

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 665**

51 Int. Cl.:

**B82Y 30/00** (2011.01)

**C07K 17/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2006 E 06844221 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1948695**

54 Título: **Composiciones inmunógenas y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**25.10.2005 US 729828 P**

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

**11.04.2013**

73 Titular/es:

**ARTIFICIAL CELL TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)  
5 SCIENCE PARK, SUITE 13  
NEW HAVEN, CT 06511, US**

72 Inventor/es:

**HAYNIE, DONALD TEMPLETON**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 400 665 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

Composiciones inmunógenas y procedimientos de uso

### Antecedentes

5 Las vacunas han sido siempre importantes en medicina desde que se observó que, para ciertas enfermedades, la exposición inicial al agente infeccioso confería inmunidad contra infecciones posteriores. Las vacunas se han usado durante muchos años con el fin de crear inmunidad en un individuo contra infección por patógenos particulares tales como virus, bacterias, hongos y parásitos. Las vacunas también se han usado para estimular la capacidad del cuerpo para montar una respuesta inmunitaria contra antígenos en células cancerosas, o contra la formación de fibrillas patológicas. Las vacunas se pueden administrar mediante diversas rutas incluyendo, por ejemplo, administración oral, intravenosa, subcutánea, transdérmica, sublingual, intramuscular, y nasal.

15 Las primeras vacunas dependían de los patógenos "vivos" o "muertos" que retenían su inmunogenicidad. Un mejor entendimiento de la estructura y función de los patógenos particulares y de los mecanismos de inmunidad adaptativa se ha hecho posible para diseñar vacunas más seguras y más dirigidas. Por ejemplo, una vacuna actual contra el virus de la hepatitis B depende de la inoculación que usa solamente una parte del antígeno de superficie vírica, en lugar del patógeno completo. Las vacunas de este tipo tienen menores efectos secundarios y evitan las respuestas inmunitarias no deseadas a antígenos que no son protectores, es decir, no confieren inmunidad duradera. Las vacunas también se han desarrollado usando tecnología de ADN recombinante y tratamiento génico para proporcionar vacunas de ADN, que en casos favorables conducen a una respuesta inmunitaria protectora.

20 La vacunación con antígenos de proteínas (por ejemplo, de una proteína vírica o un antígeno específico de tumor) o polipéptidos inmunógenos derivados de antígenos de proteínas es una nueva estrategia que tiene un tremendo potencial clínico debido a su baja toxicidad y aplicabilidad muy difundida. Sin embargo, las vacunas a base de proteínas, han tenido un éxito clínico solamente limitado, debido en parte a dificultades con la administración. Por lo tanto existe una necesidad de desarrollar medios más eficaces de ingeniería de antígenos basados en polipéptidos.

25 Actualmente, se están evaluando vacunas de péptidos sintéticas para la protección contra bacterias, parásitos, y virus. Las vacunas de epítomos de bacterias incluyen las dirigidas contra cólera y shigella. Una vacuna sintética contra malaria se ha sometido a estudios clínicos de Fase I y Fase II. La gripe y la hepatitis B representan dos sistemas víricos en los que las vacunas de péptidos sintéticos parecen especialmente prometedoras, y ha habido mucho más interés recientemente en el desarrollo de vacunas sintéticas contra el virus-1 de inmunodeficiencia humana (VIH-1).

30 Una respuesta inmunitaria deseable a un antígeno de proteína o péptido en un contexto de vacuna incluye inmunidad tanto humoral como mediada por células. El componente humoral implica la estimulación de células B, que producen anticuerpos, mientras que el componente mediado por células implica linfocitos T. Los linfocitos T citotóxicos (LTC) juegan un papel importante en el sistema inmunitario mediado por células, lisando las células infectadas por virus o infectadas por bacterias. De manera específica, los LTC poseen receptores de superficie celular que pueden reconocer péptidos extraños asociados a las moléculas del MHC de clase I y / o clase II.

35 Existe una necesidad de procedimientos y plataformas de administración especializada adecuados para la administración de antígenos complejos tales como polipéptidos a organismos vertebrados. La genotecnología de polipéptidos inmunógenos y las estructuras hechas de polipéptidos inmunógenos son prometedoras para este propósito. Preferentemente, la presentación resultante de determinantes inmunógenos activarán al menos algunos componentes del sistema inmunitario adaptativo, es decir, la presentación de antígeno provocará una respuesta inmunitaria suficiente para combatir un patógeno particular, si la respuesta inmunitaria está mediada por anticuerpos, células T citotóxicas, células T auxiliares, células citolíticas naturales o macrófagos, o alguna combinación de los mismos.

Zheng et al., J. Biomater. Sci. Polimer Edu., Vol. 16 (3), 285 - 299 (2005) describen polipéptidos diseñados en la base de análisis por ordenador y muestran que se pueden usar para fabricar películas finas nanoestructuradas por ensamblaje capa a capa electrostático (CACE).

45 El documento US 2005/0069950 describe un procedimiento para diseñar polipéptidos para la nano fabricación de películas finas, revestimientos y microcápsulas por CACE para aplicaciones en biomedicina y otros campos.

### Sumario

En una realización, se proporciona una composición inmunógena para su uso en un procedimiento de provocación de una respuesta inmunitaria terapéutica en un organismo vertebrado, en la que la composición inmunógena comprende

50 una película de capas múltiples que comprende dos o más capas de polielectrolitos, en la que las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de manera opuesta,

en la que un primer polielectrolito de capas comprende un primer polipéptido antigénico que comprende una o más regiones de adsorción superficial unidas de forma covalente a una o más regiones determinantes antigénicas, en la que el polipéptido antigénico y la una o más regiones de adsorción superficial tienen la misma polaridad,

en la que la una o más regiones de adsorción superficial comprenden uno o más motivos de secuencias de aminoácidos, consistiendo el uno o más motivos de secuencias de aminoácidos en de 5 a 15 aminoácidos y teniendo una magnitud de carga neta por resto mayor que o igual a 0,4, y

en la que la una o más regiones determinantes antigénicas consisten en de 3 a 250 restos de aminoácido,

- 5 en la que el primer polipéptido antigénico no es un homopolímero, tiene al menos 15 aminoácidos de longitud, y tiene una solubilidad acuosa a pH de 4 a 10 mayor que 50 µg/ml; en la que una segunda capa comprende un segundo polielectrolito de capas que comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular mayor que 1.000 y al menos 5 cargas por molécula, y una carga opuesta a la del primer polipéptido de capas, y en la que la primera región determinante antigénica comprende al menos un determinante antigénico de un antígeno seleccionado entre un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico o un antígeno de parásito.

10 En otra realización, un procedimiento de provocación de una respuesta inmunitaria no terapéutica en un organismo vertebrado no humano comprende la administración en el organismo vertebrado no humano de la composición inmunógena descrita anteriormente. En otra realización existe el uso de la composición inmunógena descrita anteriormente en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria terapéutica en un organismo vertebrado.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un esquema del ensamblaje de polipéptidos cargados de manera opuesta.

La Figura 2 ilustra una realización de un polipéptido antigénico que comprende una región determinante antigénica (3) y dos regiones de adsorción superficial (1, 2), una unida al extremo N de la región determinante antigénica (1) y una unida al extremo C de la región determinante antigénica (2).

La Figura 3 ilustra la preparación independiente de las tres regiones diferentes de un polipéptido antigénico para LBL mediante síntesis en fase de solución, síntesis en fase sólida o producción de péptidos recombinantes.

La Figura 4 ilustra la unión de las tres regiones del péptido antigénico (4).

La Figura 5 ilustra una realización de un polipéptido antigénico que comprende dos regiones de adsorción superficial (120 y 130) y región determinante antigénica (110).

### Descripción detallada

Como se usa en el presente documento, "capa" significa un incremento de espesor, por ejemplo, sobre un molde para formación de película, después de una etapa de adsorción. "Capas múltiples" significa incrementos de espesor múltiple (es decir, dos o más). Una "película de capas múltiples de polielectrolito" es una película que comprende uno o más incrementos de espesor de polielectrolitos. Después del depósito, las capas de una película de capas múltiples pueden no permanecer como capas discretas. De hecho, es posible que exista entremezclado significativo de especies, particularmente en las interfases de los incrementos de espesor.

El término "polielectrolito" incluye materiales policatiónicos y polianiónicos que tienen un peso molecular mayor que 1.000 y al menos 5 cargas por molécula. Los materiales policatiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, poliaminas. Las poliaminas incluyen, por ejemplo, un polipéptido, poli(vinilamina), poli(aminoestireno), poli(aminoacrilato), poli(aminoacrilato de N-metilo), poli(aminoacrilato de N-etilo), poli(aminoacrilato de N,N-dimetilo), poli(aminoacrilato de N,N-dietilo), poli(aminometacrilato), poli(aminometacrilato de N-metilo), poli(aminometacrilato de N-etilo), poli(aminometacrilato de N,N-dimetilo), poli(aminometacrilato de N,N-dietilo), poli(etilenimina), poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(cloruro de N,N,N-trimetilaminoacrilato), poli(cloruro de metiacrilamidopropiltrimetilamonio), quitosano y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales policatiónicos anteriores. Los materiales polianiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, un polipéptido, un ácido nucleico, alginato, carragenina, furcellarano, pectina, xantano, ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de dextrano, poli(ácido metacrílico), celulosa oxidada, carboximetilcelulosa, polisacáridos ácidos, y croscarmelosa, polímeros y copolímeros sintéticos que contienen grupos carboxilo laterales, y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales polianiónicos anteriores.

"Aminoácido" significa un bloque de construcción de un polipéptido. Como se usa en el presente documento, "aminoácido" incluye los 20 L-aminoácidos comunes de origen natural, todos los otros aminoácidos naturales, todos los aminoácidos no naturales, y todos los miméticos de aminoácidos, por ejemplo, peptoides.

"Los aminoácidos de origen natural" significa los 20 L-aminoácidos comunes de origen natural, esto es, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, metionina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, arginina, lisina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptófano y prolina.

"Aminoácido no natural" significa un aminoácido distinto de cualquiera de los 20 L-aminoácidos comunes de origen natural. Un aminoácido no natural puede tener estereoquímica o bien L o D.

"Peptide," o glicina sustituida con N, significa un análogo del monómero de aminoácido correspondiente, con la misma cadena lateral que el aminoácido correspondiente pero con la cadena lateral unida al átomo de nitrógeno del grupo amino en lugar de a los carbonos  $\alpha$  del resto. Por consiguiente, los enlaces químicos entre monómeros en un polipeptido no son enlaces peptídicos, lo que puede ser útil para limitar la digestión proteolítica.

5 "Secuencia de aminoácidos" y "secuencia" significa una longitud continua de cadena de polipéptido que tiene al menos dos restos de aminoácido de longitud.

"Resto" significa un aminoácido en un polímero u oligómero; es el resto del monómero de aminoácido a partir del que se forma el polímero. La síntesis de polipéptido implica la deshidratación, esto es, una sola molécula de agua se "pierde" tras la adición del aminoácido a una cadena de polipéptido.

10 "Motivo de secuencia de aminoácidos" significa una secuencia de aminoácidos contigua que comprende n restos, en los que n es de 5 a 15. En una realización, la magnitud de la carga neta por resto de un motivo de secuencia de aminoácidos es mayor que o igual a 0,4. En otra realización, la magnitud de la carga neta por resto de un motivo de secuencia de aminoácidos es mayor que o igual a 0,5. Como se usa en el presente documento, la magnitud de la carga neta se refiere al valor absoluto de la carga neta, esto es, la carga neta puede ser positiva o negativa.

15 Como se usa en el presente documento "péptido" y "polipéptido" se refiere todo a una serie de aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y alfa-carboxi de aminoácidos adyacentes, y puede contener o estar exento de modificaciones tales como glucosilación, oxidación de cadena lateral, o fosforilación, siempre que tales modificaciones, o la carencia de las mismas, no destruyan la inmunogenicidad. Como se usa en el presente documento, el término "péptido" significa que se refiere a tanto un péptido como un polipéptido o proteína.

20 "Polipéptido diseñado" significa un polipéptido que comprende uno o más motivos de secuencias de aminoácidos, en los que el polipéptido tiene al menos 15 aminoácidos de longitud y la relación del número de restos cargados de la misma polaridad menos el número de restos de la polaridad opuesta con respecto al número total de restos en el polipéptido es mayor que o igual a 0,4 a pH 7,0. En otras palabras, la magnitud de la carga neta por resto del polipéptido es mayor que o igual a 0,4. La relación del número de restos cargados de la misma polaridad menos el número de restos de la polaridad opuesta con respecto al número total de restos en el polipéptido puede ser mayor que o igual a 0,5 a pH 7,0. En otras palabras, la magnitud de la carga neta por resto del polipéptido es mayor que o igual a 0,5. Aunque no existe ningún límite superior absoluto en la longitud del polipéptido, en general, los polipéptidos diseñados adecuados para el depósito por CACE tiene un límite de longitud superior práctico de 1.000 restos.

30 "Estructura primaria" significa la secuencia de aminoácidos lineal contigua en una cadena de polipéptidos, y "estructura secundaria" significa los tipos más o menos regulares de estructura en una cadena de polipéptidos estabilizada por interacciones no covalentes, usualmente enlaces de hidrógeno. Los ejemplos de estructura secundaria incluyen una hélice  $\alpha$ , lámina  $\beta$  y giro  $\beta$ .

35 "Película de capas múltiples de polipéptido" significa una película que comprende uno o más polipéptidos diseñados como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, una película de capas múltiples de polipéptido comprende una primera capa que comprende un polipéptido diseñado y una segunda capa que comprende un polielectrolito que tiene una carga neta de polaridad opuesta al polipéptido diseñado. Por ejemplo, si la primera capa tiene una carga positiva neta, la segunda capa tiene una carga negativa neta; y si la primera capa tiene una carga negativa neta, la segunda capa tiene una carga positiva neta. La segunda capa comprende otro polipéptido diseñado u otro polielectrolito.

40 "Sustrato" significa un material sólido con una superficie adecuada para la adsorción de polielectrolitos de la solución acuosa. La superficie de un sustrato puede tener esencialmente cualquier forma, por ejemplo, plana, esférica, forma de barra, etc. Una superficie de sustrato puede ser regular o irregular. Un sustrato puede ser un cristal. Un sustrato puede ser una molécula bioactiva. Los sustratos varían en tamaño desde la nanoescala hasta la macroescala. Además, un sustrato opcionalmente comprende varias subpartículas pequeñas. Un sustrato puede estar hecho de material orgánico, material inorgánico, material bioactivo, o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de sustratos incluyen obleas de silicio; partículas coloidales cargadas, por ejemplo, micropartículas de  $\text{CaCO}_3$  o de melamina-formaldehído; células biológicas tales como eritrocitos, hepatocitos, células bacterianas, o células de levaduras; retículas de polímero orgánico, por ejemplo, retículas de poliestireno o copolímero de estireno; liposomas; orgánulos; y virus. El sustrato puede ser un dispositivo médico tal como un marcapasos artificial, un implante coclear, o un dilatador vascular.

50 Cuando se desintegra un sustrato o se retira de otra manera durante o después de la formación de película, se llama "un molde" (para la formación de película). Las partículas de molde se pueden disolver en disolventes apropiados o retirarse mediante tratamiento térmico. Si, por ejemplo, se usan partículas de molde de melamina-formaldehído reticuladas parcialmente, el molde se puede desintegrar por procedimientos químicos suaves, por ejemplo, en DMSO, o mediante un cambio en el valor de pH. Después de la disolución de las partículas de molde, permanecen las carcassas de capas múltiples huecas que están compuestas de capas de polielectrolito alternativas.

Una "microcápsula" es una película de polielectrolito en forma de una carcasa hueca o un revestimiento que rodea un núcleo. El núcleo comprende una diversidad de materiales de encapsulación diferentes, por ejemplo, una proteína, un fármaco, o una combinación de los mismos.

"Molécula bioactiva" significa una molécula, macromolécula, o ensamblaje macromolecular que tiene un efecto biológico. El efecto biológico específico se puede medir en un ensayo adecuado y normalizarse por unidad de peso o por molécula de la molécula bioactiva. Una molécula bioactiva puede estar encapsulada, retenida detrás, o encapsulada dentro de una película de polielectrolito. Los ejemplos no limitantes de una molécula bioactiva son un fármaco, un cristal de un fármaco, una proteína, un fragmento funcional de una proteína, un complejo de proteínas, una lipoproteína, un oligopéptido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un ribosoma, un agente terapéutico activo, un fosfolípido, un polisacárido, un lipopolisacárido. Como se usa en el presente documento, "molécula bioactiva" además abarca estructuras biológicamente activas, tales como, por ejemplo, un fragmento de membrana funcional, una estructura de membrana, un virus, un patógeno, una célula, un agregado de células y un orgánulo. Los ejemplos de una proteína que puede estar encapsulada o retenida detrás de una película de polipéptido son hemoglobina; enzimas, tales como por ejemplo glucosa oxidasa, ureasa, lisozima y similares; proteínas de matriz extracelular, por ejemplo, fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno; y un anticuerpo. Los ejemplos de una célula que puede estar encapsulada o retenida detrás de una película de polielectrolito es una célula de islotes trasplantada, una célula eucariota, una célula bacteriana, una célula de plantas, y una célula de levadura.

"Biocompatible" significa que no provoca ningún efecto de salud adverso sustancial tras la ingestión oral, aplicación tópica, aplicación transdérmica, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inhalación, implante, o inyección intravenosa. Por ejemplo, las películas biocompatibles incluyen las que no provocan una respuesta inmunitaria sustancial cuando se ponen en contacto con el sistema inmunitario de, por ejemplo, un ser humano.

"Respuesta inmunitaria" significa la respuesta del sistema inmunitario celular o humoral a la presencia de una sustancia en cualquier parte del cuerpo. Una respuesta inmunitaria se puede caracterizar de numerosas formas, por ejemplo, mediante un incremento en el torrente sanguíneo del número de anticuerpos que reconocen un cierto antígeno. Los anticuerpos son proteínas secretadas por células B, y un antígeno es una entidad que provoca una respuesta inmunitaria. El cuerpo humano lucha contra la infección e inhibe la reinfección incrementando el número de anticuerpos en el torrente sanguíneo y en otra parte.

"Antígeno" significa una sustancia extraña que provoca una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la producción de moléculas de anticuerpo específicas) cuando se introduce en los tejidos de un organismo vertebrado susceptible. Un antígeno contiene uno o más epítomos. El antígeno puede ser una sustancia pura, una mezcla de sustancias (incluyendo células o fragmentos de células). El término antígeno incluye un determinante antigénico adecuado, autoantígeno, el propio-antígeno, antígeno de reacción cruzada, aloantígeno, tolerógeno, alérgeno, hapteno, e inmunógeno, o partes de los mismos, y combinaciones de los mismos, y estos términos se usan indistintamente. Los antígenos son, en general, de alto peso molecular y comúnmente son polipéptidos. Los antígenos que provocan fuertes respuestas inmunitarias se dice que son fuertemente inmunógenos. El sitio sobre un antígeno al que se puede unir de manera específica un anticuerpo complementario se llama un epítomo o determinante antigénico.

"Antigénico" se refiere a la capacidad de una composición de dar lugar a anticuerpos específicos para la composición o dar lugar a una respuesta inmunitaria mediada por célula.

Como se usa en el presente documento, los términos "epítomo" y "determinante antigénico" se usan de manera indistinta y significan la estructura o secuencia de un antígeno, por ejemplo, una proteína un péptido diseñado, que es reconocido por un anticuerpo. Ordinariamente, un epítomo estará sobre la superficie de una proteína. Un "epítomo continuo" es uno que implica varios restos de aminoácido contiguos, no uno que implica restos de aminoácido que resultan de estar en contacto o en la región limitada de espacio en una proteína plegada. Un "epítomo conformacional" implica restos de aminoácido de diferentes partes de la secuencia lineal de una proteína que se pone en contacto en la estructura tridimensional de la proteína. Para que se produzca la interacción eficaz entre el antígeno y el anticuerpo, el epítomo debe estar fácilmente disponible para unirse. De este modo, el epítomo o los determinantes antigénicos están presentes en el ambiente nativo, celular del antígeno, o solamente expuestos cuando se desnaturalizan. En su forma natural, pueden ser citoplásmicos (solubles), asociados a membrana, o secretados. El número, localización y tamaño de los epítomos dependerá de cuánto antígeno está presente durante el proceso de fabricación del anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, una "composición de vacuna" es una composición que provoca una respuesta inmunitaria en un mamífero al que se administra y que protege al organismo inmunizado contra la exposición posterior por el agente de inmunización o un agente inmunológicamente de reacción cruzada. La protección puede ser completa o parcial con relación a la reducción en los síntomas o infección comparada con un organismo no vacunado. Un agente inmunológicamente de reacción cruzada puede ser, por ejemplo, la proteína entera (por ejemplo, glucosiltransferasa) a partir de la que se ha derivado un péptido subunitario para su uso como inmunógeno. De manera alternativa, un agente inmunológicamente de reacción cruzada puede ser una proteína diferente que se reconoce en total o en parte por los anticuerpos provocados por el agente de inmunización.

Como se usa en el presente documento, una "composición inmunógena" pretende abarcar una composición que provoca una respuesta inmunitaria en un organismo al que se administra y que puede o no puede proteger al mamífero inmunizado contra la exposición posterior con el agente de inmunización. En una realización, una composición inmunógena es una composición de vacuna.

Películas de capas múltiples de polielectrolito son películas finas (por ejemplo, de unos pocos nanómetros a milímetros de espesor) compuestas de capas alternativas de polielectrolitos cargados de manera opuesta. Tales películas pueden estar formadas por ensamblaje capa a capa sobre un sustrato adecuado. En el autoensamblaje capa a capa electrostático ("CACE"), la base física de asociación de polielectrolitos es electrostática. La construcción de la película es posible debido a que el signo de la densidad de carga de la superficie de la película se invierte tras el depósito de capas sucesivas. El principio general del depósito de CACE de poliones cargados de manera opuesta se ilustra en la Figura 1. La generalidad y simplicidad relativa del proceso de película de CACE permite el depósito de muchos tipos diferentes de polielectrolito sobre muchos tipos diferentes de superficie. Las películas de capas múltiples de polipéptidos son un subconjunto de películas de capas múltiples de polielectrolitos, que comprenden al menos una capa que comprende un polipéptido cargado. Una ventaja clave de las películas de polipéptidos de capas múltiples es la benignidad ambiental. Las películas de CACE se usan también para encapsulación. Las aplicaciones de películas de polipéptidos y microcápsulas incluyen, por ejemplo, nanoreactores, biosensores, células artificiales, y vehículos de administración de fármacos.

Los principios de diseño para polipéptidos adecuados para el depósito capa a capa electrostática se explican en la publicación de patente de Estados Unidos N° 2005/0069950. En resumen, el diseño primario se refiere a la longitud y carga del polipéptido. La electrostática es el asunto de diseño más importante debido a que es la base de CACE. Sin propiedades de carga adecuadas, un polipéptido no será sustancialmente soluble en solución acuosa a pH de 4 a 10 y no se puede usar fácilmente para la fabricación de una película de capas múltiples por CACE. Otros asuntos de diseño incluyen la estructura física de los polipéptidos, la estabilidad física de las películas formadas a partir de los polipéptidos, y la biocompatibilidad y bioactividad de las películas y los polipéptidos constituyentes.

Como se ha definido anteriormente, un polipéptido diseñado significa un polipéptido que comprende uno o más motivos de secuencias de aminoácidos, en el que el polipéptido tiene al menos 15 aminoácidos de longitud y la magnitud de la carga neta por resto del polipéptido es mayor que o igual a 0,4 a pH 7,0. "Motivo de secuencia de aminoácidos" significa una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende n restos, en la que n es de 5 a 15. Los aminoácidos de origen natural cargados positivamente (básicos) a pH 7,0 son Arg, His, y Lys. Los restos de aminoácidos de origen natural cargados negativamente (ácidos) a pH 7,0 son Glu y Asp. Se puede emplear un motivo de aminoácido que comprende una mezcla de restos de aminoácido de carga opuesta siempre que la relación global de la carga reúna los criterios especificados. En un ejemplo, un polipéptido diseñado no es un homopolímero.

En un ejemplo, el motivo de secuencia de aminoácidos comprende 7 aminoácidos. Cuatro aminoácidos cargados es un mínimo adecuado para un tamaño de motivo de 7, debido a que menos de 4 cargas produce una disminución en la solubilidad del péptido y una disminución en el control sobre CACE. Además, con relación a la biocompatibilidad, cada motivo de secuencia de aminoácidos identificado en los datos genómicos es suficientemente largo en 7 restos para constituir un epítipo continuo, pero no tan largo como para corresponder sustancialmente a los restos tanto sobre la superficie de una proteína como en su interior. De este modo, la carga y la longitud del motivo de secuencia de aminoácidos ayudan a garantizar que un motivo de secuencia identificado en los datos genómicos sea probable que se produzca sobre la superficie de la proteína plegada a partir de la que se deriva el motivo de secuencia. Por el contrario, un motivo muy corto podría resultarle al organismo una secuencia al azar, o una no específicamente "propia", y por lo tanto provocar una respuesta inmunitaria.

En algunos casos, un asunto de diseño con relación a los motivos de secuencias de aminoácidos y polipéptidos diseñados es su propensión a formar estructuras secundarias, notablemente hélice  $\alpha$  o lámina  $\beta$ . En algunos ejemplos, es deseable ser capaz de controlar, por ejemplo, minimizar, la formación de estructura secundaria por los polipéptidos diseñados en un medio acuoso con el fin de maximizar el control sobre la formación de la capa de película fina. En primer lugar, se prefiere que los motivos de secuencia sean relativamente cortos, esto es de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 aminoácidos, debido a que los motivos largos es más probable que adopten una estructura tridimensional estable en solución. En segundo lugar, un engarce, tal como un resto glicina o prolina, unido de forma covalente entre sucesivos motivos de secuencias de aminoácidos en un polipéptido diseñado reducirá la propensión del polipéptido a adoptar una estructura secundaria en solución. La glicina, por ejemplo, tiene una propensión muy baja a hélice  $\alpha$  y una propensión muy baja a lámina  $\beta$ , haciendo energéticamente muy desfavorable para una glicina y sus aminoácidos vecinos el formar una estructura secundaria regular en solución acuosa. En tercer lugar, la propensión a hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$  de los propios polipéptidos diseñados se puede minimizar seleccionando motivos de secuencias de aminoácidos para los que la propensión a hélice  $\alpha$  sumada es menor que 7,5 y la propensión a lámina  $\beta$  sumada es menor que 8. Propensión "sumada" significa la suma de las propensiones de hélice  $\alpha$  o lámina  $\beta$  de todos los aminoácidos en un motivo. Los motivos de secuencias de aminoácidos que tienen una propensión de hélice  $\alpha$  sumada y / o propensión de lámina  $\beta$  sumada algo mayor son adecuados para CACE, particularmente cuando están unidos por engarces tales como Gly o Pro. En ciertas aplicaciones, la propensión de un polipéptido para formar una estructura secundaria puede ser relativamente alta como una característica de diseño específico de fabricación de película fina. Las propensiones de estructura secundaria para los 20 aminoácidos de origen natural se pueden calcular usando el procedimiento de Chou y Fasman (véase P. Chou y G. Fasman *Biochemistry* 13:211 (1974)).

Otro asunto de diseño en el control de la estabilidad de las películas de CACE de polipéptido. Los enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones hidrófobas contribuyen a la estabilidad de las películas de capas múltiples. Además, los enlaces disulfuro covalentes formados entre aminoácidos que contienen sulfidrilos en los polipéptidos dentro de la misma capa o en capas adyacentes pueden incrementar la resistencia

estructural. Los aminoácidos que contienen sulfidrilos incluyen cisteína y homocisteína. Además, un sulfidrilo se puede añadir a aminoácidos  $\beta$  tales como ácido D,L- $\beta$ -amino- $\beta$ -ciloheptilpropiónico; ácido D,L-3-aminobutanoico; o ácido 5-(metiltio)-3-aminopentanoico. Los aminoácidos que contienen sulfidrilos se pueden usar para "bloquear" (enlace conjunto) y "desbloquear" capas de una película de polipéptido de múltiples capas mediante un cambio en el potencial de oxidación. También, la incorporación de un aminoácido que contiene sulfidrilo en un motivo de secuencia de un polipéptido diseñado permite el uso de péptidos relativamente cortos en la fabricación de películas finas, en virtud de la formación de enlaces disulfuro intramoleculares. Los motivos de secuencias de aminoácidos que contienen aminoácidos que contienen sulfidrilo se pueden seleccionar entre una genoteca de motivos identificados usando los procedimientos descritos más adelante, o diseñarse de nuevo.

Los polipéptidos que contienen sulfidrilo diseñados, si se sintetizan químicamente o se producen en un organismo huésped, se pueden ensamblar por CACE en la presencia de un agente reductor para prevenir la formación de un enlace disulfuro prematuro. Después del ensamblaje de las películas, se retira el agente reductor y se añade un agente oxidante. En presencia del agente oxidante, los enlaces disulfuro se forman entre los grupos sulfidrilos, "bloqueando" por lo tanto conjuntamente los polipéptidos dentro de las capas y entre las capas donde están presentes los grupos tiol. Los agentes reductores adecuados incluyen ditioneitol ("DTI"), 2-mercaptoetanol (2-ME), glutatión reducido, clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), y combinaciones de más de uno de estos compuestos químicos. Los agentes oxidantes adecuados incluyen glutatión oxidado, terc-butilhidroperóxido (t-BHP), timerosal, diamida, 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitro-benzoico) (DTNB), 4,4'-ditiopiridina, bromato de sodio, peróxido de hidrógeno, tetrionato de sodio, porfirindina, ortiodosobenzoato de sodio, las combinaciones de más de uno de estos compuestos químicos.

La biocompatibilidad es un asunto de diseño en aplicaciones bioquímicas. En tales aplicaciones, se usa la información genómica o proteómica como una base para el diseño de polímero para producir, de manera ideal, polipéptidos "inmunitarios inertes". El enfoque será particularmente útil si el objeto fabricado o recubierto estará en contacto con la sangre circulante. Debido a que los motivos de secuencias de aminoácidos son altamente polares, típicamente se producen sobre la superficie de la forma plegada nativa de la proteína de la que se derivan. La "superficie" es esa parte de una proteína plegada que está en contacto con el disolvente o inaccesible para el disolvente únicamente debido a la naturaleza granular del agua. Los motivos de secuencias de aminoácidos identificados en las proteínas de la sangre siempre están eficazmente en contacto con las células y moléculas del sistema inmunitario mientras la proteína está en la sangre. Por lo tanto, es menos probable que los polipéptidos derivados de la superficie de las proteínas de sangre plegadas sean inmunógenos en comparación con las secuencias seleccionadas al azar. Los polipéptidos diseñados en general serán biocompatibles, pero el grado de respuesta inmunitaria o cualquier otro tipo de respuesta biológica puede bien depender de detalles específicos de un motivo de secuencia.

La bioactividad se puede incorporar en una película, revestimiento o microcápsula por un número de procedimientos. Por ejemplo, un polipéptido diseñado comprendido en la película puede comprender un dominio funcional. De manera alternativa, la bioactividad puede estar asociada a otra molécula bioactiva encapsulada o revestida por la película fina de polipéptido. El molde puede comprender una molécula bioactiva tal como un cristal de proteína.

Un dominio funcional en este contexto es una región independientemente termoestable de una proteína que tiene una biofuncionalidad específica (por ejemplo, fosfotirosina de unión). En una proteína de dominio múltiple, pueden existir dominios funcionales múltiples, como por ejemplo en la proteína tensina, que abarca un dominio de unión a fosfotirosina y un dominio de tirosina fosfatasa de proteína. La inclusión de un dominio funcional en un polipéptido diseñado incorporado en una película de múltiples capas puede proporcionar la película con una funcionalidad deseada, incluyendo, por ejemplo, unión de ligando específico, dirección in vivo, biosensibilización, y biocatálisis.

La molécula bioactiva puede ser una proteína, un fragmento funcional de una proteína, un fragmento funcional de una proteína que no es parte de un polipéptido diseñado, un complejo de proteínas, un oligopéptido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un ribosoma, un agente terapéutico activo, un fosfolípido, un polisacárido, un lipopolisacárido, un fragmento de membrana funcional, una estructura de membrana, un virus, un patógeno, una célula, un agregado de células, un orgánulo, un lípido, un carbohidrato, un agente farmacéutico, o un agente antimicrobiano. La molécula bioactiva puede estar en la forma de un cristal bien ordenado o amorfo. La proteína puede ser una enzima o un anticuerpo. El sustrato puede comprender la molécula bioactiva. En una realización, el sustrato tiene una molécula bioactiva dispuesta sobre su superficie antes del depósito de las capas de polipéptidos cargados de manera opuesta. En otra realización, el sustrato es un cristal que comprende la molécula bioactiva.

En un ejemplo, los motivos de secuencias de aminoácidos se diseñan de nuevo. En otros ejemplos, los motivos de secuencias de aminoácidos se seleccionan entre la información genómica o proteómica de un organismo específico, tal como el genoma humano. Por ejemplo, la estructura primaria de complemento C3 (gil68766) o lactotransferrina (gil4505043) se puede usar para investigar los motivos de secuencias de aminoácidos en una proteína de sangre humana.

Un procedimiento de identificación de un primer motivo de secuencia de aminoácidos en un polipéptido comprende seleccionar un resto de aminoácido iniciador en el polipéptido; examinar una secuencia de aminoácidos que comprende el resto de aminoácido iniciador y los siguientes  $n-1$  restos de aminoácido en el polipéptido para determinar las apariciones de cargas positivas y negativas, donde  $n$  es de 5 a 15; determinar los 5-15 restos de aminoácidos como un motivo de secuencia de aminoácidos si la carga neta de las cadenas laterales de los 5-15 restos de aminoácidos a pH 7

es mayor que o igual a  $0,4 \cdot n$ ; o descartar la secuencia si la carga neta de las cadenas laterales de los 5-15 restos de aminoácidos a pH 7 es menor que  $0,4 \cdot n$ .

Un procedimiento de búsqueda de datos de secuencia de proteínas para un motivo de secuencia de aminoácidos cargado negativamente de longitud  $n$  que comprende solamente aminoácidos que son neutros o cargados negativamente se describe como sigue. En primer lugar, un primer resto de aminoácido se selecciona en una secuencia de proteínas. En segundo lugar, este resto de aminoácido y los siguientes  $n-1$  restos de aminoácido se examinan para determinar las apariciones de arginina (Arg), histidina (His), o lisina (Lys) (los tres aminoácidos de origen natural que pueden estar cargados positivamente a pH neutro), donde  $n$  es de 5 a 15. En tercer lugar, si se encuentra uno o más restos Arg, His, o Lys en estos  $n$  restos de aminoácido, el procedimiento se comienza de nuevo en un segundo resto de aminoácido. Sin embargo, si no se encuentra Arg, His, ni Lys en estos  $n$  restos, los  $n$  restos se examinan para determinar el número de apariciones de glutamato (Glu) y/o aspartato (Asp) (los dos aminoácidos cargados negativamente a pH neutro). En cuarto lugar, si existen al menos  $0,4 \cdot n$  apariciones de Glu y/o Asp en los  $n$  restos, la secuencia se cataloga como un motivo de secuencias de aminoácidos cargados negativamente. Sin embargo, si se encuentran menos de  $0,4 \cdot n$  apariciones de aminoácidos cargados negativamente, la secuencia que comienza con el primer resto de aminoácidos se descarta y el procedimiento se comienza de nuevo, por ejemplo, en un segundo resto de aminoácido inmediatamente adyacente al primer resto de aminoácido. Después de catalogar un motivo, el procedimiento puede comenzar de nuevo en un segundo resto de aminoácido.

El procedimiento para identificar un motivo de secuencia cargado positivamente es análogo a la búsqueda de datos de secuencias de proteínas para una secuencia de aminoácidos de  $n$  restos de longitud que comprende solamente aminoácidos que son neutros o cargados positivamente, y para la que la magnitud de la carga neta de las cadenas laterales de los restos de aminoácidos a pH neutro es mayor que o igual a  $0,4 \cdot n$ .

También es análogo el procedimiento para identificar un motivo de secuencia de aminoácidos cargados negativamente o un motivo de secuencia de aminoácidos cargados positivamente de longitud  $n$ , permitiendo tanto restos de aminoácidos cargados positivamente como negativamente en el motivo. Por ejemplo, el procedimiento para identificar un motivo de secuencia de aminoácidos cargados positivamente de longitud  $n$  sería seleccionar un primer resto de aminoácido en un polipéptido. A continuación, examinar este resto de aminoácido y los siguientes  $n-1$  restos de aminoácidos para determinar las apariciones de los que están cargados positiva o negativamente a pH 7. Determinar la carga neta de las cadenas laterales de los  $n$  restos de aminoácidos. Si el valor absoluto de la carga neta es menor que  $0,4 \cdot n$ , entonces la secuencia se descarta y se comienza una nueva búsqueda en otro aminoácido, mientras que si el valor absoluto de la carga neta es mayor que o igual que  $0,4 \cdot n$ , entonces la secuencia es un motivo de secuencia de aminoácidos. El motivo será positivo si la carga neta es mayor que cero y negativa si la carga neta es menor que cero.

El diseño de nuevo de motivos de secuencias de aminoácidos como se ha definido actualmente sigue esencialmente reglas similares, excepto que las secuencias no se limitan a las encontradas en la naturaleza. Se eligen una longitud de motivo  $n$  y una señal deseada y magnitud de carga neta. Entonces, se seleccionan  $n$  aminoácidos para el motivo de secuencia de aminoácidos que dan como resultado la señal y magnitud de carga deseada, de manera que el valor absoluto de la carga neta de los  $n$  aminoácidos es mayor que o igual a  $0,4 \cdot n$ . Una ventaja potencial de diseño de nuevo de un motivo de secuencia de aminoácidos es que el profesional pueda seleccionar entre todos los aminoácidos (los 20 de origen natural y todos los aminoácidos no naturales) para lograr la carga neta deseada, mejor que limitarse a los aminoácidos encontrados en una secuencia de proteínas conocida particular. La combinación mayor de aminoácidos aumenta el intervalo potencial de características físicas, químicas y/o biológicas que se pueden seleccionar en el diseño de la secuencia del motivo comparado con la identificación de un motivo de secuencia de aminoácido en una secuencia genómica.

Un polipéptido diseñado como se ha definido actualmente comprenderá uno o más motivos de secuencias de aminoácidos. Se puede repetir el mismo motivo, o diferentes motivos se pueden unir en el diseño de un polipéptido para CACE. En una realización, los motivos de secuencias de aminoácidos están unidos de forma covalente sin intervención de la secuencia. En otra realización, un polipéptido diseñado comprende dos o más motivos de secuencias de aminoácidos unidos de forma covalente por un engarce. El engarce puede estar basado en aminoácido, por ejemplo, uno más restos de aminoácido tales como glicina o prolina, o puede ser cualquier otro compuesto adecuado para unir de forma covalente dos motivos de secuencias de aminoácidos. En una realización, un engarce comprende 1-4 restos de aminoácido, por ejemplo, 1-4 restos de glicina y/o prolina. El engarce comprende una longitud o composición adecuada de manera que el polipéptido diseñado se mantiene a una carga neta por resto que es mayor que o igual a 0,4.

En un ejemplo, un polipéptido diseñado es mayor que o igual a 15 restos de aminoácido de longitud. En otros ejemplos, un polipéptido diseñado es mayor que 18, 20, 25, 30, 32 ó 35 aminoácidos de longitud. 1.000 restos es un enlace superior práctico sobre la longitud de polímero.

Una vez que se han seleccionado o diseñado de nuevo los motivos de la secuencia de aminoácidos; un polipéptido diseñado con engarces a base de aminoácido se sintetiza usando procedimientos bien conocidos en la técnica, tal como síntesis en fase sólida y química F-moc, o expresión heteróloga en bacterias después de la clonación y transformación génica. Los polipéptidos diseñados se pueden sintetizar por una compañía de síntesis de péptido, por ejemplo, SynPep Corp. (Dublin, California), producirse en el laboratorio usando un sintetizador de péptidos, o producirse por

procedimientos de ADN recombinante. Cualquier desarrollo de procedimientos novedosos de síntesis de péptido puede potenciar la producción de péptidos pero no cambiaría fundamentalmente el diseño de péptido como se describe en el presente documento.

5 Un procedimiento de fabricación de una película de capas múltiples de polipéptido diseñada comprende depositar una pluralidad de capas de especies químicas cargadas de manera opuesta sobre un sustrato, en el que al menos una capa comprende un polipéptido diseñado. Los polielectrolitos depositados de manera exitosa tendrán cargas netas opuestas. La Figura 1 es un esquema que ilustra el depósito de CACE. El depósito de un polipéptido diseñado (u otro polielectrolito) puede comprender la exposición del sustrato a una solución acuosa que comprende un polipéptido diseñado (u otro polielectrolito) a un pH al que tiene una carga neta adecuada para CACE. El depósito de un polipéptido diseñado u otro polielectrolito sobre el sustrato también se puede lograr mediante pulverización secuencial de soluciones de polipéptidos cargados de manera opuesta. El depósito sobre el sustrato puede ser por pulverización simultánea de soluciones de polielectrolitos cargados de manera opuesta.

15 En el procedimiento de CACE de formación de una película de capas múltiples, las cargas opuestas de las capas adyacentes proporcionan la fuerza de impulso para el ensamblaje. No es crítico que los polielectrolitos en las capas opuestas tienen la misma densidad de carga lineal neta, solamente que las capas opuestas tienen cargas opuestas. Un procedimiento de ensamblaje de película estándar por depósito incluye formar soluciones acuosas de los poliones a un pH al que se ionizan (es decir, pH 4 - 10), proporcionar un sustrato que lleva una carga superficial, y alternar la inmersión del sustrato en las soluciones de polielectrolito cargadas. El sustrato opcionalmente se lava entre el depósito capa de alternación.

20 La concentración de polión adecuado para el depósito del polión se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica. Una concentración ejemplar es de 0,1 a 10 mg/ml. Típicamente, el espesor de la capa producida es sustancialmente independiente de la concentración de la solución del polión durante el depósito en el intervalo establecido. Para los polielectrolitos no polipeptídicos típicos tales como poli(ácido acrílico) y poli(clorhidrato de alilamina); los espesores de la capa típicos son de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 Å, dependiendo de la fuerza iónica de la solución. Los polielectrolitos cortos típicamente forman capas más finas que los polielectrolitos largos. Con respecto al espesor de la película, el espesor de la película de polielectrolito depende de la humedad así como del número de capas y composición de la película. Por ejemplo, películas de PLL/PLGA de 50 nm de espesor se encogen hasta 1,6 nm después de secar con nitrógeno. En general, se pueden formar películas de 1 nm a 100 nm o más de espesor dependiendo del estado de hidratación de la película y del peso molecular de los polielectrolitos empleados en el ensamblaje.

25 Además, el número de capas requerido para formar una película de capas múltiples de polielectrolito estable dependerá de los polielectrolitos en la película. Para las películas que comprenden solamente capas de polipéptido de bajo peso molecular, una película típicamente tendrá 4 o más bicapas de polipéptidos cargados de manera opuesta. Para las películas que comprenden polielectrolitos de alto peso molecular tales como poli(ácido acrílico) y poli(clorhidrato de alilamina), pueden ser estables películas que comprenden una única bicapa de polielectrolito cargado de manera opuesta.

35 Se contempla que una respuesta inmunitaria se puede provocar mediante la presentación de cualquier proteína o péptido que pueda provocar tal respuesta. En una realización, el antígeno es un epítipo clave que da lugar a una fuerte respuesta inmunitaria a un agente particular de enfermedad infecciosa, es decir, un epítipo inmunodominante. Si se desea, se puede incluir más de un antígeno o epítipo en la composición inmunógena con el fin de aumentar la probabilidad de una respuesta inmunitaria.

40 En una realización la solubilidad del primer polipéptido antigénico de las capas a pH de 4 a 10 es mayor que o igual a aproximadamente 1 mg/ml. La solubilidad es una limitación práctica para facilitar el depósito de los polipéptidos de la solución acuosa. Un límite superior práctico en el grado de polimerización de un polipéptido antigénico es aproximadamente 1.000 restos. Sin embargo, es concebible que se puedan producir polipéptidos compuestos más largos por un procedimiento de síntesis apropiado.

45 En una realización, el polipéptido antigénico comprende un único determinante antigénico (3) flanqueado por dos regiones de adsorción de superficie, una región de adsorción superficial N-terminal (1) y una región de adsorción superficial C-terminal (2). (Figura 2)

50 Cada una de las regiones independientes (por ejemplo, regiones determinantes antigénicas (1) y regiones de adsorción superficial (2,3)) del polipéptido antigénico se puede sintetizar de manera separada mediante síntesis en fase en solución, síntesis en fase sólida, o ingeniería genética de un organismo huésped adecuado. (Figura 3) La síntesis en fase en solución es el procedimiento usado para la producción de la mayoría de los agentes farmacéuticos peptídicos aprobados en el mercado hoy. El procedimiento en fase en solución se puede usar para sintetizar péptidos relativamente largos e incluso proteínas pequeñas. Los péptidos más largos que se han producido por el procedimiento en fase en solución son calcitoninas (32 meros). Más comúnmente, el procedimiento se usa para producir péptidos de longitud pequeña o media en cantidades de hasta cientos de kilogramos. Es posible producir cantidades tan grandes de los péptidos deseados en una instalación que siga las buenas prácticas de fabricación.

De manera alternativa, las diversas regiones independientes se pueden sintetizar conjuntamente como una única cadena de polipéptidos mediante síntesis en fase en solución, síntesis en fase sólida, o ingeniería genética en un organismo huésped adecuado. La elección del enfoque en cualquier caso particular será una cuestión de conveniencia o económica.

5 Si las diversas regiones determinantes antigénicas y regiones de adsorción superficial se sintetizan de manera separada (Figura 3), una vez purificadas, por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico seguido de cromatografía líquida de alto rendimiento, se unen mediante síntesis de enlace peptídico (Figura 4). Esto es, la región de adsorción superficial N-terminal (1), la región determinante antigénica (3) y la región determinante antigénica C-terminal (2) se unen de forma covalente para producir el polipéptido antigénico (4). El enfoque es similar a la llamada síntesis híbrida, en la que se sintetizan segmentos de péptido con cadenas laterales completamente protegidas por la técnica en fase sólida y después se unen por enlaces peptídicos en un procedimiento en fase en solución o en fase sólida. Este enfoque híbrido se ha aplicado a la síntesis de T20, un péptido de 36 restos de aminoácido, pero no ha sido ampliamente explotada.

15 La Figura 5 ilustra una realización de un polipéptido antigénico que comprende dos regiones de adsorción superficial (120 y 130) y una región determinante antigénica (110). 120 es la región de adsorción superficial N-terminal. 130 es la región de adsorción C-terminal. Cada región de adsorción superficial comprende uno o más motivos de secuencias de aminoácidos. Un polipéptido antigénico es una combinación única de región/regiones de adsorción superficial y región/regiones determinante(s) antigénica(s) en una única cadena de polipéptidos. Las secuencias peptídicas de engarce (140) se pueden usar para generar un polipéptido compuesto que comprende regiones determinantes antigénicas en una única cadena de polipéptidos. En una realización, la región determinante antigénica (110) es una pequeña región funcional que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 130 restos de aminoácido, y que tiene un diámetro de aproximadamente 2 nm. En una realización alternativa, la región determinante antigénica (110) es una gran región funcional que comprende aproximadamente 250 restos de aminoácido, y que tiene un diámetro de aproximadamente 4 nm. La longitud del resto de 16 aminoácidos en conformación extendida es de aproximadamente 5,5 nm.

25 En una realización, un polipéptido antigénico comprende una región determinante antigénica y una región de adsorción superficial, en la que la región de adsorción superficial comprende dos motivos de secuencias de aminoácidos. En otra realización, un polipéptido antigénico comprende una región determinante antigénica y dos regiones de adsorción superficial, una unida al extremo N de la región determinante antigénica y una unida al extremo C de la región determinante antigénica, en la que cada región de adsorción superficial comprende uno o más motivos de secuencia de aminoácidos y las dos regiones de adsorción superficial son iguales o diferentes y tienen la misma polaridad. (Figura 2) El propósito de la(s) región/regiones de adsorción superficial es permitir la adsorción del polipéptido sobre una superficie cargada de manera opuesta con el fin de construir una película de capas múltiples.

35 El número de regiones de adsorción superficial en un polipéptido antigénico con relación al número y/o longitud de las regiones determinantes antigénicas está relacionado con el requisito de solubilidad. Por ejemplo, si la región determinante antigénica es una secuencia de aminoácidos corta de, por ejemplo, tres restos de aminoácido, solamente un motivo de secuencia de aminoácidos de al menos 12 restos de aminoácido se requerirá para adsorber el polipéptido antigénico sobre una superficie cargada adecuadamente. Si por el contrario, la región determinante antigénica es un dominio estructural plegado soluble de una proteína que comprende, por ejemplo, 120 restos de aminoácido, dos motivos de secuencias de aminoácidos típicamente serán suficientes para impartir suficiente carga para que el polipéptido antigénico sea soluble en agua y adecuado para adsorción. Los motivos pueden ser contiguos y localizados en el extremo N del dominio, contiguos y localizados en el extremo C del dominio, o no contiguos con uno en el extremo N y uno en el extremo C.

45 La longitud combinada de las regiones de adsorción superficial se relaciona más con la disipación debida a la energía térmica, que se debe superar por la adsorción de péptido antigénico para se produzca de manera espontánea, que con el número de restos de aminoácido en la región determinante antigénica del polipéptido antigénico. Por lo tanto, incrementando el grado de polimerización de la región determinante antigénica por un factor de dos no se requieren necesariamente regiones de adsorción superficial el doble de largas para una unión eficaz de las regiones de adsorción superficial del polipéptido antigénico. La base física de la adsorción de un polipéptido antigénico a una superficie es la atracción electroestática (y liberación de contraiones a la solución en volumen a granel), la masa precisa del dominio es de importancia secundaria en la escala de longitud de nanómetros, y la "fuerza" principal que contrarresta la adsorción del polipéptido antigénico es la energía térmica. En vista de esto, un experto en la técnica puede diseñar fácilmente regiones de adsorción superficial que sean adecuadas para la adsorción física a una superficie de la región determinante antigénica particular de interés.

55 Una región determinante antigénica comprende de 3 a aproximadamente 250 restos de aminoácido. El término región determinante antigénica incluye tanto motivos antigénicos como dominios antigénicos. Los motivos antigénicos son relativamente cortos y por lo tanto en general no tienen un pliegue tridimensional compacto; no obstante, pueden mostrar antigenicidad específica. Aunque los motivos antigénicos en general no tienen un pliegue tridimensional compacto pueden comprender elementos de estructura secundaria tales como hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$ . Cuando la región determinante antigénica es un motivo antigénico, típicamente comprenderá de 3 a aproximadamente 50 restos de aminoácido. Cuando la región determinante antigénica es un dominio antigénico, típicamente comprenderá de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 restos de aminoácido.

Un dominio antigénico se define en el presente documento como al menos una parte de un polipéptido que, cuando está plegado, crea su propio núcleo hidrófobo. Una proteína nativa, por ejemplo, puede contener una pluralidad de dominios estructurales, cada uno de los cuales actúa como una unidad independiente de estructura y función. La función biológica de un dominio puede ser completa e independiente de la función del otro, como en el caso de un dominio catalítico y un dominio de unión en la misma cadena de polipéptidos, en la que los dos dominios no interactúan entre sí en modo alguno. Las interacciones estructurales entre los dominios en una proteína nativa no solamente son posibles, sino que son relativamente comunes; en tales casos la interacción entre un dominio estructural y otro dominio estructural se pueden ver como un tipo de estructura cuaternaria.

Como se usa en el presente documento, un dominio antigénico típicamente tiene un mínimo de aproximadamente 50 restos de aminoácido y un máximo de aproximadamente 250 restos de aminoácido. En principio, cualquier dominio antigénico de una proteína se puede emplear en un péptido antigénico como se indica en el presente documento mientras que el polipéptido antigénico tenga la solubilidad acuosa apropiada para el depósito de CACE. En una realización, el dominio antigénico tiene una solubilidad en agua a pH de 4 a 10 mayor que 50 µg/ml. En otra realización, el dominio antigénico tiene una solubilidad en agua a pH de 4 a 10 mayor que o igual a 1 mg/ml. En otra realización, el primer polipéptido de capas antigénico comprende al menos dos motivos de secuencias de aminoácidos cuando la región determinante antigénica comprende un dominio antigénico.

El polipéptido antigénico, cuando comprende un motivo antigénico en lugar de un dominio funcional, típicamente tendrá una magnitud de la carga neta por resto mayor que o igual a 0,4. Sin embargo si el motivo antigénico tiene una carga neta por resto de menos de 0,4, la una o más regiones de adsorción superficial típicamente tendrán una magnitud de la carga neta por resto mayor que 0,4 para compensar y proporcionar al polipéptido antigénico las propiedades de carga apropiadas para la solubilidad y adsorción física.

Un polipéptido o antígeno puede contener uno o más determinantes antigénicos. Un determinante antigénico puede referirse a una parte inmunógena de un polipéptido de múltiples cadenas.

El polipéptido antigénico como se describe en el presente documento comprende una región determinante antigénica de un antígeno seleccionado de antígenos víricos, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de parásito y las combinaciones que comprenden una o más de las regiones determinantes antigénicas anteriores.

En una realización, la región determinante antigénica comprende un antígeno vírico. Los antígenos víricos adecuados incluyen, pero no se limitan a, antígenos retrovíricos tales como antígenos de VIH-1 incluyendo los productos génicos de los genes gag, pol, y env, la proteína Nef, transcriptasa inversa, y otros componentes de VIH; antígenos víricos de hepatitis tales como las proteínas S, M y L proteínas del virus de hepatitis B, el antígeno pre-S del virus de hepatitis B, y otras hepatitis, por ejemplo, hepatitis A, B, y C, componentes víricos; antígenos víricos de la gripe tales como hemaglutinina y neuraminidasa y otros componentes víricos de la gripe; antígenos víricos de sarampión tales como la proteína de fusión de virus de sarampión y otros componentes del virus de sarampión; antígenos víricos de rubéola tales como las proteínas E 1 y E2 componentes del virus de rubéola; antígenos rotavíricos tales como VP7sc y otros componentes rotavíricos; antígenos citomegalovíricos tales como glucoproteína B de envuelta y otros componentes antigénicos citomegalovíricos; antígenos víricos sincitiales respiratorios tal como la proteína M2 y otros componentes antigénicos víricos sincitiales respiratorios; antígenos víricos de herpes simple tales como proteínas tempranas inmediatas, glucoproteína D, y otros componentes de antígenos víricos de herpes simple; antígenos víricos de varicela zóster tales como gpl, gpII, y otros componentes de antígenos víricos de varicela zóster; antígenos víricos de encefalitis japonesa tales como proteínas E, M-E, M-E-NS 1, NS 1, NS 1-NS2A, 80%E, y otros componentes de antígenos víricos de encefalitis japonesa; antígenos víricos de rabia tal como glucoproteína de rabia, nucleoproteína de rabia y otros componentes de antígenos víricos de rabia; y las combinaciones que comprenden una o más de las regiones determinantes antigénicas anteriores.

En otra realización, la región determinante antigénica comprende un antígeno bacteriano. Los antígenos bacterianos adecuados incluyen, pero no se limitan a, antígenos bacterianos de tos ferina tales como toxina de tos ferina, hemaglutinina filamentosa, pertactina, FIM2, FIM3, adenilato ciclase y otros componentes de antígenos bacterianos de tos ferina; antígenos bacterianos de difteria tales como toxina o toxoide de difteria y otros componentes de antígenos bacterianos de difteria; antígenos bacterianos de tétanos tales como toxina o toxoide de tétanos y otros componentes de antígenos bacterianos de tétanos; antígenos bacterianos de estreptococos tales como proteínas M y componentes de antígenos bacterianos de estreptococos; antígenos bacterianos de bacilos gram positivos; antígenos bacterianos de Mycobacterium tuberculosis tales como la proteína 65 de choque térmico (HSP65), la proteína secretada principal de 30 kDa, antígeno 85A y otros componentes de antígenos micobacterianos; componentes de antígenos bacterianos de Helicobacter pylori; antígenos bacterianos de neumococos tales como neumolisina, y otros componentes antígenos bacterianos de neumococos; antígenos bacterianos de gripe hemófila; antígenos bacterianos de ántrax tales como antígeno protector de ántrax y otros componentes de antígenos bacterianos de ántrax; antígenos bacterianos de rickettsiae tales como romps y otros componentes de antígenos bacterianos de rickettsias; y las combinaciones que comprenden una o más de las regiones determinantes antigénicas anteriores.

En otra realización, la región determinante antigénica comprende un antígeno fúngico. Los antígenos fúngicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, componentes de antígenos fúngicos de cándida; antígenos fúngicos de histoplasma tales como la proteína 60 de choque térmico (HSP60) y otros componentes de antígenos fúngicos de

5 histoplasma; antígenos fúngicos de criptococo tales como polisacáridos capsulares y otros componentes de antígenos fúngicos de criptococo; antígenos fúngicos de Coccidioides tales como antígenos de esférula y otros componentes de antígenos fúngicos de Coccidioides, y antígenos fúngicos de tiña tales como tricofitina y otros componentes de antígenos fúngicos de Coccidioides; y combinaciones que comprenden una o más de las regiones determinantes antigénicas anteriores.

10 En otra realización, la región determinante antigénica comprende un antígeno de parásito. Los antígenos de protozoos y de otros parásitos adecuados incluyen, pero no se limitan a, antígenos de Plasmodium falciparum tales como antígenos de superficie de merozoíto, antígenos de superficie de esporozoíto, antígenos de circumsporozoíto, antígenos de superficie de gametocito/gameto, antígeno pf 1 55/RESA de etapa sanguínea y otros componentes de antígenos plasmociales; antígenos de toxoplasma tales como SAG-1, p30 y otros componentes de antígenos de toxoplasma; antígenos de esquistosomas tales como glutatión-S-transferasa, paramiosina, y otros componentes de antígenos de esquistosomas; antígenos de Leishmania mayor y de otras leishmaniasis tales como gp63, lipofosfoglicano y su proteína asociada y otros componentes de antígenos de leishmaniasis; y antígenos de Trypanosoma cruzi tales como el antígeno de 75 - 77 kDa, el antígeno de 56 kDa y otros componentes de antígeno de tripanosomas; y las combinaciones que comprenden uno o más de los antígenos de los parásitos anteriores.

15 El conocimiento de determinantes o epítomos para antígenos del patógeno de la enfermedad objetivo puede ser un punto de partida útil para el desarrollo de vacunas de péptidos sintéticos. Cuanto más que se conoce sobre un patógeno, sus mecanismos de acción, y cómo responde sistema inmunitario a la infección, mayores son las probabilidades de preparar una vacuna exitosa. La determinación completa de la estructura del genoma de un patógeno es un procedimiento rápido y rutinario que puede ayudar en la determinación de los sitios del determinante antigénico para conocer patógenos.

20 Los procedimientos y las técnicas para determinar la localización y composición de un determinante antigénico o epítomo para un anticuerpo específico se conocen bien en la técnica. Estas técnicas se pueden usar para identificar y/o caracterizar epítomos para uso como regiones determinantes antigénicas. Los procedimientos de mapeo/caracterización de un epítomo para un anticuerpo específico de antígeno se pueden determinar por "impresión de huellas" de epítomo usando modificación química de las aminos/carboxilos en la proteína antigénica. Un ejemplo de tal técnica de impresión de huellas es el uso de HXMS (intercambio hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en el que se produce un intercambio hidrógeno/deuterio de protones de amida de proteína de receptor y de ligando, una unión, y de nuevo un intercambio, en el que los grupos amida de la estructura central que participan en la unión de proteína están protegidos del intercambio de nuevo y por lo tanto permanecerán deuterados. Se pueden identificar regiones relevantes en este punto mediante proteólisis péptica, separación por cromatografía líquida de alto rendimiento de Microbore rápida, y/o espectrometría de masas de ionización por electropulverización.

25 Otra técnica de identificación de epítomos adecuada es mapear el epítomo por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), en la que se comparan, típicamente, la posición de las señales en los espectros de RMN bidimensionales del antígeno libre y del antígeno complejado con el péptido de unión a antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno típicamente se marca selectivamente con isótopos con  $^{15}\text{N}$  de manera que se observan solamente las señales que corresponden al antígeno y ninguna señal del péptido de unión a antígeno en el espectro de RMN. Las señales de antígeno que se originan de los aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión a antígeno típicamente desplazarán la posición en los espectros del complejo comparados con los espectros del antígeno libre, y los aminoácidos implicados en la unión se pueden identificar de esa manera.

30 En otro ejemplo, el mapeo/caracterización de epítomos se puede realizar mediante exploración de péptido. En este enfoque, una serie de péptidos de superposición que atraviesan la longitud completa de la cadena de polipéptidos de un antígeno se preparan y se ensayan de manera individual con respecto a la inmunogenicidad. El título de anticuerpo del antígeno de péptido correspondiente se determina por un procedimiento estándar, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. Los diversos péptidos se pueden clasificar a continuación con respecto a la inmunogenicidad, proporcionando una base empírica para la selección de diseño de péptido para el desarrollo de vacuna.

35 En otro ejemplo, las técnicas de digestión por proteasa también pueden ser útiles en el contexto de mapeo e identificación de epítomos. Las regiones/secuencias relevantes determinantes antigénicas se pueden determinar por digestión por proteasa, por ejemplo, por el uso de tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 con respecto a la digestión de proteína antigénica durante toda una noche (0/N) a 37°C y pH 7-8, seguido de análisis de espectrometría de masas (EM) para la identificación de péptidos. Los péptidos protegidos de la escisión por tripsina por la proteína antigénica se pueden identificar posteriormente por comparación de muestras sometidas a digestión por tripsina y muestras incubadas con CD38BP y después someter a digestión mediante, por ejemplo, tripsina (revelando por tanto una impresión de huella para el enlace). Otras enzimas como la quimotripsina, pepsina, etc. se pueden usar también o de manera alternativa en un procedimiento de caracterización de epítomo similar. Además, la digestión por proteasa puede proporcionar un procedimiento rápido para la determinación de la localización de una secuencia determinante antigénica potencial dentro de una proteína antigénica conocida usando un anticuerpo conocido.

40 En una realización, la composición inmunógena comprende una pluralidad de regiones determinantes antigénicas, o bien sobre el mismo o diferentes polipéptidos antigénicos. La pluralidad de determinantes antigénicos puede ser del

5 mismo o diferentes agentes infecciosos. En una realización, la composición inmunógena comprende una pluralidad de polipéptidos antigénicos únicos. En otra realización, la composición inmunógena comprende una pluralidad de péptidos inmunógenos que comprenden múltiples regiones determinantes antigénicas dentro de cada polipéptido. En otra realización, el polipéptido es un péptido conjugado que comprende una mezcla de péptidos antigénicos conjugados a un resto lipídico, o conjugados a un resto de proteína vehículo. Una ventaja de estas composiciones inmunógenas es que múltiples determinantes antigénicos o múltiples conformaciones de un único determinante antigénico lineal pueden estar presentes en una única partícula de vacuna sintética. Tales composiciones con múltiples determinantes antigénicos pueden proporcionar potencialmente anticuerpos contra múltiples epítomos, incrementando las probabilidades de que al menos alguno de los anticuerpos generados por el sistema inmunitario del organismo neutralizará el patógeno o antígenos específicos diana en células cancerosas, por ejemplo.

10 En una realización, la composición inmunógena comprende una pluralidad de polipéptidos antigénicos, en la que cada uno de los polipéptidos antigénicos es un inmunógeno del mismo patógeno. Opcionalmente, la composición inmunógena incluye una pluralidad de polipéptidos antigénicos dirigida a diferentes epítomos del mismo patógeno. Los diferentes epítomos se encuentran opcionalmente en regiones en cercana proximidad de la superficie del patógeno. De este modo, en una realización, el primer polielectrolito de capas comprende dos o más determinantes antigénicos. En otra realización, la película de capas múltiples comprende un segundo polipéptido antigénico que comprende una o más segundas regiones de adsorción superficial unidas a una o más segundas regiones determinantes antigénicas, en las que el segundo polipéptido antigénico y la una o más segundas regiones de adsorción superficial tienen la misma polaridad, en la que la una o más segundas regiones de adsorción superficial comprenden uno o más segundos motivos de secuencias de aminoácidos, el uno o más segundos motivos de secuencia de aminoácidos que consisten en de 5 a 15 aminoácidos y que tienen una magnitud de carga neta por resto mayor que o igual a 0,4, y en la que la una o más segundas regiones determinantes antigénicas comprenden de 3 a aproximadamente 250 restos de aminoácido, en la que el segundo polipéptido antigénico no es un homopolímero, es de al menos 15 aminoácidos de longitud, y tiene una solubilidad acuosa a pH de 4 a 10 mayor que 50 µg/ml.

25 La inmunogenicidad de una composición inmunógena se puede potenciar de varias formas. En una realización, la película de capas múltiples comprende opcionalmente una o más moléculas bioactivas inmunógenas adicionales. Aunque no necesariamente, la una o más moléculas bioactivas inmunógenas adicionales típicamente comprenderán uno o más determinantes antigénicos adicionales. Las moléculas bioactivas inmunógenas adicionales adecuadas incluyen, por ejemplo, un fármaco, una proteína, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un lípido, un fosfolípido, un carbohidrato, un polisacárido, un lipopolisacárido, o una combinación que comprende una o más de las moléculas bioactivas anteriores. Otros tipos de potenciadores inmunitarios adicionales incluyen un fragmento de membrana funcional, una estructura de membrana, un virus, un patógeno, una célula, un agregado de células, un orgánulo, o una combinación que comprende una o más de las estructuras bioactivas anteriores.

35 En una realización, la película de capas múltiples comprende opcionalmente una o más moléculas bioactivas adicionales. La una o más moléculas bioactivas adicionales pueden ser un fármaco. De manera alternativa, la composición inmunógena está en forma de una carcasa hueca o un revestimiento que rodea un núcleo. El núcleo comprende una diversidad de encapsuladores diferentes, por ejemplo, una o más moléculas bioactivas adicionales, incluyendo, por ejemplo, un fármaco. De este modo, las composiciones inmunógenas diseñadas como se describe en el presente documento también se pueden usar para tratamiento combinado, por ejemplo, provocando una respuesta inmunitaria y para la administración de fármacos dirigida. Los "núcleos" del tamaño de micrómetros de un material terapéutico adecuado en forma "cristalina" se pueden encapsular por una composición inmunógena que comprende los polipéptidos antigénicos, y las microcápsulas resultantes se pueden usar para la administración de fármacos. El núcleo puede ser insoluble bajo algunas condiciones, por ejemplo alto pH o baja temperatura, y soluble en las condiciones en las que se produce liberación controlada. La carga superficial sobre los cristales se puede determinar por medidas de potencial  $\zeta$  (usado para determinar la carga en unidades electrostáticas sobre partículas coloidales en un medio líquido). La velocidad a la que el contenido de la microcápsula se libera desde el interior de la microcápsula al ambiente circundante dependerá de varios factores, incluyendo el espesor de la carcasa de encapsulación, los polipéptidos antigénicos usados en la carcasa, la presencia de enlaces disulfuro, el grado de reticulación de los péptidos, temperatura, fuerza iónica, y el procedimiento usado para ensamblar los péptidos. En general, cuanto mayor es el espesor de la cápsula, más largo es el tiempo de liberación.

50 En otra realización, la biomolécula inmunógena adicional es una secuencia de ácido nucleico que puede dirigir la síntesis en un organismo huésped de un inmunógeno deseado o que interfiere con la expresión de información genética de un patógeno. En el caso anterior, tal secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, se inserta en un vector de expresión adecuado mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Los vectores de expresión adecuados para producir una transferencia de genes con alta eficiencia in vivo incluyen vectores retrovíricos, adenovíricos y víricos de vaccinia. Los elementos operacionales de tales vectores de expresión incluyen al menos un promotor, al menos un operador, al menos una secuencia líder, al menos un codón terminador, y cualesquiera otras secuencias de ADN necesarias o preferidas para la transcripción apropiada y posterior traducción del ácido nucleico del vector. En particular, se contempla que tales vectores contendrán al menos un origen de replicación reconocido por el organismo huésped junto con al menos un marcador seleccionable y al menos una secuencia promotora que pueda iniciar la transcripción de la secuencia de ácido nucleico. En el último caso, se prepararán múltiples copias de tal secuencia de ácido nucleico para su administración, por ejemplo, mediante encapsulación de los ácido nucleicos dentro de una película de capas múltiples de polipéptido en forma de una cápsula para su administración intravenosa.

En la construcción de un vector de expresión recombinante, se debe indicar adicionalmente que se pueden insertar múltiples copias de la secuencia de ácido nucleico de interés (E1 o bien núcleo) y sus elementos operacionales asistentes en cada vector. En tal realización, el organismo huésped produciría mayores cantidades por vector de la proteína E1 o de núcleo deseada. El número de copias múltiples de la secuencia de ácido nucleico que se puede insertar en el vector está limitado solamente por la capacidad del vector resultante debido a su tamaño, a ser transferida y replicarse y transcribirse en el microorganismo huésped apropiado.

En una realización adicional, La composición inmunógena comprende una mezcla de péptidos antigénicos/moléculas bioactivas inmunógenas. Éstos se pueden derivar del mismo antígeno, pueden ser antígenos diferentes del mismo agente o enfermedad infecciosa, o pueden ser de diferentes agentes o enfermedades infecciosas. Por lo tanto el complejo o mezcla inducirá una respuesta inmunitaria contra varios antígenos y posiblemente varios agentes o enfermedades infecciosas como se especifica por los componentes de péptido/proteína antigénicos del sistema de administración.

En una realización, la composición inmunógena provoca una respuesta del sistema inmunitario a un patógeno. En una realización, una composición de vacuna comprende la composición inmunógena en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. De este modo un procedimiento de vacunación contra una enfermedad patogénica comprende la administración a un sujeto en necesidad de vacunación de una cantidad eficaz de la composición inmunógena.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, partículas de virus inactivos, y similares. También se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables en la composición, por ejemplo, sales minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, o sulfatos, así como las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, o benzoatos. La composición también puede contener líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol, y etanol, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes o agentes de tamponación de pH. Los liposomas también se pueden usar como vehículos.

Un procedimiento de generación de una respuesta inmunitaria contra una enfermedad o patógeno en un vertebrado (por ejemplo, vacunación) comprende la administración de la composición inmunógena. En una realización, el polipéptido antigénico está en la capa más exterior o expuesta al disolvente de la película de capas múltiples. La composición inmunógena se puede administrar por vía oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, sublingual, o transdérmica, o bien con o sin una dosis de recuerdo. En general, las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad que sea profiláctica y / o terapéuticamente eficaz. Las cantidades precisas de la composición inmunógena a administrar dependen del juicio del profesional y pueden ser peculiares para cada sujeto. Será evidente para los expertos en la técnica que la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunógena dependerá, entre otros, del programa de administración, la dosis unitaria de antígeno administrado, si las composiciones se administran en combinación con otros agentes terapéuticos, y el estado inmunitario y de salud del receptor. Una dosificación terapéuticamente eficaz se puede determinar por el trabajador médico experto en la técnica basándose en las características del paciente (edad, peso, sexo, condición, complicaciones, otras enfermedades, etc.), como se conoce bien en la técnica. Además, a medida que se llevan a cabo estudios de rutina adicionales, emergerá más información específica con relación a los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento de diversas afecciones en diversos pacientes, y el trabajador experto en la técnica, considerando el contexto terapéutico, edad y salud general del receptor, es capaz de determinar la dosificación apropiada.

La composición inmunógena comprende opcionalmente un adyuvante. Los adyuvantes, en general, comprenden sustancias que disparan la respuesta inmunitaria del huésped de una manera no específica. La selección de un adyuvante depende del sujeto que se va a vacunar. Preferentemente, se usa un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una vacuna para un ser humano debe evitar adyuvantes en emulsión oleosa o de hidrocarburos, incluyendo adyuvante de Freund completo e incompleto. Un ejemplo de un adyuvante adecuado para su uso son seres humanos es el alumbre (gel de alúmina). Sin embargo, una vacuna para un animal puede contener adyuvantes no apropiados para su uso con seres humanos.

La invención se ilustra además con los siguientes ejemplos no limitantes.

#### EJEMPLOS

Ejemplo 1: Composición de vacuna para HIV-1 con un único determinante antigénico

El polipéptido antigénico comprende una única región determinante antigénica, en la que la región determinante antigénica es una secuencia de polipéptidos de un patógeno y la región de adsorción superficial se localiza en el extremo N de la región determinante antigénica. En un ejemplo, la región determinante antigénica es un determinante antigénico en un patógeno conocido, por ejemplo, VIH-1, por ejemplo, péptido ARP7022, o DQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNC (SEQ ID NO: 1). Un polipéptido antigénico adecuado comprende:

KKKAKKKGKKKAKKKGDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNC (SEQ ID NO: 2)

La región de adsorción superficial del péptido antigénico comprende KKKAKKKGKKKAKKKG (SEQ ID NO: 3). La secuencia de ARP7022 de 24 restos (SEQ ID NO. 1) representa una región inmunodominante conservada de la glucoproteína 41 de VIH-1 (restos 593-616) y se reconoce por la mayoría de los sero positivos de VIH europeos y africanos (Lange et al. (1993) AIDS 7, 461). El péptido de longitud completa correspondiente a la SEQ ID NO. 2 se sintetiza por uno de los cualesquiera medios conocidos en la técnica. Se preparan virus artificiales con este péptido de numerosas formas, por ejemplo, depositando por LBL composiciones inmunógenas que comprenden 5 bicapas de poli(L-lisina) y poli(L-ácido glutámico) y una capa final del péptido que corresponde a la SEQ ID NO. 2 sobre micropartículas de 3 µm de diámetro de carbonato de calcio. Los virus artificiales preparados de esta forma tienen una capa exterior o expuesta a la superficie que está formada de múltiples copias del péptido inmunógeno representado por la SEQ ID NO. 2. La concentración de polipéptido para la adsorción de cada capa es de 2 mg·ml<sup>-1</sup> en una solución acuosa a pH 7. El tiempo de adsorción para cada capa es de 20 min. Las micropartículas se "enjuagan" entre cada etapa de adsorción de péptido por centrifugación. En algunos casos, las partículas de molde de carbonato de calcio de la construcción de virus final artificial se disuelven por tratamiento con EDTA. Las estructuras preparadas de este modo se pueden denominar virus artificiales o vacunas sintéticas: "Se despliegan" sobre sus determinantes antigénicos de superficie, en el caso presente de las múltiples copias de un determinante antigénico conocido por provocar una respuesta inmunitaria que genera anticuerpos que reconocen el VIH-1 intacto. La tecnología es prometedora para la medicina preventiva y el tratamiento de VIH -1.

#### Ejemplo 2: Composición de vacuna para VIH-1 con múltiples determinante antigénicos

Existen dos tipos principales de composiciones inmunógenas con múltiples determinantes antigénicos: 1) cada polipéptido antigénico adsorbido de manera simultánea comprende una pluralidad idéntica de regiones determinantes antigénicas, en la que las regiones determinantes antigénicas del polipéptido son las mismas o diferentes y las regiones determinantes antigénicas se basan en el mismo o diferente patógeno, y 2) múltiples péptidos antigénicos adsorbidos de manera simultánea cada uno de ellos comprenden una de una pluralidad de unidades funcionales, en la que las regiones funcionales están o no basadas en el mismo patógeno. Es importante mencionar que las soluciones mixtas de los dos tipos de péptido, en principio, no son menos útiles para la fabricación de la capa superficial de un virus artificial que las soluciones de un tipo indicado o el otro. Las regiones de adsorción superficial de cualquier tipo serán de manera ordinaria pero no necesariamente idénticas de péptido a péptido. Además, las regiones de adsorción superficial se pueden localizar en el extremo N del péptido antigénico compuesto, en el extremo C, entre regiones funcionales en el mismo péptido compuesto, o alguna combinación de estas posibilidades.

Composición inmunógena de tipo 1 con múltiples determinantes antigénicos. En este ejemplo, el polipéptido antigénico comprende dos secuencias antigénicas en la región determinante antigénica, en la que ambas secuencias antigénicas son del mismo patógeno y existen regiones de adsorción superficial localizadas en el extremo N de la región determinante antigénica, en el extremo C de la región determinante antigénica, y entre las secuencias antigénicas. En un ejemplo, los determinantes antigénicos son de un patógeno conocido, por ejemplo, VIH-1, por ejemplo, péptido ARP7022, o DQQLLGIWGC SGKLICTTAVPWNC (SEQ ID NO: 1), y LQARILAVERYLKDQQL (SEQ ID NO: 4). Un polipéptido antigénico adecuado comprende:

KKKAKKKGKKKAKKKGDQQLLGIWGC SGKLICTTAVPWNC GKKKAKKKGKKKAKKKGLQARILAVERYLKDQQLKKKAKKKGKKKAKKKG (SEQ ID NO: 5)

Las regiones de adsorción superficial del péptido antigénico compuesto comprenden KKKAKKKGKKKAKKKG (SEQ ID NO: 3). La SEQ ID NO. 4 corresponde a los restos 67 - 83 de la glucoproteína 41 de VIH-1. Como antes, el péptido de longitud completa que corresponde a la SEQ ID NO. 5 se sintetiza mediante uno cualquiera de los medios conocidos en la técnica. Los virus artificiales se preparan con este péptido mediante varias formas, por ejemplo, depositando por LBL composiciones inmunógenas que comprenden 5 bicapas de poli(L-lisina) y poli(L- ácido glutámico) y una capa final del péptido correspondiente a la SEQ ID NO. 5 sobre micropartículas de 3 µm de diámetro de carbonato de calcio. Los virus artificiales preparados de esta forma tienen una capa exterior o expuesta a la superficie que está formada de múltiples copias del péptido inmunógeno representado por la SEQ ID NO. 5. La concentración de polipéptido para la adsorción de cada capa es de 2 mg·ml<sup>-1</sup> en una solución acuosa a pH 7. El tiempo de adsorción para cada capa es de 20 min. Las micropartículas se "enjuagan" entre cada etapa de adsorción de péptido por centrifugación. En algunos casos, las partículas de molde de carbonato de calcio de la construcción de virus final artificial se disuelven por tratamiento con EDTA. Las estructuras preparadas de este modo se pueden denominar virus artificiales o vacunas sintéticas: "Se despliegan" sobre sus determinantes antigénicos de superficie, en el caso presente de las múltiples copias de un determinante antigénico conocido por provocar una respuesta inmunitaria que genera anticuerpos que reconocen el VIH-1 intacto. La tecnología es prometedora no solamente para la medicina preventiva y el tratamiento de VIH-1, sino también para el tratamiento contra el cáncer (cuando las secuencias antigénicas representan marcadores superficiales de células cancerosas).

#### Ejemplo 3: Composición inmunógena para VIH-1 y SARS

El polipéptido antigénico comprende dos regiones determinantes antigénicas y dos regiones de adsorción de superficie, en la que las regiones determinantes antigénicas son secuencias de polipéptido de un único patógeno y las regiones de adsorción superficial se localizan en el extremo N y extremo C del polipéptido antigénico y la primera región determinante antigénica está separada de la región de adsorción de la superficie central por un engarce corto. En un

ejemplo, una región determinante antigénica es un determinante antigénico conocido en un patógeno, por ejemplo, VIH-1, por ejemplo, péptido ARP7022, o DQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNC (SEQ ID NO: 1), y la otra región determinante antigénica, viz., YSRVKNLNSSEG (SEQ ID NO:6), es de una proteína de envuelta supuesta de varios virus de síndrome respiratorio agudo (SARS), y el engarce corto es un único resto de glicina, G:

5 KKKAKKKGKKKAKKKGDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNCGKKK.AKKKGKKKAKKKGYSRVKNLNSSEGKKKAKKKGK  
KKAKKKG (SEQ ID NO: 7)

Como antes, las regiones de adsorción de superficie del péptido antigénico compuesto cada una comprende

KKKAKKKGKKKAKKKG (SEQ ID NO: 3).

Ejemplo 4: Composición de vacuna para un hongo con un único determinante antigénico.

10 El polipéptido antigénico comprende una única región determinante antigénica, en el que la región determinante antigénica es una secuencia de polipéptidos de un patógeno y la región de adsorción de superficie está localizada en el extremo C de la región determinante antigénica. En un ejemplo, la región determinante antigénica es una secuencia señal en una proteína, por ejemplo, Ag2/PRA, de un patógeno, por ejemplo, *Coccidioides immitis*, por ejemplo, MQFSHALIALVAAGLASA (SEQ ID NO: 8). Un polipéptido antigénico adecuado comprende:

15 MQFSHALIALVAAGLASAKKKAKKKGKKKAKKKG (SEQ ID NO: 9)

La región de adsorción superficial del péptido antigénico comprende KKKAKKKGKKKAKKKG (SEQ ID NO: 3). La secuencia de 18 restos de Ag2/PRA (SEQ ID NO. 8) representa una región de *Coccidioides immitis*, el agente causante de coccidioidomicosis (fiebre del valle de San Joaquín), una enfermedad respiratoria. El péptido de longitud completa que corresponde a la SEQ ID NO. 9 se sintetiza mediante uno cualquiera de los medios conocidos en la técnica. Las películas de capas múltiples se preparan con este péptido de varias formas, por ejemplo, depositando por LBL composiciones inmunógenas que comprenden 5 bicapas de poli(L-lisina) y poli(L-ácido glutámico) y una capa final del péptido correspondiente a la SEQ ID NO. 9 sobre micropartículas de 3 µm de diámetro de carbonato de calcio. Las películas preparadas de esta forma tienen una capa exterior o expuesta a la superficie que está formada de múltiples copias del péptido inmunógeno representado por la SEQ ID NO. 9. La concentración de polipéptido para la adsorción de cada capa es de 2 mg·ml<sup>-1</sup> en una solución acuosa a pH 7. El tiempo de adsorción para cada capa es de 20 min. Las micropartículas se "enjuagan" entre cada etapa de adsorción de péptido por centrifugación. En algunos casos, las partículas de molde de carbonato de calcio de la construcción de virus final artificial se disuelven por tratamiento con EDTA. Las estructuras preparadas de este modo se pueden denominar virus artificiales o vacunas sintéticas: "Se despliegan" sobre sus determinantes antigénicos de superficie, en el caso presente de las múltiples copias de un determinante antigénico conocido por provocar una respuesta inmunitaria que genera anticuerpos que reconocen la *Coccidioides immitis* intacta. La tecnología es prometedora para la medicina preventiva y el tratamiento de *Coccidioides immitis*.

Ejemplo 5: Composición de vacuna para una bacteria con múltiples determinantes antigénicos

El polipéptido antigénico comprende una única región determinante antigénica, en el que la región determinante antigénica comprende dos secuencias de polipéptidos de una bacteria patógena y las regiones de adsorción se localizan en el extremo C de la región determinante antigénica, en el extremo N de la región determinante antigénica y entre las dos secuencias de la bacteria patógena. En un ejemplo, los determinantes antigénicos son de una proteína, por ejemplo, el antígeno de proteína superficial PAc de *Streptococcus mutans* MT8148, por ejemplo, NAKATYEAAALKQYEADLAAVKKANAA (SEQ ID NO: 10) y AALTAENTAIAKQRNENAKA (SEQ ID NO: 11). Un polipéptido antigénico adecuado comprende:

KKKAKKKGKKKAKKKGNAKATYEAAALKQYEADLAAVKKANAAGAALTAENTAIAKQRNENAKAGKKKAKKKGKKKAKKKG  
(SEQ ID NO: 12)

Las regiones de adsorción superficial del péptido antigénico comprenden KKKAKKKGKKKAKKKG (SEQ ID NO: 3). Las secuencias del producto génico PAc (SEQ ID NO. 10 y SEQ ID NO. 11) representan una parte de la región de repetición rica en alanina en el antígeno de proteína de superficie, que ha recibido mucha atención como componente antigénico para vacunas contra la caries dental. El péptido de longitud completa que corresponde a la SEQ ID NO. 12 se sintetiza mediante uno cualquiera de los medios conocidos en la técnica. Las películas de capas múltiples se preparan con este péptido de varias formas, por ejemplo, depositando por LBL composiciones inmunógenas que comprenden 5 bicapas de poli(L-lisina) y poli(L-ácido glutámico) y una capa final del péptido correspondiente a la SEQ ID NO. 12 sobre micropartículas de 3 µm de diámetro de carbonato de calcio. Las películas preparadas de esta forma tienen una capa exterior o expuesta a la superficie que está formada de múltiples copias del péptido inmunógeno representado por la SEQ ID NO. 12. La concentración de polipéptido para la adsorción de cada capa es de 2 mg·ml<sup>-1</sup> en una solución acuosa a pH 7. El tiempo de adsorción para cada capa es de 20 min. Las micropartículas se "enjuagan" entre cada etapa de adsorción de péptido por centrifugación. En algunos casos, las partículas de molde de carbonato de calcio de la construcción de virus final artificial se disuelven por tratamiento con EDTA. Las estructuras preparadas de este modo se pueden denominar virus artificiales o vacunas sintéticas: "Se despliegan" sobre sus determinantes antigénicos de superficie, en el caso presente de las múltiples copias de un determinante antigénico conocido por provocar una

respuesta inmunitaria que genera anticuerpos que reconocen la *S. mutans* intacta. La tecnología es prometedora para la medicina preventiva y el tratamiento de *S. mutans*.

5 En resumen, los virus artificiales fabricados con péptidos inmunógenos por CACE demuestran las siguientes ventajas. Las vacunas de péptidos sintéticos eliminan la necesidad de ciertos ensayos de seguridad de vacuna, reduciendo el coste y el riesgo de la producción de vacuna. Por ejemplo, el ensayo de toxicidad específico se usa para detectar la inactivación incompleta de viriones para vacunas que implican las partículas de virus atenuadas o muertas, por ejemplo, por análisis de cultivo de células, ahorrando tiempo y recursos. Una construcción de vacuna que no usa un virus u otro tipo de patógeno ya que el inmunógeno elimina la necesidad de tales ensayos de seguridad. Además, ya que el cultivo de células de mamífero no es necesario para propagar los virus para la invención, el riesgo de contaminación de la presente vacuna con material no deseado de un virus, microorganismo, o eucariota es extremadamente bajo, particularmente si los péptidos sintéticos y virus artificiales se producen en condiciones de GMP.

Las ventajas adicionales de la presente invención reivindicada incluyen simplicidad de fabricación y respuesta rápida en virtud del enfoque de "casete" para la síntesis de péptidos adecuados para LBL.

15 Además, el enfoque permite múltiples conformaciones de un único determinante antigénico lineal para "desplegar" de manera simultánea sobre la superficie de una única partícula de vacuna sintética, produciendo anticuerpos contra múltiples conformaciones de la secuencia e incrementando por lo tanto las probabilidades de que al menos alguno de los anticuerpos generados por el sistema inmunitario del organismo neutralicen los antígenos específicos diana o de patógeno sobre células cancerosas. Como se ha establecido anteriormente, se prevé que los péptidos que contienen diferentes regiones funcionales se puedan incorporar en una única construcción de vacuna sintética, incrementando el espectro de protección: La vacuna sintética actualmente reivindicada puede presentar múltiples determinantes antigénicos dirigidos a múltiples patógenos, proporcionando protección contra muchos patógenos diferentes en una única vacunación.

25 La plataforma de vacuna sintética es extremadamente general y, en principio, puede funcionar con cualquier patógeno. De este modo, a diferencia de otros enfoques de vacunación conocidos, que requieren genomanipulación de genes, transferencia de los genes a un huésped de expresión adecuado, expresión de los genes, purificación de la proteína recombinante o partículas de virus etc., las vacunas sintéticas descritas en el presente documento pueden proporcionar un tiempo de respuesta disminuido a la amenaza de un patógeno.

30 El uso de los términos "uno" y "una" y "el (la)" y referentes similares (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se han de considerar que cubren tanto el singular como el plural, salvo que se indique de otra manera en el presente documento o claramente se contradiga por el contexto. Los términos primero, segundo, etc. como se usa en el presente documento no significa que denoten cualquier orden particular, sino simplemente por conveniencia denotar una pluralidad de, por ejemplo, capas. Los términos "comprendiendo", "teniendo", "incluyendo", y "conteniendo" se han de considerar como términos abiertos (es decir, que significa "que incluye, pero no se limita a") salvo que se indique de otra manera. La relación de intervalos o valores solamente pretenden servir como un procedimiento abreviado de referencia individual a cada valor separado que cae dentro del intervalo, salvo que se indique de otra manera en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerara de manera individual en el presente documento. Los valores extremos de todos los intervalos se incluyen dentro del intervalo y se pueden combinar de manera independiente. Todos los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar en un orden adecuado salvo que se indique de otra manera en el presente documento o de otra manera se contradiga claramente por el presente contexto. El uso de cualesquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como"), pretende solamente ilustrar mejor la invención y no supone una limitación sobre el alcance de la invención salvo que se reivindique de otra manera. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva se debe considerar como indicador de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención como se usa en el presente documento.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Haynie, Donald

<120> Composiciones inmunógenas y procedimientos de uso

5

<130> ATE-0004-2

<150> Documento US 60/729.828

<151> 25 - 10 - 2005

10

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

15

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Adenovirus humano de tipo 1

20

<400> 1

Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys  
1 5 10 15

Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Cys  
20

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> La secuencia se diseñó de nuevo y se sintetizó.

<400> 2

Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys  
20 25 30

Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Cys  
35 40

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> La secuencia se diseñó de nuevo y se sintetizó.

10 <400> 3

Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly  
1 5 10 15

<210> 4

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 4

Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln  
1 5 10 15

Leu

20 <210> 5

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> La secuencia se diseñó de nuevo y se sintetizó.

ES 2 400 665 T3

<400> 5

Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys  
20 25 30

Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Cys Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys  
35 40 45

Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala  
50 55 60

Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Lys Lys Lys Ala Lys Lys  
65 70 75 80

Lys Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly  
85 90

<210> 6

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Virus de síndrome respiratorio agudo severo (SARS)

<400> 6

Tyr Ser Arg Val Lys Asn Leu Asn Ser Ser Glu Gly  
1 5 10

10 <210> 7

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> La secuencia se diseñó de nuevo y se sintetizó.

<400> 7

Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys  
20 25 30

Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Cys Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys  
35 40 45

Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Tyr Ser Arg Val Lys Asn Leu  
50 55 60

Asn Ser Ser Glu Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Lys Lys Lys  
65 70 75 80

Ala Lys Lys Lys Gly  
85

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Coccidioides immitis

<400> 8

Met Gln Phe Ser His Ala Leu Ile Ala Leu Val Ala Ala Gly Leu Ala  
1 5 10 15

ser Ala

<210> 9

10 <211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> La secuencia se diseñó de nuevo y se sintetizó.

<400> 9

Met Gln Phe Ser His Ala Leu Ile Ala Leu Val Ala Ala Gly Leu Ala  
1 5 10 15

Ser Ala Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys  
20 25 30

Lys Gly

<210> 10

<211> 26

<212> PRT

5 <213> Streptococcus mutans

<400> 10

Asn Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Val Lys Lys Ala Asn Ala Ala  
20 25

<210> 11

10 <211> 19

<212> PRT

<213> Streptococcus mutans

<400> 11

Ala Ala Leu Thr Ala Glu Asn Thr Ala Ile Lys Gln Arg Asn Glu Asn  
1 5 10 15

Ala Lys Ala

15

<210> 12

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> La secuencia se diseñó de nuevo y se sintetizó.

<400> 12

Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly  
1 5 10 15

Asn Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp  
20 25 30

Leu Ala Ala Val Lys Lys Ala Asn Ala Ala Gly Ala Ala Leu Thr Ala  
35 40 45

Glu Asn Thr Ala Ile Lys Gln Arg Asn Glu Asn Ala Lys Ala Gly Lys  
50 55 60

Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gly Lys Lys Lys Ala Lys Lys Lys Gl  
65 70 75

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inmunógena para su uso en un procedimiento de provocación de una respuesta inmunitaria terapéutica en un organismo vertebrado, en la que la composición inmunógena comprende,
- 5 una película de capas múltiples que comprende dos o más capas de polielectrolitos, en la que las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de manera opuesta,
- en la que un primer polielectrolito de capas comprende un polipéptido antigénico que comprende una o más regiones de adsorción superficial unidas de forma covalente a una o más regiones determinantes antigénicas, en la que el polipéptido antigénico y la una o más regiones de adsorción superficial tienen la misma polaridad,
- 10 en la que la una o más regiones de adsorción superficial comprenden uno o más motivos de secuencias de aminoácidos, el uno o más motivos de secuencias de aminoácidos consisten en de 5 a 15 aminoácidos y tienen una magnitud de carga neta por resto mayor que o igual a 0,4, y
- en la que la una o más regiones determinantes antigénicas consisten en de 3 a 250 restos de aminoácido,
- en la que el polipéptido antigénico no es un homopolímero, es de al menos 15 aminoácidos de longitud y tiene una solubilidad acuosa a pH de 4 a 10 mayor que 50 µg/ml;
- 15 en la que una segunda capa comprende un segundo polielectrolito de capas que comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular mayor que 1.000 y al menos 5 cargas por molécula, y una carga opuesta a la del primer polipéptido de capas, y en la que la región determinante antigénica comprende al menos un determinante antigénico de un antígeno seleccionado de un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico o un antígeno de parásito.
- 20 2. Uso de una composición inmunógena en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria terapéutica en un organismo vertebrado, en la que la composición inmunógena comprende,
- una película de capas múltiples que comprende dos o más capas de polielectrolitos, en la que las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de manera opuesta,
- 25 en la que un primer polielectrolito de capas comprende un polipéptido antigénico que comprende una o más regiones de adsorción superficial unidas de manera covalente a una o más regiones determinantes antigénicas, en la que el polipéptido antigénico y la una o más regiones de adsorción superficial tienen la misma polaridad,
- en la que la una o más regiones de adsorción superficial comprende uno o más motivos de secuencia de aminoácidos, el uno o más motivos de secuencias de aminoácidos consisten en de 5 a 15 aminoácidos y tienen una magnitud de carga neta por resto mayor que o igual a 0,4, y
- 30 en la que la una o más regiones determinantes antigénicas consisten en de 3 a 250 restos de aminoácido,
- en la que el polipéptido antigénico no es un homopolímero, es de al menos 15 aminoácidos de longitud, y tiene una solubilidad acuosa a pH de 4 a 10 mayor que 50 µg/ml;
- en la que una segunda capa comprende un segundo polielectrolito de capas que comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular mayor que 1.000 y al menos 5 cargas por molécula, y una carga opuesta de la del primer polipéptido de capas, y en la que la región determinante antigénica comprende al menos un determinante antigénico de un antígeno seleccionado de un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico o un antígeno de parásito.
- 35 3. Un procedimiento de provocación de una respuesta inmunitaria no terapéutica en un organismo vertebrado no humano, que comprende administrar en el organismo vertebrado no humano una composición inmunógena que comprende
- 40 una película de capas múltiples que comprende dos o más capas de polielectrolitos, en la que las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de manera opuesta,
- en la que un primer polielectrolito de capas comprende un polipéptido antigénico que comprende una o más regiones de adsorción superficial unidas de manera covalente a una o más regiones determinantes antigénicas, en la que el polipéptido antigénico y la una o más regiones de adsorción superficial tienen la misma polaridad,
- 45 en la que la una o más regiones de adsorción superficial comprenden uno o más motivos de secuencias de aminoácidos, el uno o más motivos de secuencias de aminoácidos consisten en de 5 a 15 aminoácidos y tienen una magnitud de carga neta por resto mayor que o igual a 0,4, y
- en la que la una o más regiones determinantes antigénicas consisten en de 3 a 250 restos de aminoácido,

en la que el polipéptido antigénico no es un homopolímero, es de al menos 15 aminoácidos de longitud, y tiene una solubilidad acuosa a pH de 4 a 10 mayor que 50 µg/ml;

en la que una segunda capa comprende un segundo polielectrolito de capas que comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular mayor que 1.000 y al menos 5 cargas por molécula, y una carga opuesta a la del primer polipéptido de capas, y en la que la región determinante antigénica comprende al menos un determinante antigénico de un antígeno seleccionado de un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico o un antígeno de parásito.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en la que la composición inmunógena se administra por vía oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, sublingual o transdérmica.

5. La composición inmunógena de la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, o los procedimientos de las reivindicaciones 3 ó 4, en la que el polipéptido antigénico está en la capa exterior de la película de capas múltiples.

6. La composición inmunógena de la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, o los procedimientos de las reivindicaciones 3 o 4, en la que el primer polielectrolito de capas comprende dos o más determinantes antigénicos, y en la que los dos o más determinantes antigénicos son del mismo o diferente patógeno.

7. La composición inmunógena de la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, o los procedimientos de las reivindicaciones 3 o 4, en la que la composición inmunógena comprende además un segundo polipéptido antigénico que comprende una o más regiones de adsorción de superficie unidas de forma covalente a una o más segundas regiones determinantes antigénicas, en la que el segundo polipéptido antigénico y la una o más segundas regiones de adsorción superficial tienen la misma polaridad,

en la que la una o más segundas regiones de adsorción superficial comprenden uno o más segundos motivos de secuencias de aminoácidos, el uno o más segundos motivos de secuencias de aminoácidos consisten en de 5 a 15 aminoácidos y tienen una magnitud de carga neta por resto mayor que o igual a 0,4, y

en la que la una o más segundas regiones determinantes antigénicas consisten en de 3 a 250 restos de aminoácido,

en la que el segundo polipéptido antigénico no es un homopolímero, es de al menos 15 aminoácidos de longitud, y tiene una solubilidad acuosa a pH de 4 a 10 mayor que 50 µg/ml, y en la que la segunda región determinante antigénica comprende al menos un determinante antigénico de un antígeno seleccionado de un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico o un antígeno de parásito, y en la que el al menos un primer determinante antigénico del primer polipéptido antigénico y el al menos un segundo determinante antigénico del segundo polipéptido son del mismo o diferente patógeno.

8. La composición inmunógena de la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, o los procedimientos de las reivindicaciones 3 o 4, en la que la película de capas múltiples comprende además una molécula bioactiva inmunógena adicional en la que la molécula bioactiva inmunógena adicional se selecciona entre un fármaco, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un lípido, un fosfolípido, un carbohidrato, un polisacárido, un lipopolisacárido, o una combinación de los mismos.

9. La composición inmunógena de la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, o los procedimientos de las reivindicaciones 3 o 4, en la que el polipéptido antigénico tiene una solubilidad acuosa mayor que o igual a 1 mg/ml.

10. La composición inmunógena de la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, o los procedimientos de las reivindicaciones 3 o 4, en la que la región determinante antigénica comprende un motivo antigénico que comprende de 3 a 50 restos de aminoácido, y en la que el polipéptido antigénico tiene una magnitud de carga por resto a pH neutro mayor que o igual a 0,4.

11. La composición inmunógena de la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, o los procedimientos de las reivindicaciones 3 o 4, en la que la región determinante antigénica es un dominio antigénico que comprende de 50 a 250 restos de aminoácido

12. La composición inmunógena de la reivindicación 11 para su uso de la reivindicación 1, o el uso o procedimiento de la reivindicación 11, en la que el dominio antigénico tiene una solubilidad en agua a pH de 4 a 10 mayor que 50 µg/ml.

13. La composición inmunógena 1 de la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, o los procedimientos de las reivindicaciones 3 o 4, en la que la película de capas múltiples encapsula una o más moléculas bioactivas no peptídicas.

14. La composición inmunógena de la reivindicación 1 para su uso en el procedimiento de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, o los procedimientos de las reivindicaciones 3 ó 4, en la que la película de capas múltiples está en la forma de una microcápsula.

15. La composición inmunógena de la reivindicación 14 para su uso de la reivindicación 1, o el uso o procedimiento de la reivindicación 14, en la que la microcápsula comprende un núcleo, y el núcleo comprende una molécula bioactiva adicional en la que la molécula bioactiva adicional se selecciona entre un fármaco, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un lípido, un fosfolípido, un carbohidrato, un polisacárido, un lipopolisacárido, o una combinación de los mismos.

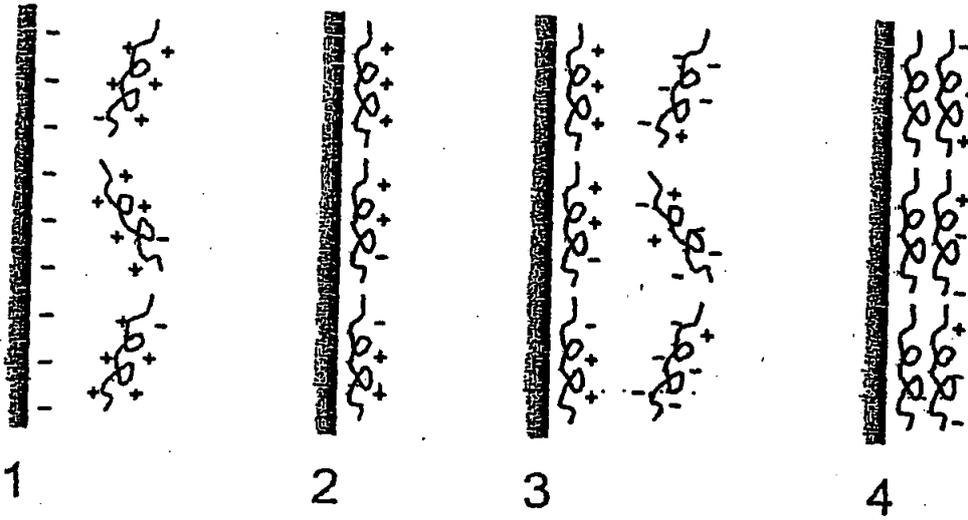
5

Figura 1

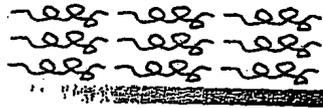
Auto ensamblaje

capa a capa (LBL)

de películas de capas múltiples



Película formada  
sobre un sustrato  
plano (revestimiento)



Película formada  
sobre un molde  
esférico (cápsula)

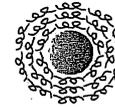


Figura 2

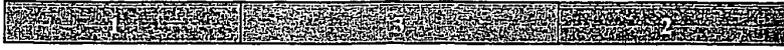


Figura 3

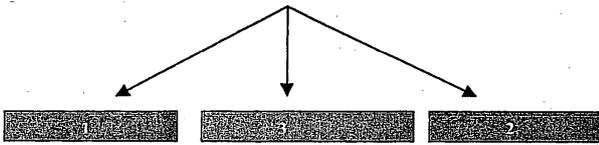
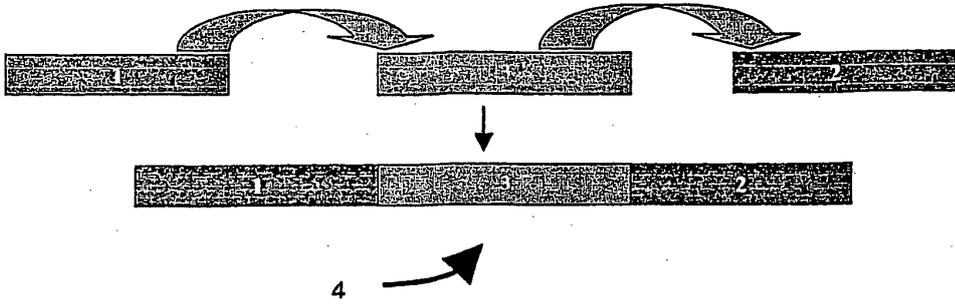


Figura 4



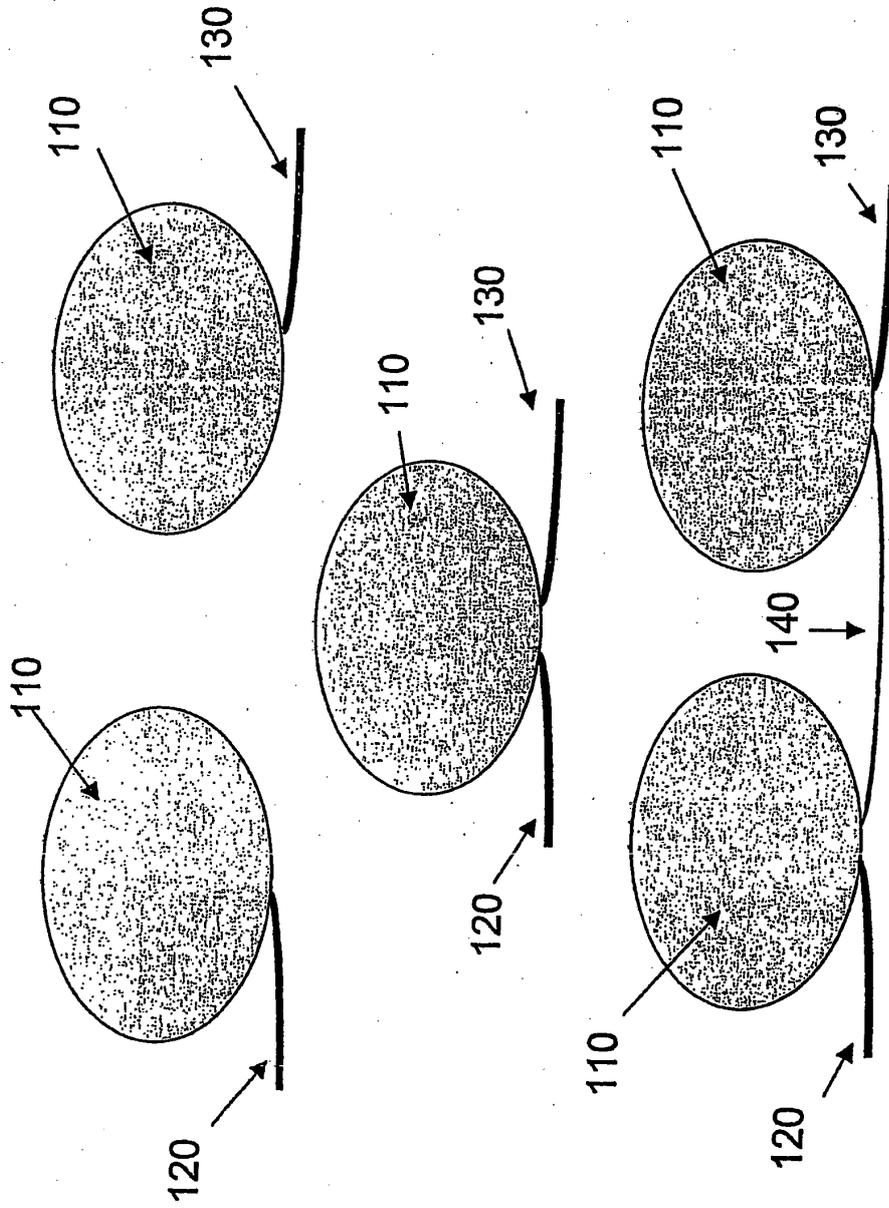


Fig. 5