles los siguientes péptidos aunque, como no se ha analizado la estructura 3D, es menos seguro que las regiones sean completamente externas.

247-258 EKGRVVKVEL

308-320 GVFGDNPRPNDG

10 412-422 VELIRGRPKE

*Identificación de péptidos humanos de unión a MHC I de alta afinidad a partir de proteínas SP33 de H5N1*

**[0101]** También se llevó a cabo un estudio para identificar los péptidos de unión a MHC I en las proteínas SP33 de 15 H5N1. Se usó todo el tiempo el motor de búsqueda RANKPEP, localizado en:

20 <http://www.mifoundation.org/Tools/rankpep.html>. La inmunogenicidad del epítipo de células T depende de varios factores: (1) procesamiento apropiado y eficaz de un péptido desde su fuente proteica, (2) unión estable del péptido a la molécula de MHC y (3) la capacidad del TCR para reconocer el péptido unido a MHC. Es necesario el modelado por ordenador de estos tres procesos para una predicción exacta de los epítopos de células T. Normalmente sólo se ha considerado un péptido de unión a MHC, y el procesamiento de péptidos de epítopos restringidos a la clase I de MHC, en los algoritmos de predicción de epítopos. RANKPEP también tiene un modelo predictivo para el reconocimiento inmunodominante de péptidos por el TCR pero en este estudio esta opción no era útil.

25 **[0102]** El extremo C-terminal de los péptidos restringidos a MHC I se genera mediante el proteosoma, RANKPEP puede determinar si el extremo C-terminal de los enlazadores MHC I-péptido previstos es el resultado de la escisión proteosómica, solo estos péptidos se incluyen a continuación. Las secuencias proporcionadas a continuación son de los tres mejores péptidos de unión (si procede) por encima del umbral de unión, se prevé que todos ellos se 30 produzcan mediante escisión proteosómica del extremo C-terminal.

**[0103]** Se espera que concentrándose en los 5 supertipos de HLA: A2, A3, A24, B7 y B15 se cubrirá más del 95% de la población humana considerando todas las posibles variaciones fenotípicas. A continuación se muestran los 35 supertipos individuales:

A2: A\*0201, A\*0202, A\*0203, A\*0205, A\*0206, A\*0207, A6802  
 A3: A\*0301, A\*1101, A\*3101, A\*3301, A\*6801, A\*6601  
 A24: A\*2402, B\*3801  
 B7: B\*0702, B\*3501, B\*5101, B\*5102, B\*5301, B\*5401  
 B15: A\*0101, B\*1501\_B62, B1502

**[0104]** Cuando con el supertipo de HLA no se consiguió proporcionar ningún péptido para una proteína específica, también se comprobaron, por ejemplo, véase a continuación HLA A24. Esto debería reconocerse aunque si, por 40 ejemplo, cuando el péptido MP1 HLA-A2402 se incluyó en una vacuna mixta teórica, la cobertura de la población pude verse reducida a un % un poco menor en comparación con un péptido completamente positivo supertipo HLA

A24.

*Selección de péptidos*

5 **[0105]** La selección de péptidos se realizó en función de la unión a HLA, la hidrofobicidad de los péptidos y una búsqueda en BLAST para determinar si cualquiera de las secuencias aparecía en el hombre. Estos estudios pueden usarse para decidir si utilizar los péptidos de una única proteína en un agente infeccioso o una mezcla de péptidos, p. ej., de proteínas diferentes. Sin embargo, las técnicas recogidas en este documento para la identificación de los péptidos pueden ser adaptadas por el experto en la materia según sea necesario en una situación determinada. En el estudio realizado a continuación, las proteínas de H5N1 utilizadas fueron MP1, ya que es un componente principal del virión, y HA, NA y BP1.

15 **[0106]** Los péptidos con puntuaciones más elevadas para la unión a HLA se obtuvieron mediante otro programa "EpiGen" (<http://www.jenner.ac.uk/EpiJen/>); este programa tiene algoritmos adicionales que ayudan a refinar más los péptidos seleccionados, sin embargo, la especificidad del alelo está más restringida que en el programa RANKPEP, por lo que se ha utilizado como una herramienta secundaria de selección.

20 **[0107]** A continuación, las búsquedas Blast se realizaron con estos péptidos para determinar si alguna de estas secuencias virales aparecía de forma natural en humanos. En las búsquedas Blast se usó el sitio NCBI y la base de datos "nr", la matriz PAM 30 (péptidos cortos) y la búsqueda se restringió a *Homo sapiens*. Idealmente, los péptidos candidatos deberían tener puntuaciones bajas y valores de E altos, los valores de coincidencia mayores para cada uno de los péptidos anteriores se muestran a continuación por orden. En homologías del 100%, por ejemplo, cuando el último péptido de la lista siguiente ELDAPNYHY se somete a búsqueda Blast con proteínas "virales", la neuraminidasa de la gripe se identifica con una puntuación de 34,6 y un valor de E de 0,03.

25

Secuencia	Proteína humana	Puntuación	Valor de E
QMVQAMRTI	UDP-galactosa-4-epimerasa	<u>24,8</u>	16
LLFAIVSLV	antígeno CD200	<u>22,7</u>	68
GMVSLMLQI	Proteína PCSK7	<u>26,1</u>	6,5
LLIDGTASL	Proteína cinasa SNAK que regula SNARE	<u>21,4</u>	164
SIIPSGPLK	Variante 1 de ajuste KIAA0596	<u>21,8</u>	122
AAAKESTQK	P de unión a poli(A) específica de testículos	<u>21,4</u>	164
SIHTGNQHK	Similar a hemiceintia 1	<u>22,3</u>	91
SMVEAMVSR	Dominio BED que contiene dedos de cinc	<u>22,7</u>	68
LYKCLKREI	Proteína hipotética LOC256369	<u>23,5</u>	38
IYSTVASSL	Mucina intestinal	<u>24,4</u>	21
AYGVKGFSS	Precursor de glipicano 6	<u>23,5</u>	38
SYLIRALTL	Transportador de neurotransmisores RB21A	<u>25,2</u>	12
DPNNMDRAV	Proteína SNX13	<u>21,4</u>	164
APEYAYKIV	Receptor conjugado a proteína G 123	<u>21,8</u>	122
NPNKKIITI	Fisoproteína 1 de fase M	<u>22,3</u>	91
GPATAQMAL	Proteína activadora de GTPasa Rho	<u>22,7</u>	68
ELDAPNYHY	Receptor de lipoproteínas de baja densidad	<u>23,1</u>	51

30 **[0108]** La interpretación de estos resultados de Blast es tanto difícil como importante debido a que la mayoría de estos péptidos de arriba contienen entre 4, 5 e incluso 6 aminoácidos que son idénticos a los encontrados en diversas proteínas humanas. Por consiguiente, el efecto de estas regiones de similitud será investigado adicionalmente en sujetos sometidos a vacunación con estos péptidos. Si la selección se hiciera en función de los valores de E, puede fuera mejor ignorar GMVSLMLQI y SYLIRALTL. Esto deja 15 péptidos diana. Podría realizarse un análisis similar con las otras 6 proteínas de H5N1 si fueran necesarios más péptidos.

**Tabla 1**

n	Posición inicial	Secuencia	Posición final
1	22	KNVTVTTHAQD	31
2	38	NGKLCDLDGVKPLILRDCSVAG	59
3	69	EFINVPEWSYIVEK	82



(continuación)

n	Posición inicial	Secuencia	Posición final
4	85	PVNDLCYP	92
5	99	EELKHLLSR	107
6	112	EKIQIIPK	119
7	123	SSHEVSLGVSSACPYQGK	140
8	143	FFRNVVWL	150
9	170	EDLLVLWG	177
10	186	EQTKLYQ	192
11	196	TYISVGT	202
12	205	LNQRLVPR	212
13	248	IAPEYAYKIVK	258
14	274	CNTKCQT	280
15	290	PFHNIHPLTIGCPKYVKSNRLVLA	314
16	332	LFGAIAG	338
17	417	GFLDVWT	423
18	425	NAELLVL	431
19	445	VKNLYDKVRL	454
20	467	CFEFYHKCD	475
21	503	ISGVKLESIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWM	540
22	542	SNGSLQC	548

**Bibliografía**

5 **[0109]** La bibliografía mencionada en este documento se incorpora toda expresamente como referencia en su totalidad.

[1] J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, T. C. Rojas, J. Canada, A. Fernández, S. Penadés, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 2257.

10 [2] A. G. Barrientos, J. M. de la Fuente, T. C. Rojas, A. Fernández, S. Penadés, *Chem. Eur. J.*, 2003, 9, 1909.

[3] M. J. Hostetler, J. E. Wingate, C. Z. Zhong, J. E. Harris, R. W. Vachet, M. R. Clark, J. D. Londono, S. J. Green, J. J. Stokes, G. D. Wignall, G. L. Clish, M. D. Porter, N. D. Evans, R. W. Murray, *Langmuir*, 1998, 14, 17.

15 [4] Esta capa metálica se concentró bajo presión reducida. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H del resto mostraban la misma proporción inicial, aproximadamente, entre las señales **Glc**, **Stn**, **Ley** y **BC11**.

**REIVINDICACIONES**

1. Una nanopartícula que comprende un núcleo que incluye átomos metálicos y/o semiconductores, en la que el núcleo está covalentemente unido a diversos ligandos, donde los ligandos incluyen:
- 5 (a) un primer ligando que comprende un resto de hidratos de carbono capaz de estimular una respuesta inmunitaria innata;
- (b) un segundo ligando que comprende un péptido de células T colaboradoras,
- (c) un tercer ligando que comprende una señal de peligro y
- (d) uno o más ligandos capaces de producir una respuesta específica frente a un agente infeccioso
- 10 diana, en el que la nanopartícula además comprende una corona de ligandos que comprende grupos de hidratos de carbono que protegen a las nanopartículas del reconocimiento por parte del sistema inmunitario, de modo que esta respuesta inmunitaria producida por la nanopartícula *in vivo* es específica para el agente infeccioso diana.
2. Una composición de nanopartículas para su uso en un procedimiento para la profilaxis o tratamiento
- 15 contra una infección por un agente infeccioso, en la que las nanopartículas comprenden un núcleo que incluye átomos metálicos y/o semiconductores, donde el núcleo está covalentemente unido a diversos ligandos, incluyendo los ligandos:
- (a) un primer ligando que comprende un resto de hidratos de carbono capaz de estimular una
- 20 respuesta inmunitaria innata;
- (b) un segundo ligando que comprende un péptido de células T colaboradoras,
- (c) un tercer ligando que comprende una señal de peligro y
- (d) uno o más ligandos capaces de producir una respuesta específica frente a un agente infeccioso
- diana; en el que la nanopartícula además comprende una corona de ligandos que comprende grupos de hidratos de
- 25 carbono que protegen a las nanopartículas del reconocimiento por parte del sistema inmunitario, de modo que esta respuesta inmunitaria producida por la nanopartícula *in vivo* es específica para el agente infeccioso diana.
3. Uso de nanopartículas que comprenden un núcleo que incluye átomos metálicos y/o semiconductores, en el que el núcleo está covalentemente unido a diversos ligandos, donde los ligandos incluyen:
- (a) un primer ligando que comprende un resto de hidratos de carbono capaz de estimular una
- 30 respuesta inmunitaria innata;
- (b) un segundo ligando que comprende un péptido de células T colaboradoras,
- (c) un tercer ligando que comprende una señal de peligro y
- (d) uno o más ligandos capaces de producir una respuesta específica frente a un agente infeccioso
- diana, para la preparación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento frente a la infección por un agente
- 35 infeccioso, en el que la nanopartícula además comprende una corona de ligandos que comprende grupos de hidratos de carbono que protegen a las nanopartículas del reconocimiento por parte del sistema inmunitario, de modo que esta respuesta inmunitaria producida por la nanopartícula *in vivo* es específica para el agente infeccioso diana.
- 40 4. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente infeccioso es un virus, una bacteria, un parásito, un hongo o un viroide.
5. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de la
- 45 reivindicación 4, en la que el agente infeccioso es gripe, VIH, malaria o tuberculosis.
6. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de la
- reivindicación 5, en el que el virus de la gripe es de la cepa H5N1.
- 50 7. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el tratamiento es un tratamiento profiláctico.
8. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una
- 55 cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto es un hombre o un ave.
9. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la respuesta específica frente a un agente infeccioso diana es una respuesta de células B o de células T.

10. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el uno o más ligandos capaces de producir una respuesta específica frente a un agente infeccioso diana es una secuencia peptídica antigénica.
- 5 11. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el primer ligando que comprende un resto de hidrato de carbono es capaz de estimular una respuesta inmunitaria innata que comprende una N-acetilglucosamina o un grupo manosa.
- 10 12. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el segundo ligando que comprende un péptido de células T colaboradoras comprende un péptido de células T colaboradoras promiscuo.
13. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una  
15 cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el tercer ligando que comprende una señal de peligro comprende un lípido gram negativo capaz de actuar como agonista del receptor TOLL 4.
14. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una  
20 cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los grupos de hidratos de carbono que comprende la corona de ligandos son ligandos de glucosa.
15. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una  
25 cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el ligando capaz de producir una respuesta específica frente a un agente infeccioso diana es un antígeno peptídico o de hidrato de carbono.
16. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula es soluble en agua.
17. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una  
30 cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula incluyendo sus ligandos tiene un diámetro medio de entre 10 y 30 nm.
18. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una  
35 cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el núcleo es un núcleo metálico.
19. Las nanopartículas, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el núcleo metálico comprende Au, Ag o Cu.
20. La nanopartícula, composición para su uso en un procedimiento de tratamiento o uso de una  
40 cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los ligandos se unen al núcleo de la nanopartícula mediante un grupo enlazador que comprende un grupo tiol, un grupo alquilo, un grupo glicol o un grupo peptídico.
21. Una composición farmacéutica que comprende nanopartículas según una cualquiera de las  
45 reivindicaciones 1 o 4 a 20, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
22. Una composición para vacuna que comprende nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 20, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

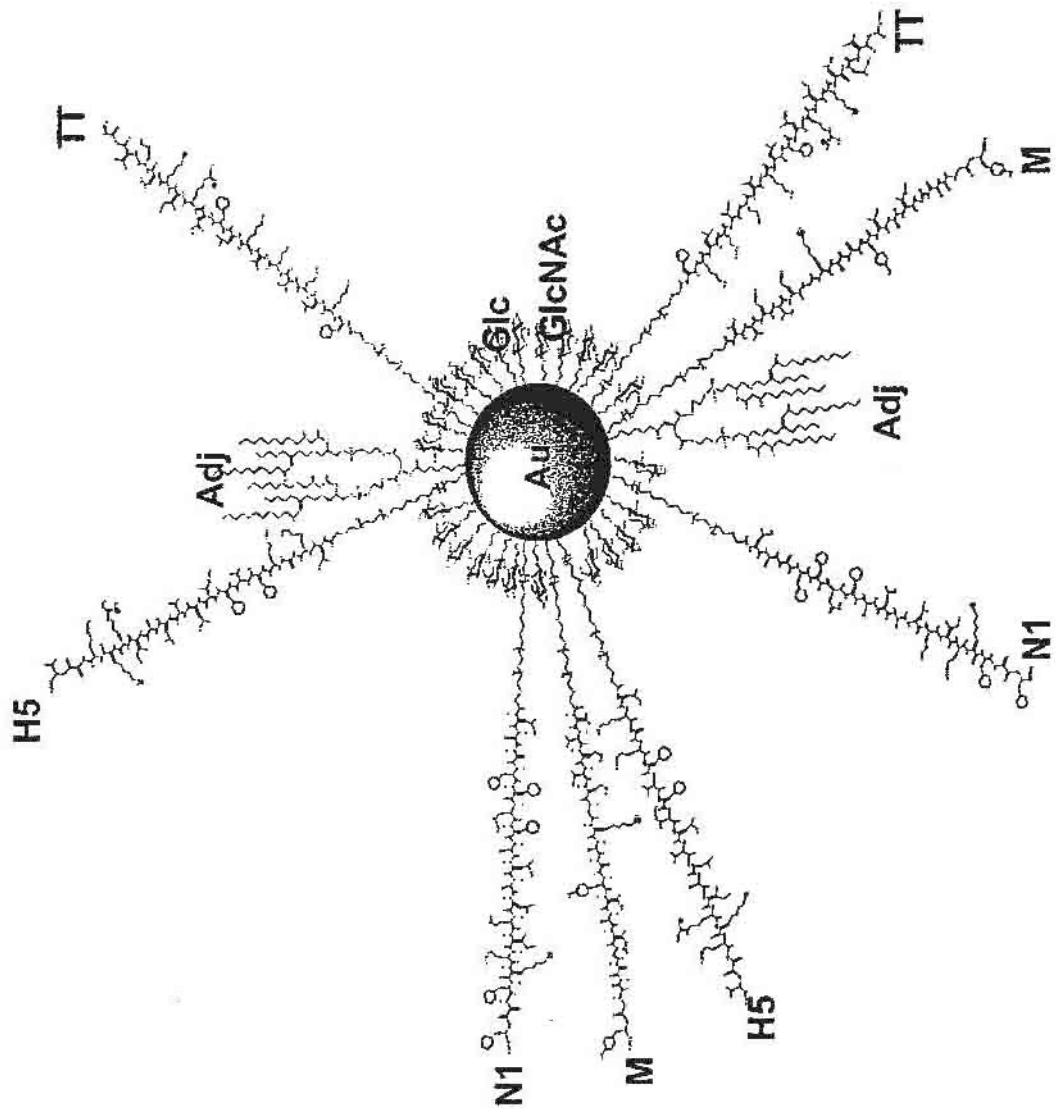
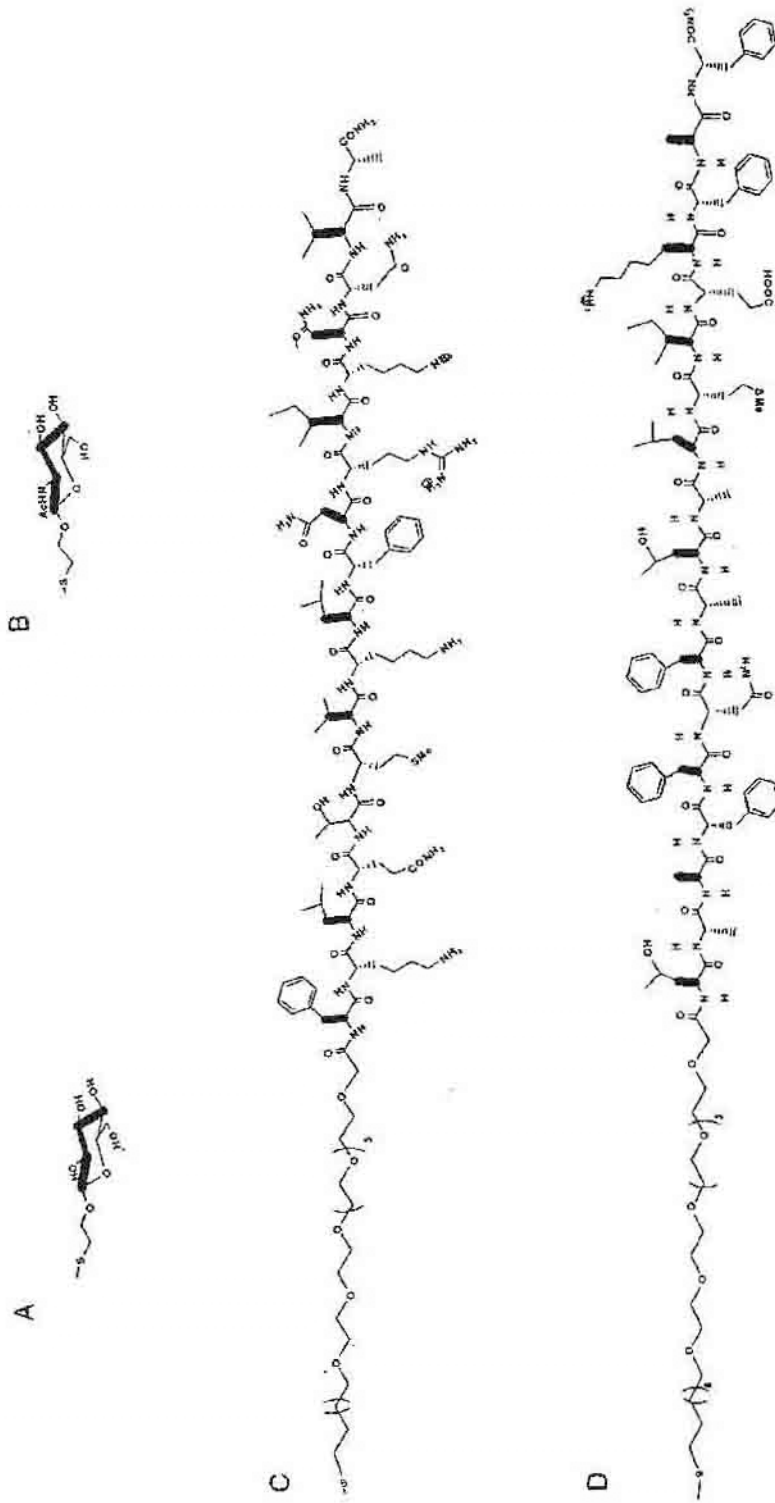


Fig. 1

Fig. 2



continuación.../

Fig. 2 (continuación)

