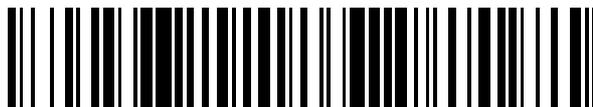


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 405**

21 Número de solicitud: 201230474

51 Int. Cl.:

**C07K 14/78** (2006.01)

**C07K 14/35** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 39/04** (2006.01)

**A61P 37/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**29.03.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**07.11.2013**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070204**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (50.0%)  
Ctt-Otri - Casa del Estudiante, C/ Real de Burgos,  
s/n  
47001 Valladolid ES y  
INSTITUTO DE ESTUDIOS DE CIENCIAS DE LA  
SALUD DE CASTILLA Y LEÓN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ARIAS VALLEJO, Francisco Javier;  
GARCÍA ARÉVALO, Maria Del Carmen;  
RODRÍGUEZ CABELLO, José Carlos;  
ALONSO RODRIGO, Matilde;  
BERMEJO MARTÍN, Jesús Francisco y  
ALMANSA MORA, Raquel**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Vehiculización de moléculas antigénicas en polímeros recombinantes similares a elastina**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un sistema basado en proteínas recombinantes similares a elastina capaces de autoensamblarse en condiciones fisiológicas para la administración de antígenos. Dicho sistema es capaz de generar el desarrollo de una respuesta inmune eficaz en ausencia de adyuvantes.

ES 2 428 405 A1

**DESCRIPCIÓN**

Vehiculización de moléculas antigénicas en polímeros recombinantes similares a elastina

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con el desarrollo de un sistema basado en proteínas recombinantes similares a elastina capaces de auto ensamblarse en condiciones fisiológicas para la administración de vacunas, en los que una o más moléculas antigénicas pueden ser incorporadas y expuestas.

10

**10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El impacto de la vacunación en la salud mundial es uno de los eventos más importantes en la historia de la medicina. Gracias a la vacunación muchas enfermedades están bajo control, erradicadas o, al menos, parcialmente controladas. La administración profiláctica de vacunas eficaces puede ser más efectiva que los tratamientos terapéuticos, más ecológica que el uso de agentes anti-microbianos y ofrece una mayor flexibilidad.

15

Entre las estrategias vacunales se encuentran las vacunas vivas, acelulares y las subunitarias o particuladas.

20

Las vacunas vivas son las vacunas más potentes, pero deben estar previamente atenuadas o inactivadas ya que las respuestas celulares y la generación de anticuerpos que tiene lugar son muy intensas. Esto es debido a que en las vacunas vivas, que contienen el organismo completo, están presentes todos los antígenos del patógeno y además su capacidad para replicarse hace que se incremente la cantidad de antígeno disponible para el sistema inmune. Sin embargo las vacunas vivas se han asociado con inestabilidad genética y virulencia residual.

25

Las vacunas acelulares, compuestas por organismos completos muertos o toxinas inactivadas, ofrecen una mayor seguridad porque mantienen sus propiedades antigénicas pero carecen de virulencia residual. Sin embargo, como no se pueden replicar en el hospedador, son menos efectivas e inducen respuestas inmunes más débiles, generando una protección durante menor tiempo y por tanto se requiere la administración de múltiples dosis de refuerzo.

30

Las vacunas subunitarias o particuladas, compuestas por antígenos aislados, se basan en preparaciones parcialmente purificadas de un organismo o proteínas recombinantes. Tienen efectos secundarios mínimos y es posible preparar grandes cantidades del antígeno mediante diversos métodos. Sin embargo, las vacunas subunitarias requieren del conocimiento de qué antígeno proporciona una respuesta inmune adecuada y solventar problemas como el plegamiento incorrecto o una mala presentación al sistema inmune, por lo que frecuentemente es necesario el uso de adyuvantes. El único adyuvante aprobado para su uso en humanos son las sales de aluminio, denominadas genéricamente como Alum; esta sustancia presenta un buen perfil de seguridad pero diversos estudios realizados con diferentes vacunas de naturaleza proteica demuestran que su capacidad adyuvante es bastante limitada y además es un hecho constatado que la respuesta inducida es fundamentalmente humoral, es decir Th2 (Gupta *et al.* 1998, Adv. Drug Del, Rev. 32: 155-172). Además el Alum no es efectivo en la inducción de una respuesta inmunológica a nivel de mucosas. Por último se ha observado que también puede inducir IgE, lo cual ha sido asociado con reacciones alérgicas. En algunos casos en los que es necesaria una respuesta celular basada en células T CD4 o CD8, el uso de Alum como adyuvante no es suficiente, por lo que es necesario el desarrollo de nuevos adyuvantes y formulaciones.

35

40

45

50

La inducción de una respuesta inmune apropiada es esencial para una vacuna eficaz y depende de muchos factores, tales como la ruta de administración, la dosis, la duración, el número y la frecuencia de las inmunizaciones, el uso de adyuvantes, etc.

55

La etapa crucial de una respuesta inmune fisiológica comienza con la habilidad de las células presentadoras de antígeno de procesar los antígenos y presentarlos en su superficie. Parece que las células dendríticas juegan un papel importante regulando la cantidad, calidad y duración de la respuesta inmune adaptativa (Pulendran B. Cell 124 (2006) 849-863).

60

La activación apropiada de células T específicas de antígeno es crítica para la inducción de una respuesta inmune adaptativa eficaz y hay varios factores que pueden afectar este proceso. Entre ellos destacan la presencia de señales coestimuladoras y características de la partícula como el tamaño o la superficie, así como la densidad del epítipo y la ruta de administración.

El tamaño de las partículas juega un papel importante en la adyuvancia. Está ampliamente aceptado que las formulaciones para la administración basadas en vacunas particuladas son más inmunogénicas que los antígenos solubles *in vivo* (Kanchan V. et al, Biomaterials 28 (2007) 5344-5357) ya que pueden iniciar la captación apropiada y el procesamiento del antígeno por parte de las células presentadoras de antígeno o de las células dendríticas. Se han desarrollado una gran variedad de sistemas adyuvantes de liberación particulados basados en emulsiones lipídicas, nano y micro partículas biodegradables y biocompatibles, complejos inmunoestimuladores, virosomas y partículas similares a virus. Las formulaciones particuladas tienen un tamaño inferior a 0,5  $\mu\text{m}$  y son internalizadas por las células presentadoras de antígeno por una combinación de vías endocíticas y las partículas mayores de 0,5  $\mu\text{m}$  son internalizadas por los macrófagos mediante fagocitosis. Esto está de acuerdo con las observaciones de que los sistemas nanoparticulados inducen una fuerte respuesta inmune tanto humoral como celular (Singh M. Pharmaceutical research 19 (2002) 717-728).

Los sistemas de liberación particulados, además de la capacidad de activar la inmunidad innata, incrementa la duración de la presencia del antígeno, lo que es importante para una respuesta de las células T (Antonio J. et al, Advanced drug delivery reviews 59 (2007) 478-490). La mayoría de estos sistemas de liberación actúan por dos mecanismos, creando un depósito de antígeno *in vivo* para la liberación del antígeno durante un periodo de tiempo largo e incrementando la captación fagocítica de la partícula cargada con el antígeno por las células presentadoras de antígeno. Tienen además otras ventajas, como la posibilidad de incorporar múltiples péptidos.

Se han descrito diversos polímeros biodegradables para la liberación de antígenos, incluyendo ácido polisebácido (AP), propano 1,3 bis(p-carboxifenoxi) (PPC), ácido poliglicólico (AG), polisacáridos como quitosano, dextrano, polietilenglicol (PEG), etc... Además se han desarrollado una nueva clase de polímeros para su uso en vacunas, denominados dendrímeros, como los derivados de polipropileno imina (PPI), y poliamido amina (PAMAM) (Heeaard P. et al., Bioconjugate Chem 21 (2010) 405-418).

Sin embargo, los sistemas de liberación conocidos presentan algunas limitaciones como el daño frecuente en el antígeno durante la microencapsulación, la baja eficacia de encapsulación y la liberación inicial mínima del antígeno atrapado. Además, los factores ambientales como pH, temperatura, alta presión, y agitación entre otros puede dañar las proteínas, reduciendo su actividad biológica (Derek T. Methods 40 (2006) 10-19). Estos problemas hacen que los sistemas poliméricos descritos hasta el momento hayan sido usados solamente en veterinaria y no sea posible emplearlos para uso humano.

Floss D.M. et al., (J Biomed Biotechnol.; 2010: 274346) describe la expresión e inmunogenicidad de una proteína de fusión basada en un polímero similar a elastina (Elastin like Polymer ELP) junto a dos grandes antígenos (ESAT-6 y Ag85B) de la bacteria *M. tuberculosis* (TBAg 40.8kDa). El ELP utilizado contiene 100 repeticiones del pentapéptido VPGXG donde X indica Glicina, Valina o Alanina sin bloques definidos. Dicha proteína es producida en plantas, tratada mediante ciclado de transición inverso (ITC) y utilizada en ensayos de inmunogenicidad. Si bien los autores verifican que la inclusión de la parte ELP aumenta la tasa de expresión y acumulación del antígeno en planta, no demuestran que los polipéptidos resultantes (ELP desnudo y TBAg-ELP) estén puros antes de ser utilizados. Además, los polímeros ensayados no permiten una liberación eficaz del antígeno, por lo que es necesaria su formulación con sistemas liposomales adyuvantes como DDA/MPI y DOTAP. A pesar de ello, la respuesta inmune humoral generada es poco intensa y de corta duración. El nivel de anticuerpos frente al filtrado proteico de la micobacteria al inmunizar con el polipéptido TBAg-ELP sólo resultó eficaz con la dosis de 10  $\mu\text{g}$  al aumentar 10 veces la sensibilidad de la técnica de detección, y perdió intensidad en la siguiente medida temporal, por lo que no induce la maduración de la respuesta humoral que se requiere en toda inmunización eficaz. También demuestra que los mejores resultados se encontraron exclusivamente cuando se inmunizó usando la mezcla de TBAg-ELP junto al antígeno libre ESAT-6, incluso al analizar los anticuerpos dirigidos frente al otro antígeno Ag85B. Esto implica que la incorporación del bloque de ELP es determinante en la producción de la proteína de fusión aunque no en su purificación y, además, no actúa eficazmente como vehículo inductor de la respuesta inmunológica a pesar de contar con un antígeno de grandes dimensiones como el utilizado.

Sun G. et al. (Journal of Controlled Release, 2011, doi:10.1016/j.jconrel.2011.06010) describen la bioproducción y caracterización de una proteína de fusión con un fragmento de adenovirus (Knob) unido a un copolímero en bloque formado por dos pentapéptidos derivados de la elastina o polímeros similares a elastina (Elastin-like Polymers). Los bloques de ELP consisten en el (VPGSG) y el (VPGIG) ambos repetidos 48 veces. Los autores construyen diferentes alternativas usando los tres polipéptidos y concluyen que la formación de nanopartículas estables a 37°C sólo se verifica cuando se calientan los polipéptidos que contienen ambos bloques de ELP, es decir, Knob-(VPGSG)48-(VPGIG)48 [Knob-S48I48] y la construcción que carece de la proteína vira I (VPGSG)48-(VPGIG)48 [S48I48]. La expresión en *E. coli* y posterior purificación mediante ciclado de transición inverso (ITC) produjo sendos polímeros con

algunos contaminantes proteicos. Las construcciones preparadas mostraron capacidad de internalización en hepatocitos mediada por el fragmento Knob, por lo que sugieren que podría utilizarse como sistema de liberación controlada de fármacos intracelularmente que era el objetivo último del artículo. No se realiza ningún tipo de prueba de inmunogenicidad del fragmento incorporado ni a nivel *in vitro* ni *in vivo* por lo que no se extrae ninguna conclusión respecto a estos aspectos.

Por tanto existe la necesidad de desarrollar unos sistemas de liberación que permitan la exposición de antígenos para generar una respuesta inmune eficaz en ausencia de otros sistemas adyuvantes.

## 10 COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto la invención se relaciona con un conjugado que comprende

- (i) un polipéptido similar a elastina que comprende
- (a) al menos una región hidrofílica de secuencia  $[(X_1PGX_1G)_2 X_1PGX_2G(X_1PGX_1G)_2]_n$  y
- (b) al menos una región hidrofóbica de secuencia  $(X_3X_4IX_5G)_m$  en donde  $X_1$  y  $X_3$  son aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica,  $X_2$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofílica,  $X_4$  y  $X_5$  son G o P, , n es entre 5 y 10 y m es entre 10 y 100.
- y
- (ii) al menos una molécula antigénica seleccionada del grupo formado por un péptido, un ácido nucleico o un polisacárido

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con una nanopartícula formada por la asociación de dos o más conjugados de la invención.

En otro aspecto adicional, la invención se relaciona con el polinucleótido adecuado para la expresión de una proteína de fusión que comprende un polipéptido similar a elastina, con el vector que contiene dicho polinucleótido, o con las células que contienen el conjugado o el vector de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el conjugado, la nanopartícula, el polinucleótido, el vector o célula de la presente invención para su uso como medicamento.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el conjugado, la nanopartícula, el polinucleótido, el vector o la célula de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad para estimular y/o inducir la respuesta inmune de un individuo frente a la molécula antigénica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del conjugado, de la nanopartícula, del polinucleótido, del vector o de la célula de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad para estimular y/o inducir la respuesta inmune de un individuo frente a la molécula antigénica.

## 40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1. A)** Patrón de electroforesis en gel de poliácido acrílico desnaturalizante (SDS-PAGE) de ELPs  $E_{50}I_{60}$  (1), Ag-  $E_{50}I_{60}$  (2) y **B)** Patrón electroforético de ELP Ag-  $E_{50}A_{60}$ .

**Figura 2.** Espectros de MALDI-TOF de los polímeros  $E_{50}I_{60}$  (A) y Ag- $E_{50}I_{60}$  (B)

**Figura 3.** Mediciones turbidimétricas de 25  $\mu$ M Ag  $E_{50}I_{60}$  y Ag- $E_{50}I_{60}$  (A), y Ag- $E_{50}I_{60}$  y Ag- $E_{50}A_{60}$  (B) para evaluar las transiciones de fase inversa a una densidad óptica de 350 nm ( $OD_{350}$ ), en un rango de 10°C-60°C en un espectrofotómetro UV-VIS con una cámara para la muestra termostataada.

**Figura 4.** Gráfico en el que se muestra el perfil de intensidad dependiente de la temperatura (eje izquierdo vertical) y el tamaño (eje derecho vertical) de las soluciones filtradas de  $E_{50}I_{60}$  y Ag- $E_{50}I_{60}$  a 1mg/ml en PBS frío (pH 7,4) en un rango de 10 °C-50°C, mediante medida por difusión dinámica de la luz medidas en un ángulo de dispersión de 90°. Las gráficas con cuadrados da idea de la estabilidad de la señal y los círculos se refieren al diámetro en nm de ambas partículas. Como se ve la señal de agregación se inicia a 14°C pero se estabiliza a 20 °C, y a partir de ahí se obtiene una partícula muy estable de unos 50nm de diámetro.

**Figura 5** Gráfico en el que se muestra el perfil de intensidad dependiente de la temperatura (eje izquierdo vertical) y el tamaño (eje derecho vertical) de las soluciones filtradas de  $E_{50}A_{60}$  y Ag- $E_{50}A_{60}$  a 1mg/ml en PBS frío (pH 7,4) en un rango de 10 °C-50°C, mediante medida por difusión dinámica de la luz medidas en un ángulo de dispersión de 90°. La señal se estabiliza (cuadrados) iniciándose a 37°C y estabilizándose a 45°C. El tipo de partícula que surge es superior a 100nm (círculos). La cercanía a 37°C

de la formación y estabilización de la partícula hace que sea más peligroso usar esta composición que no nos asegura una partícula estable en condiciones fisiológicas.

5 **Figura 6.** Imágenes de Cryo-TEM de E<sub>50l60</sub> (izquierda) y Ag-E<sub>50l60</sub> (derecha), tras calentamiento a 37 °C. La barra de escala es de 100 nm en la fotografía izquierda y de 50 nm en la fotografía derecha.

10 **Figura 7.** Análisis estadístico del tamaño de las partículas de las imágenes de Cryo-TEM analizado con el software Image J. La media del tamaño (en nm) ± desviación estándar a 4°C y a 37 °C son 15,1 ± 2,7 y 48,8 ± 13,5, respectivamente para E<sub>50l60</sub> y 20,1 ± 7,5 y 55,4 ± 7,1 respectivamente para Ag-E<sub>50l60</sub>.

15 **Figura 8.** Niveles de viabilidad celular en los distintos grupos de tratamiento (porcentaje de células negativas para anexina V y yoduro de propidio). AG: antígeno libre, ELP: Polímero similar a elastina (E<sub>50l60</sub>). AG+ELP Polímero similar a elastina con el antígeno (Ag-E<sub>50l60</sub>).

20 **Figura 9.** Ganancia media en el peso de los ratones a lo largo del experimento.

25 **Figura 10.** Niveles de citoquinas IL-1β (panel superior) y IL-5 (panel inferior) en los días 1 y 29 de inmunización respectivamente mostrando diferencias significativas entre los grupos 1 y 2 y el resto de los grupos (\* corresponde a P < 0.05). La IL-5 a día 30 mostró también una significación adicional entre las dosis 1 y 2 del Ag-E<sub>50l60</sub> (° P<0.05).

30 **Figura 11.** Niveles de inmunoglobulinas tipo IgM (paneles superiores) e IgG (paneles inferiores) en los sueros de los ratones inmunizados con las diferentes preparaciones vacunales y analizados con los cuatro diferentes tipos de revestimiento de la placa de ELISA: antígeno biotinilado (Ag), mezcla de proteínas de la micobacteria (CFP), antígeno unido al polímero de elastina (Ag-ELP) y polímero de elastina sin antígeno (ELP). Tiempo 0 días: Barras blancas; Tiempo 1 semana: Barras con diagonal creciente; Tiempo 3 semanas: Barras con aspas; Tiempo 5 semanas: Barras con diagonal decreciente.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 Los autores de la presente invención han desarrollado conjugados que comprenden un polipéptido que contienen un número variable de los dominios de elastina responsable de la capacidad de esta proteína de autoensamblarse. Estos conjugados, tal y como se muestra en el ejemplo 2 de la presente invención, son capaces de autoensamblarse formando nanopartículas en condiciones fisiológicas y de presentar un péptido fusionado a dicho polipéptido inmunogénico en su superficie. Si este péptido es un péptido inmunogénico, las nanopartículas pueden ser usadas para generar una respuesta inmune frente a dicho péptido inmunogénico mediante su administración a un animal.

### Conjugado de la invención

40 Así, en un primer aspecto la invención se relaciona con un conjugado que comprende  
 (i) un polipéptido similar a elastina que comprende  
 (a) al menos una región hidrofílica de secuencia [(X<sub>1</sub>PGX<sub>1</sub>G)<sub>2</sub>X<sub>1</sub>PGX<sub>2</sub>G(X<sub>1</sub>PGX<sub>1</sub>G)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> y  
 (b) al menos una región hidrofóbica de secuencia (X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>IX<sub>5</sub>G)<sub>m</sub>  
 45 en donde X<sub>1</sub> y X<sub>3</sub> son aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica, X<sub>2</sub> es un aminoácido de cadena lateral hidrofílica, X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> son G o P, , n es entre 5 y 10 y m es entre 10 y 100.  
 y  
 (ii) al menos una molécula antigénica seleccionada del grupo formado por un péptido, un ácido nucleico o un polisacárido

50 El término “conjugado”, según se usa en la presente invención, se refiere a dos o más compuestos unidos covalentemente de manera que la función de cada compuesto se conserva en el conjugado.

55 El término “polipéptido”, según se usa en la presente invención, se refiere a la molécula compuesta por la unión de más de 10 aminoácidos. Dada la capacidad de los conjugados de la invención de autoensamblarse de forma parecida a como lo hace la elastina, los conjugados de acuerdo a la presente invención se denominan también de forma indistinta ELPs (elastin-like polymers).

60 El término “aminoácido” se refiere a una molécula orgánica con un grupo amino y un grupo carboxílico.

65 El componente (a) del polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención es una región hidrofílica de secuencia [(X<sub>1</sub>PGX<sub>1</sub>G)<sub>2</sub>X<sub>1</sub>PGX<sub>2</sub>G(X<sub>1</sub>PGX<sub>1</sub>G)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> en donde X<sub>1</sub> es un aminoácido de cadena lateral hidrofóbica

$X_2$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofílica y  
n es un número entero que oscila entre 5 y 10.

5 El término "aminoácido de cadena lateral hidrofóbica" se refiere a  $\alpha$ -,  $\beta$ - y dehidro-aminoácidos en la serie: Leu, n-Leu, Ile, alo-Ile, Val, n-Val, Phe, hPhe, Tyr, Trp, 1-Nal, 2-Nal, h-1-Nal, h-2-Nal, Cha, Chg y Phg; aminoácidos naturales y no naturales, como se definió anteriormente, que contienen en la cadena lateral grupos hidroxilo, amino o tio funcionalizados con alquilos, acilos, arilos o acilarilos que contienen de 1 a 11 átomos de carbono; aminoácidos naturales y no naturales, como se definió anteriormente, que contienen en la cadena lateral grupos carboxi-funcionalizados con aminos primarias o secundarias o alcoholes alifáticos o aromáticos que contienen hasta 11 átomos de carbono; fenilalaninas mono- y di-sustituidas en las posiciones orto, meta y para del anillo aromático con halógenos o con grupos alquilo, O-alquilo o S-alquilo;  $\beta$ -2 y  $\beta$ -3 tienilalanina,  $\beta$ -2 y  $\beta$ -3 furanilalanina; y derivados de ácido 2,3-diaminopropiónico y ácido 2,4-diaminobutírico funcionalizados con alquilos, acilos, arilos o acilarilos que contienen hasta 11 átomos de carbono.

15 Preferiblemente, los aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica son aminoácidos naturales seleccionados del grupo de Ala, Val, Leu e Ile. Los aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica que aparecen en las posiciones 1 y 4 dentro de la secuencia  $(X_1PGX_1G)$  pueden ser iguales o distintos. De la misma forma, las secuencias de la primera y segunda repetición de la secuencia  $(X_1PGX_1G)$  pueden ser iguales o distintas. En una forma de realización preferida, los dos aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica son iguales y las secuencias de la primera y segunda repetición de la secuencia  $(X_1PGX_1G)$  son iguales. En una forma de realización aún más preferida, los aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica que aparecen en posiciones 1 y 4 en la secuencia  $(X_1PGX_1G)$  en el componente (a) del conjugado de la invención son valina, de forma que el componente (a) tiene la secuencia  $[(VPGVG)_2VPGX_2G(VPGVG)]_2n$ .

25 La expresión "aminoácido de cadena lateral hidrofílica" se usa en la presente invención para referirse a aminoácidos cuyas cadenas laterales contienen grupos capaces de atraer agua o que son solubles en agua o forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Este término incluye aminoácidos de cadena lateral cargada (positiva- o negativamente), tales como Lys, Arg o His (aminoácidos que muestran carga neta positiva al pH fisiológico), Asp o Glu (aminoácidos que muestran carga neta negativa al pH fisiológico) o aminoácidos de cadena lateral hidrofílica (Cys, Ser, Thr, Asn y Gln).

30 En una forma preferida de realización, el aminoácido  $X_2$  de cadena lateral hidrofílica que aparece en el componente (a) del polipéptido similar a elastina es Glu. En una forma de realización aún más preferida, el aminoácido de cadena lateral hidrofóbica que aparece en el componente (a) del polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención es valina y el aminoácido de cadena lateral hidrofílica que aparece en el componente (a) del polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención es Glu de forma que el componente (a) tiene la secuencia  $[(VPGVG)_2VPGEG(VPGVG)]_2n$ .

En una forma preferida de realización, n toma el valor de 10, de forma que el componente (a) tiene la secuencia  $[(VPGVG)_2VPGEG(VPGVG)]_{210}$ .

40 El componente (b) del polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención es una región hidrofóbica de secuencia  $(X_3X_4IX_5G)_m$  en donde  $X_3$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofóbica,  $X_4$  y  $X_5$  son P o G o P y m es un número entero que oscila entre 10 y 100.

45 La expresión "aminoácido de cadena lateral hidrofóbica" se ha descrito anteriormente en relación con el primer componente del polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención. No obstante, la invención contempla polipéptidos en los que los aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica que aparecen en las distintas posiciones del segundo componente pueden ser los mismos o diferentes. Así, en una forma preferida de realización, el aminoácido de cadena lateral hidrofóbica en posición -2 con respecto al resto de Ile es Val, el aminoácido de cadena lateral hidrofóbica en posición -1 con respecto al resto de Ile es

50 En una forma preferida de realización,  $X_3$  es V, de forma que el segundo componente tiene la secuencia  $(VX_4IX_5G)_m$ . En una forma de realización más preferida,  $X_4$  es G de forma que el segundo componente tiene la secuencia  $(VGIX_5G)_m$ . En otra forma de realización aún más preferida,  $X_5$  es P de forma que el segundo componente tiene la secuencia  $(VGIPG)_m$ .

55 En otra forma preferida de realización, m toma el valor de 60 en cuyo caso el componente (b) del polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención es una región hidrofóbica de secuencia

## ES 2 428 405 A1

(X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>IX<sub>5</sub>G)<sub>60</sub>. En otra forma preferida de realización, X<sub>3</sub> es V, X<sub>5</sub> es G y X<sub>5</sub> es P de forma que el segundo componente tiene la secuencia (VGIPG)<sub>60</sub>.

5 En una forma preferida de realización, X<sub>1</sub> es V; X<sub>2</sub> es E; X<sub>3</sub> es V; X<sub>4</sub> es G; X<sub>5</sub> es P; n es 10 y m es 60 de forma que la secuencia formada por los componentes (a) y (b) de la invención es la SEQ ID NO: 28

```

1   VPGVGVPGVG VPGEGVPGVG VPGVGVPGVG VPGVGVPGEG VPGVGVPGVG VPGVGVPGVG
61  VPGEGVPGVG VPGVGVPGVG VPGVGVPGEG VPGVGVPGVG VPGVGVPGVG VPGEGVPGVG
10  121 VPGVGVPGVG VPGVGVPGEG VPGVGVPGVG VPGVGVPGVG VPGEGVPGVG VPGVGVPGVG
181 VPGVGVPGEG VPGVGVPGVG VPGVGVPGVG VPGEGVPGVG VPGVGVPGVG VPGVGVPGEG
241 VPGVGVPGVG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG
301 VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG
361 VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG
15  421 VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG
481 VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG VGIPGVGIPG
541 VGIPGVGIPG

```

que se puede representar de forma abreviada como:

20  $[(VPGVG)_2 VPEG (VPGVG)_2]_{10}-(VGIPG)_{60}$

En una forma preferida de realización, el polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención comprende adicionalmente una región polipeptídica que permite la translocación de dicho polipéptido a través de membranas biológicas.

25 Estas secuencias son conocidas de forma genérica como dominios de traducción de proteína (Protein-transducing domains o PTDs). PTDs adecuados para su uso en la presente incluyen, sin limitación, polipéptidos que comprenden la región mínima de la proteína TAT de HIV formada por la secuencia de aminoácidos RKKRRQRR (TAT49-57) (SEQ ID NO: 24), variantes sintéticas de dicha secuencia tales como YARKARRQARR (SEQ ID NO:25); YARAARRAARR (SEQ ID NO:26); YARAARRAARA (SEQ ID NO:27); YARAAARQARA (SEQ ID NO: 2), la proteína VP22 de HSV-1, polipéptidos que comprenden la secuencia RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 1), derivada de la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia (*A*), homeodominios derivados de las proteínas Fushi tarazu (*Ftz*) y Engrailed (*En*), polilisina, poliarginina (por ejemplo, Arg<sub>9</sub>), secuencias formadas por lisina y arginina, Transportan, MAP, MTS, o PEP-1.

En una forma preferida de realización, el polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención comprende adicionalmente una secuencia de adhesión celular.

40 Por "secuencia de adhesión celular" tal y como se usa en la presente invención se refiere a una secuencia que permite la unión de una proteína a una célula o a un componente de la matriz extracelular.

45 Secuencias de adhesión celular útiles en la presente invención, sin que sirvan para limitar la invención, son entre otras la secuencia RGD presente en las proteínas de matriz extracelular fibronectina, vitronectina, laminina colágeno, fibronectina, trombospondina, factor con Willebrand's, entactina y tenascina; secuencias de laminina como YIGSR (SEQ ID NO:15), IKVAV (SEQ ID NO:16), LRE, LGTIPG (SEQ ID NO:17), PDSGR (SEQ ID NO:18) y RNIAEIIKDA (SEQ ID NO:19); secuencia REDV (SEQ ID NO:20) de fibronectina; la secuencia DGEA (SEQ ID NO:21) de colágeno, la secuencia VTXG (SEQ ID NO:22) de trombospondina y la secuencia VGVAPG (SEQ ID NO:23) de elastina.

50 Métodos para analizar la capacidad de adhesión celular de una molécula, y por tanto si una secuencia favorece la adhesión celular se resumen en *Humphries MJ. Methods Mol Biol. 2009;522:203-10*. Además, existen comercialmente distintos kits para analizar la capacidad de adhesión.

En otra forma de realización, el polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención comprende adicionalmente un péptido de inicio de la traducción.

55 Por "péptido de inicio de la traducción" se refiere a un péptido que resulta de la traducción de una región iniciadora de la traducción en el ARNm que codifica el polipéptido de la invención. Típicamente, dicho péptido resulta de la traducción de una región en el ARNm correspondiente que comprende la secuencia en posición 5' RTG/RUG que da lugar a un resto de metionina. En un aspecto particular adicional, el péptido de inicio de la traducción es MESLLP (SEQ ID NO: 3)

5 En otra forma de realización, el polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención comprende adicionalmente un péptido con capacidad de unir ácidos nucleico formado por una región rica en aminoácidos básicos, como por ejemplo, oligo-Lys, oligo-Arg o oligo-Lys/Arg. Esta región puede encontrarse en la región N- o C-terminal del polipéptido similar a elastina de forma que la unión al ácido nucleico no interfiera con la formación de las nanopartículas.

El componente (ii) del conjugado de la invención es al menos una molécula antigénica seleccionada del grupo formado por un péptido, un ácido nucleico o un polisacárido antigénico.

10 Por "molécula antigénica", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de naturaleza peptídica, un ácido nucleico o un polisacárido que comprenden uno o más epítomos capaces de estimular el sistema inmune de un organismo para generar una respuesta humoral o celular específica del antígeno. Como resultado de la puesta en contacto de la molécula antigénica con las células apropiadas en un sujeto, el antígeno genera un estado de sensibilidad o capacidad de respuesta inmune  
15 en dicho sujeto de forma que tanto anticuerpos como células inmunes obtenidas a partir de dicho sujeto son capaces de reaccionar de forma específica con el antígeno.

Diversos métodos son conocidos por el experto en la materia para determinar los péptidos antigénicos de una proteína. Por ejemplo, el método descrito en Kolaskar As. et al, 1990 FEBS Lett. Dec 10; 276(1-2):172-4 se basa en que las regiones más probables de contener sitios antigénicos son aquellos en los que los residuos cisteína, leucina y valina se encuentran en la superficie de una proteína; Liang S. et al, BMC Bioinformatics. 2010 Jul 16;11:381 describe dos aplicaciones para la determinación de epítomos discontinuos. Otros métodos se describen en Yang X. et al, Rev Med Virol 2009, 19:77-96 y Larsen JE. et al, Immunome Res 2006, 2:2 entre otros.

25 El término "péptido", según se usa en la presente invención, se refiere a un compuesto formado por dos o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos.

30 El término "ácido nucleico", según se usa en la presente invención, se refiere a polímeros formados por la repetición de monómeros llamados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster.

El término "polisacárido", según se usa en la presente invención, se refiere a polímeros cuyos monómeros constituyentes son monosacáridos, los cuales se unen repetitivamente mediante enlaces glucosídicos.

35 Por el término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia capaz de ser reconocida por el sistema inmune de un sujeto y/o capaz de inducir en un sujeto una respuesta inmune humoral o una respuesta inmune celular que conduce a la activación de linfocitos B y/o T cuando se introduce en un sujeto; a modo ilustrativo, dicho término incluye cualquier producto inmunogénico, nativo o recombinante, obtenido de un organismo superior o de un microorganismo, por ejemplo, una bacteria, un virus, un parásito, un protozoo, un hongo, etc., que contiene uno o más determinantes antigénicos, por ejemplo, componentes  
40 estructurales de dichos organismos; toxinas, por ejemplo, exotoxinas, etc. Prácticamente cualquier antígeno puede ser utilizado en la elaboración del conjugado de la invención incluyendo proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos entre otros.

45 Ejemplos de péptidos y proteínas inmunológicamente activos/activas, antigénicos, sin que sirvan para limitar la invención, incluyen:

- Péptidos o proteínas capaces de (apropiados o diseñados para) inducir una respuesta inmune frente a una enfermedad infecciosa, tal como una enfermedad infecciosa en animales causada por microorganismos patógenos de animales, incluyendo al ser humano, por ejemplo, virus, bacterias, hongos y parásitos infecciosos, relevantes en sanidad humana o animal.

55 Las proteínas o péptidos capaces de inducir una respuesta inmune pueden ser proteínas o péptidos recombinantes, idénticos o similares a los antígenos naturales de un microorganismo específico.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de virus infecciosos incluyen virus de las familias: Arteriviridae, Retroviridae, Picornaviridae, Calciviridae, Togaviridae, Flaviridae, Coronoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Bungaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Hepadnaviridae, Parvoviridae (parvovirus), Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Iridoviridae, etc. Ejemplos de antígenos que se pueden emplear según la presente invención incluyen, aunque no se limita a, antígenos de HIV, antígeno gp120, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígenos de rotavirus como VP4 y VP7, antígenos del virus de la influenza como la hemaglutinina o la nucleoproteína, antígeno del herpes simplex timidina kinasa, etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de bacterias incluyen tanto bacterias Gram positivas, e.g., *Pasteurella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, etc., como bacterias Gram negativas, e.g., *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, etc. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen:

5 *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sp.* (e.g., *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A de Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B de Streptococcus), Streptococcus (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*,

10 *Corynebacterium diptheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, *Actinomyces israelii*, *Chlamydia*, etc.

15 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de hongos infecciosos incluyen *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis* y *Candida albicans*.

Entre los parásitos infecciosos se incluyen, a modo ilustrativo, no limitativo, protozoos, tales como

20 *Plasmodium sp.*, causantes de la malaria, e.g. *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, etc., *Leishmania sp.*, causantes de leishmaniasis, e.g., *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, etc., *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma sp.*, etc., así como nematodos parásitos, tales como *Dirofilaria immitis*, etc. Ejemplos de antígenos para estos parásitos incluyen el antígeno circunsporozoito de *Plasmodium spp.*; el antígeno de superficie merozoito de *Plasmodium spp.*; el

25 antígeno SPf66 de *P. falciparum*; el antígeno S-3, molécula que incluye cuatro epitopos correspondientes a diferentes estadios del ciclo de vida de *P. falciparum*; el gp63 de *Leishmania spp.*, etc.

▪ Péptidos o proteínas asociados a tumores o cánceres (“marcadores tumorales”) capaces de (apropiados o diseñados para) inducir una respuesta inmune frente a una célula tumoral o

30 cancerosa, por lo que el péptido o proteína puede ser utilizado en el tratamiento de cánceres mediante la estimulación de una respuesta inmune específica de antígeno frente a un antígeno tumoral.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de cánceres que podrían ser potencialmente tratados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen cáncer del tracto biliar, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de estómago, neoplasmas intraepiteliales, linfomas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (e.g.,

35 cáncer de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas), melanoma, neuroblastomas, cáncer de boca, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de recto, sarcomas, cáncer de

40 piel, cáncer de testículos, cáncer de tiroides y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas.

La selección de antígenos tumorales o determinantes antigénicos para el tratamiento de cánceres puede ser realizada por un experto en la materia a la vista del estado de la técnica (Renkvist *et al.* 2001, Cancer Immunol. Immunother. 50: 3-15), estando dichos antígenos y determinantes antigénicos incluidos dentro

45 del ámbito de la presente invención. Ejemplos representativos de dichos antígenos o determinantes antigénicos incluyen: Her2 (cáncer de mama); GD2 (neuroblastoma); EGF-R (glioblastoma maligno); CEA (cáncer de tiroides medular); CD52 (leucemia); proteína gp100 de melanoma humano; proteína melan-A/MART-1 de melanoma humano; tirosinasa; proteína NA17-A nt; proteína MAGE-3; proteína p53; proteína HPV16E7; y fragmentos antigénicos de dichos péptidos o proteínas.

50 ▪ Péptidos o proteínas capaces de (apropiados o diseñado para) inducir una respuesta inmune frente a un alérgeno.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “alérgeno” se refiere a un péptido o proteína a la que un

55 sujeto es sensible y provoca una reacción inmunitaria, por ejemplo, extractos alérgicos de pólenes, extractos alérgicos de insectos, extractos alérgicos de alimentos o productos alimenticios, componentes presentes en saliva, pinzas o agujones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, componentes presentes en plantas que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, etc. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de alérgenos incluyen extractos proteicos de pólenes,

60 e.g., de *Lolium perenne*, *Poa pratense*, *Phleum pratense*, *Cynodon dactylon*, *Festuca pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Triticum sativa*, *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum vulgare*, *Parietaria judaica*, *Salsola kali*, *Urtica dioica*, *Olea europea*, *Platanus sp.*, *Cupressus sp.*, etc.; extractos proteicos de insectos, e.g., de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Euroglyphus*

*maynei*, *Glyciphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, etc.; extractos proteicos de hongos o de epitelios animales, e.g., *Penicillium sp.*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, epitelio de perro, epitelio de gato, epitelio de caballo, etc.; extractos proteicos de alimentos o productos alimenticios, etc.

5

- Péptidos o proteínas capaces de (apropiados o diseñados para) inducir una respuesta mejorada frente a un auto-antígeno. El término "auto-antígeno", tal como aquí se utiliza, se refiere a péptidos o proteínas codificados por el ADN del sujeto y productos generados por proteínas o ARN codificado por el ADN del sujeto. Ejemplos de auto-antígenos se describen en WO

10

Polisacáridos antigénicos, sin que sirvan para limitar la invención, incluyen por ejemplo polisacáridos capsulares como N-acetilmanosamina derivados de *Haemophilus influenza*, neumococo, estreptococo  $\beta$  hemolítico y *E. coli*, entre otros.

15

En una realización particular el componente (ii) del conjugado de la invención es un péptido antigénico.

En otra realización adicional, la molécula antigénica comprendida en el conjugado de la invención es un péptido antigénico de *M. tuberculosis*.

20

Por "*Mycobacterium tuberculosis*" según se emplea en la presente invención se refiere a una bacteria gram positiva, alcohol-ácida resistente, aeróbica estricta y que pertenece al género *Mycobacterium*.

En una realización particular el péptido antigénico de *M. tuberculosis* es un péptido de la proteína Hsp 16.3 (SEQ ID NO:4).

25

Por "proteína Hsp 16.3" se entiende la proteína de *M. tuberculosis* con número de acceso P0A5B7 de la base de datos Uniprot y que actúa como chaperona y tiene capacidad para suprimir la desnaturalización termal de la alcohol deshidrogenasa.

30

En otra realización particular adicional el péptido de la proteína Hsp 16.3 es el péptido comprendido entre las posiciones 91 a 110 con la secuencia descrita en SEQ ID NO: 5.

### 35 Estructura de los conjugados de la invención

En aquellas formas de realización en donde el componente (ii) es de naturaleza peptídica, es preferible que este se encuentre formando parte junto con los componentes (a) y (b) de una única cadena polipeptídica. Así, en una forma preferida de realización, el conjugado de la invención es una proteína de fusión que comprende los componentes (a), (b) y (ii) siendo el componente (ii) de naturaleza peptídica.

40

En el caso particular de que los componentes (i) y (ii) del conjugado de la invención estén formando una única cadena polipeptídica, el experto apreciará que el ordenamiento de los componentes (i) y (ii) en la cadena polipeptídica puede ser cualquiera siempre que dé lugar a la formación de nanopartículas capaces de vehicular el péptido inmunogénico al sistema inmune.

45

En una forma preferida de realización, el péptido antigénico se encuentra en posición N-terminal con respecto al componente (i) que, a su vez, se encuentra en posición N-terminal con respecto al componente (ii). En ese caso, se obtienen nanopartículas que presentan el péptido inmunogénico al exterior. En otra forma preferida de realización, el péptido antigénico se encuentra en posición C-terminal de manera que dicho péptido quedará expuesto tras su procesamiento y exposición por parte de las células presentadoras de antígenos. En este caso, el conjugado de la invención puede contener adicionalmente una secuencia adicional capaz de permitir la translocación del polipéptido (o de las partículas formadas por dichos polipéptidos) a través de membranas biológicas.

50

El término "secuencia que permite la traslocación de dicho polipéptido a través de membranas biológicas" ha sido definido anteriormente.

55

En el caso particular de que los componentes (i), (ii) y la secuencia de adhesión celular del conjugado de la invención estén formando una única cadena polipeptídica, el experto apreciará que el ordenamiento de los componentes (i), (ii) y la secuencia de adhesión celular en la cadena polipeptídica puede ser cualquiera siempre que dé lugar a la formación de nanopartículas capaces de presentar el péptido inmunogénico al exterior y de conseguir una adhesión celular adecuada. En una forma preferida de

60

realización, secuencia de adhesión celular se encuentra en posición N-terminal con respecto al componente (i) que, a su vez, se encuentra en posición N-terminal con respecto al componente (ii).

5 El término "secuencia de adhesión celular" ha sido definido anteriormente.

En los casos en los que los componentes (i) y (ii) formen una única cadena polipeptídica, cadena polipeptídica o polipéptido de la invención, y que dicha cadena polipeptídica comience por la secuencia (i) o (ii) y debido a la ausencia en posición N-terminal de dichas secuencias de restos de metionina, es necesario modificar el polinucleótido que codifica la cadena polipeptídica de la invención de forma que incorpore un sitio de iniciación de la traducción en el ARNm resultante. La incorporación de dicha región en el polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención da lugar a la aparición en posición N-terminal de dicho polipéptido de una región extra que se denomina en la presente invención como péptido de inicio de la traducción. Así, en una realización particular, el polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención comprende un péptido de inicio de la traducción.

El término "péptido de inicio de la traducción" ha sido definido anteriormente.

En los casos en los que los componentes (i) y (ii) formen una única cadena polipeptídica, dicho polipéptido puede contener adicionalmente una región con capacidad de unir ácidos nucleicos. Secuencias adecuadas para unir ácidos nucleicos están formadas habitualmente por una región rica en aminoácidos básicos, como por ejemplo, oligo-Lys, oligo-Arg o oligo-Lys/Arg.

En una realización particular, el polipéptido similar a elastina del conjugado de la invención comprende adicionalmente la secuencia de inicio de la traducción (preferiblemente la secuencia SEQ ID NO:3), en posición N-terminal, seguida de la secuencia del péptido antigénico (preferiblemente la secuencia SEQ ID NO:4) seguida del componente (a) (preferiblemente de secuencia  $[(X_1PGX_1G)_2 X_1PGX_2G(X_1PGX_1G)_2]_n$  en donde  $X_1$  y  $n$  toman los valores definidos anteriormente) y seguida del componente (b)  $((X_3X_4IX_5G)_m$  en donde  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$  y  $m$  toman los valores indicados anteriormente). En una forma de realización aún más preferida, el conjugado de la invención comprende la secuencia SEQ ID NO: 29:

```

30      1  MESLLPVSEF  AYGFSVRTVS  LPVGADEVPG  VGVPGVGVPG  EGVPGVGVPG  VGVPGVGVPG
      61  VGVPGEGVPG  VGVPGVGVPG  VGVPGVGVPG  EGVPGVGVPG  VGVPGVGVPG  VGVPGEGVPG
      121 VGVPGVGVPG  VGVPGVGVPG  EGVPGVGVPG  VGVPGVGVPG  VGVPGEGVPG  VGVPGVGVPG
      181 VGVPGVGVPG  EGVPGVGVPG  VGVPGVGVPG  VGVPGEGVPG  VGVPGVGVPG  VGVPGVGVPG
35      241 EGVPGVGVPG  VGVPGVGVPG  VGVPGEGVPG  VGVPGVGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI
      301 PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI
      361 PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI
      421 PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI
40      481 PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI
      541 PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI  PGVGIPGVGI

```

que se puede representar de forma abreviada como:

MESLLP-VSEFAYGFSVRTVSLPVGAE-[VPGVG]<sub>2</sub> VPGEG (VPGVG)<sub>2</sub>]<sub>10</sub>-(VGIPG)<sub>60</sub>

45 Preparación de los conjugados de la invención

El experto en la material apreciará que existen distintos métodos para obtener los conjugados de acuerdo a la presente invención, siendo todos ellos aplicables. Por ejemplo, los conjugados de acuerdo a la invención se pueden obtener mediante síntesis química (véase L. Andersson et. al., *Biopolymers* 55(3), 227-50 (2000)), mediante técnicas de ADN recombinante (J. Cappello, *Genetically Engineered Protein Polymers, Handbook of Biodegradable Polymers*, Domb, A. J.; Kost, J.; Wiseman, D. (Eds.), Harvard Academic Publishers, Amsterdam; pages 387-414) y mediante síntesis mediada por enzimas (for example, C. H. Wong and K. T. Wang, *New Developments in Enzymatic Peptide Synthesis, Experientia* 47(11-12), 1123-9 (1991)). Por ejemplo, los conjugados de acuerdo a la invención se pueden obtener usando los métodos descritos en US5243038 y US6355776, cuyos contenidos se incorporan por referencia en el presente documento. Alternativamente, los conjugados de la invención se pueden obtener usando una sintasa de péptidos no ribosomal tal y como ha sido descrito por H. V. Dohren, et al. (*Chem.Rev.*, 1997, 97: 2675-2705).

En una forma preferida de realización, los ELPs de acuerdo a la presente invención se obtienen mediante técnicas de ADN recombinante usando una célula hospedadora adecuada transformada con un ácido nucleico que codifica el polímero de acuerdo a la invención. La generación de los ELP mediante técnicas de ADN recombinante tiene distintas ventajas con respecto a la síntesis química. En primer lugar, la síntesis mediante expresión recombinante permite obtener polímeros de longitud exacta mientras que la

5 síntesis química da lugar habitualmente a una distribución de polímeros de distinta longitud. En segundo lugar, la síntesis mediante expresión recombinante permite seleccionar de forma muy precisa el punto de inserción de la molécula antigénica. En tercer lugar, el polímero puede ensamblarse de forma espontánea en complejos proteicos en la propia célula en la que se sintetiza. Por último, los polímeros comprenden aminoácidos presentes en el organismo, dando lugar a polímeros biodegradables, biocompatibles y tolerados por el sistema inmune.

10 Cuando los conjugados de la invención se obtienen a partir de una célula hospedadora adecuada transformada con un ácido nucleico que codifica el polímero de acuerdo a la invención, es necesario purificar dicho conjugado del resto de conjugados que aparecen en el sistema de expresión seleccionado.

15 Sistemas adecuados para la purificación de un polipéptido obtenido de forma recombinante a partir de un hospedador de elección incluyen, sin limitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión molecular, purificación por solubilidad diferencial o cualquier otro método estándar para la purificación de proteínas. En el caso particular de que la purificación del polipéptido se lleve a cabo mediante cromatografía de afinidad, la invención contempla el que el polipéptido de la invención contenga una región adicional que pueda ayudar a su purificación del medio de cultivo o del extracto celular. Para ello, el polipéptido puede estar modificado mediante la introducción de una cualquier péptido o secuencia peptídica que permita el reconocimiento del péptido o proteína de fusión por un anticuerpo. Ejemplos de dichas secuencias son, por ejemplo, péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E, FLAG y, en general, cualquier otra secuencia reconocida por un anticuerpo. Alternativamente, el conjugado de la invención puede estar modificado por una secuencia de polihistidina, lo que permite la purificación de dicho conjugado modificado mediante el uso de matrices en las que se ha inmovilizado un metal que es capaz de unirse de forma específica al resto de polihistidinas.

30 Los conjugados de la invención de sufrir una transición reversible en función de la temperatura y/o del pH del medio desde un estado en el que forman cadenas elongadas muy solubles a agregados con distinta estructura y grado de solubilidad. Esta propiedad de los conjugados de la invención puede ser aplicada para la separación de dichos conjugados de otros compuestos presentes en la muestra mediante la realización de uno o varios ciclos de transición térmica o de cambios del pH térmica con la consiguiente formación de nanopartículas que pueden ser separadas del resto de componentes mediante centrifugación diferencial seguido de un nuevo cambio de temperatura o pH por debajo del valor de transición de forma que se obtengan de nuevo los polipéptidos en forma de estructuras elongadas. Por tanto, en una forma preferida de realización, el polipéptido de la invención se obtiene en forma purificada mediante la aplicación de sucesivos ciclos de transición mediados por cambios en las características fisicoquímicas del medio.

40 Así, dependiendo de la presencia en el ELP de bloques sensibles a temperatura o sensibles a pH, y de las condiciones de pH y temperatura, los ELPs sufren una transición reversible desde un estado en el que forman cadenas elongadas muy solubles a agregados con distinta estructura y grado de solubilidad. En el caso de los ELPs de acuerdo a la presente invención, los bloques formados por el componente (i) de secuencia general  $[(X_1PGX_1G)_2 X_1PGX_2G(X_1PGX_1G)_2]_n$  en donde  $X_1$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofóbica,  $X_2$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofílica y  $n$  es de 5 a 10 son sensibles a cambios de pH, mientras que los bloques de secuencia  $(X_3X_4X_5G)_m$  en donde  $X_3$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofóbica,  $X_4$  y  $X_5$  son G o P y  $m$  es entre 10 y 100 son sensibles a cambios de temperatura.

50 Así, un ELP se puede definir por la temperatura media a la que tiene lugar la transición de fase. Así, los ELPs de la invención tienen una temperatura mediana de transición de fase de en torno a 5°C, en torno a 10°C, en torno a 15°C, en torno a 20°C, en torno a 25°C, en torno a 30°C, en torno a 35°C, en torno a 37°C, de en torno a 38°C, de en torno a 39°C, de en torno a 40°C, de en torno a 41°C, de en torno a 42°C, de en torno a 43°C, de en torno a 44°C, de en torno a 45°C, de en torno a 46°C o más. Alternativamente, los ELPs de acuerdo a la invención se definen en base al rango de temperatura en el que se produce la transición de fases. Por ejemplo, la transición puede ocurrir en un rango de 5°C, de 4°C, de 3°C, de 2°C, de 1°C o de menos.

60 Se entenderá que la temperatura de transición de un ELP se puede modificar a voluntad variando el número de repeticiones de bloques hidrofóbicos e hidrofílicos. Típicamente, es posible aumentar la temperatura de transición disminuyendo el número de bloques hidrofóbicos.

Nanopartículas de la invención

5 Los conjugados de la invención se caracterizan por sufrir un cambio conformacional en función de la temperatura y en función del pH pasando de formar cadenas elongadas de alta solubilidad a agregados con distinta estructura y grado de solubilidad. Los ELPs de acuerdo a la presente invención sufren una transición dando lugar a nanopartículas de hasta 200 nm de diámetro con una baja polidispersidad y a partir de concentraciones de  $\mu\text{M}$  (0.02%) en cuestión de segundos y en condiciones fisiológicas.

10 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una nanopartícula que comprende dos o más conjugados de la invención.

15 En una realización particular la nanopartícula de la invención comprende al menos 100 conjugados de la invención, preferiblemente al menos 150 conjugados de la invención, más preferiblemente al menos 200 conjugados de la invención, más preferiblemente al menos 250 conjugados de la invención. En otra realización particular adicional la nanopartícula de la invención comprende entre 200 y 240 conjugados de la invención. En otra realización particular adicional la nanopartícula de la invención comprende entre 250 y 290 conjugados de la invención.

20 El término "nanopartícula", según se usa en la presente invención, se entiende como una partícula microscópica cuyo tamaño es menor de en torno a 1000 nm, preferiblemente de 1 a 100 nm. El tamaño de la nanopartícula puede oscilar de acuerdo a distintas formas de realización de la invención, entre 1 y 200 nm, entre 1 y 150 nm, entre 1 y 100 nm, entre 1 y 10 nm.

25 El término "polidispersidad" o "índice de polidispersidad", según se usa en la presente invención para referirse a los polímeros, es un parámetro que indica el grado de variación o amplitud de una campana gaussiana que representa los pesos moleculares de un polímero. Se determina por la división del peso molecular promedio en masa y el peso molecular promedio en número ( $M_w/M_n$ ). En una forma preferida de realización, los complejos de la invención tienen una polidispersidad de en torno a 1. En otra forma preferida de la invención los complejos de la invención tienen una polidispersidad menor o igual de 0,1.

30 Las condiciones de temperatura necesarias para que se formen las nanopartículas dependen del número de repeticiones de bloques hidrofóbicos e hidrofílicos. En una forma preferida de realización, las nanopartículas de la invención se obtienen de forma espontánea en condiciones fisiológicas. La expresión "condiciones fisiológicas", según se usa en la presente invención, indica condiciones de temperatura, tonicidad y pH que aparecen de forma típica en el interior de una célula viva. Condiciones adecuadas para la formación de las nanopartículas de la invención incluyen un pH de en torno a 7,5, una temperatura de en torno a 37°C y una tonicidad de en torno 290 miliosmoles (mOsm)/kg.

40 Las nanopartículas obtenidas a partir de los conjugados de la invención se pueden caracterizar en cuanto a su temperatura de transición mediante calorimetría diferencial de barrido, en cuanto a su tamaño mediante microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica (Cryo-TEM), mediante difusión dinámica de luz (DLS) o mediante espectroscopía de correlación de fotones; en cuanto al grado de polidispersidad.

45 Polinucleótido, vector y célula hospedadora de la invención

50 En una realización adicional, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica para el polipéptido de la invención (en adelante primer polinucleótido de la invención en el que los componentes del conjugado de la invención forman una única cadena polipeptídica).

55 Por "polinucleótido" según se emplea aquí, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y formada por ribonucleótidos y/o deoxiribonucleótidos. El término incluye tanto polinucleótidos de cadena sencilla como de cadena doble, así como polinucleótidos modificados (metilados, protegidos y similares).

Preferiblemente, las secuencias de nucleótidos que forman el primer polinucleótido están en el mismo marco de lectura correcto para su expresión.

60 En otra realización adicional, la invención se relaciona con un vector que contiene el polinucleótido de la invención. El experto en la materia apreciará que no existe limitación en cuanto al tipo de vector que puede ser utilizado ya que dicho vector puede ser un vector de clonaje adecuado para la propagación y para obtener los polinucleótidos o construcciones génicas adecuadas o vectores de expresión en distintos organismos heterólogos adecuados para la purificación de los conjugados. Así, vectores adecuados de acuerdo a la presente invención incluyen vectores de expresión en procariotas tales como pUC18,

pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCRI, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAXI, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI.

El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariontas o eucariotas. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook et al., 2001, "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Vol 1-3 a).

Preferiblemente, el vector comprende el polinucleótido de la invención operativamente unido a secuencias reguladoras de la expresión del polinucleótido de la invención. Las secuencias reguladoras de utilidad para la presente invención pueden ser promotores nucleares o, alternativamente, secuencias potenciadoras ("enhancer") y/o otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En principio, cualquier promotor puede ser utilizado en la presente invención siempre que dicho promotor sea compatible con las células en las que se desea expresar el polinucleótido. Así, promotores adecuados para la realización de la presente invención incluyen, sin estar necesariamente limitados, promotores constitutivos tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del poliovirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen EF-1alpha así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NFκB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico, los promotores regulables de la ARN polimerasa II descritos en WO/2006/135436 así como promotores específicos de tejido.

En otra realización adicional, la invención se relaciona con una célula que contiene el conjugado, la nanopartícula, el polipéptido o el vector de la invención. Dicha célula ha podido ser transformada, transfectada o infectada con una construcción o vector proporcionado por esta invención. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al., 2001, citado *supra*).

Células adecuadas para llevar a cabo la invención, incluyen, sin limitación, células de mamíferos, plantas, insectos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, sin estar limitado, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células del género *Escherichia* y *Pseudomonas*. Células de hongos incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Células de insectos incluyen, sin limitación, células de *Drosophila* y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para en la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.), células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células ECCs humana NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH y MCF-7 y células hMSCs.

#### Usos médicos del conjugado, nanopartícula, polinucleótido, vector y célula de la invención

En otra realización adicional, la invención se relaciona con el conjugado, la nanopartícula, el polinucleótido, el vector o la célula de la invención para su uso como medicamento.

Para uso como medicamento, la composición farmacéutica de la invención comprende el conjugado o nanopartícula de la invención bien de forma aislada o bien en combinación con agentes activos adicionales. El conjugado o nanopartícula de la invención puede ser formulado conjuntamente con un excipiente que sea aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

En otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el conjugado, la nanopartícula, el polinucleótido, el vector o la célula de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad para estimular y/o inducir la respuesta inmune de un individuo frente a la molécula antigénica.

Por "estimular o inducir la respuesta inmune" se refiere a producir un incremento de la respuesta humoral (desarrollo de inmunoglobulinas frente a un antígeno) o celular (mediada por linfocitos T).

Métodos para determinar si un conjugado o nanopartícula es capaz de estimular o inducir la respuesta inmune, se incluyen entre otros la determinación de anticuerpos específicos frente a dicho/s conjugado o nanopartícula, así como la liberación de citoquinas en respuesta al antígeno.

Para identificar los anticuerpos con la especificidad deseada pueden usarse ensayos inmunológicos, tales como ensayos de inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunotransferencias Western, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones u otros ensayos inmunológicos conocidos en la materia.

Entre las citoquinas que pueden analizarse para determinar la estimulación de la respuesta inmune destacan entre otras IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, TGF beta, IFN gamma, TNF-alpha. La cuantificación de los niveles de citoquinas puede llevarse a cabo por ELISA.

Enfermedades causadas por infecciones virales que pueden ser tratadas con el polipéptido o nanopartícula de la invención incluyen, sin limitación, enfermedades causadas por infecciones por el virus VIH-1 (SIDA), por el herpesvirus humano tales como el virus del herpes simple (herpes simple, herpes genital), citomegalovirus (mononucleosis, retinitis, hepatitis), el virus de Epstein Barr (mononucleosis infecciosa, el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo) y el virus de la varicela zóster (varicela, herpes zóster); por los virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis B o virus de la hepatitis C, por paramixovirus tales como virus respiratorio sincitial, virus parainfluenza virus de la rubeola, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano; flavivirus tales como el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus de la encefalitis transmitido por garrapatas o el virus de la encefalitis japonesa) y rotavirus. Otro tipo de infecciones virales que pueden ser tratadas con los polipéptidos y complejos proteicos de la presente invención se describen en detalle en Fundamental Virology, segunda edición, eds. Fields, B. N. y Knipe, D. M. (Raven Press, Nueva York, 1991).

Enfermedades causadas por infecciones bacterianas que pueden ser tratadas con los compuestos de la invención incluyen, sin limitación, enfermedades causadas por microorganismos del género *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Listeria*, *Aerobacter*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Pneumococcus*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Serratia*, *Providencia*, *Chromobacterium*, *Brucella*, *Yersinia*, *Haemophilus* o *Bordetella*.

Enfermedades causadas por infecciones fúngicas que pueden ser tratadas con los polipéptidos y complejos proteicos de la invención incluyen, sin limitación, candidiasis, aspergilosis, histoplasmosis, meningitis criptocócica y similares.

Infestaciones parasitarias que pueden ser tratadas con los compuestos y combinaciones de la invención incluyen, sin limitación, paludismo, infección por *Pneumocystis jiroveci*, neumonía, enfermedad del sueño, leishmaniosis, criptosporidiosis, toxoplasmosis y tripanosoma.

5

Trastornos de tipo alérgico que pueden ser tratados con los compuestos y composiciones de la invención incluyen, sin limitación, alergias causadas por exposición al polen (alérgenos del polen de árboles, hierba, maleza y césped), alergias causadas por exposición a alérgenos de insectos (alérgenos inhalables, de la saliva y del veneno), a alérgenos de la caspa y del pelo de animales y a alérgenos de la comida.

10

En una realización particular, la invención se refiere al uso del conjugado, de la nanopartícula, del polinucleótido, del vector o de la célula de la invención para estimular y/o inducir una respuesta inmune frente a tuberculosis.

15

En otra realización adicional, la invención se relaciona con el uso del conjugado, de la nanopartícula, del polinucleótido, del vector o de la célula de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad para estimular y/o inducir la respuesta inmune de un individuo frente a la molécula antigénica.

20

En una realización particular, la invención se refiere al uso del polipéptido, de la nanopartícula, del vector o de la célula de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de tuberculosis.

25

En una realización particular, el conjugado, la nanopartícula, el polinucleótido, el vector o la célula de la invención es administrada por vía mucosa o tópica.

#### CONSTRUCCIONES Y VECTORES DE USO GENERAL DE LA INVENCION

30

El experto en la materia apreciará que los polímeros similares a elastina de acuerdo a la presente invención pueden fusionarse a cualquier polipéptido frente al que se desee generar una respuesta inmune en un sujeto. Para ello, es conveniente disponer de polinucleótidos que comprenden la secuencia codificante de dicho polímeros similares a elastina. Estos polinucleótidos pueden ser modificados a voluntad mediante la inserción de polinucleótidos que codifican en polipéptido antigénico.

35

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido (en adelante segundo polinucleótido de la invención) adecuado para la expresión de una proteína de fusión formada por un polipéptido similar a elastina y un polipéptido antigénico de interés que comprende una secuencia que codifica dicho polipéptido similar a elastina en donde dicho polipéptido similar a elastina comprende:

40

- (i) una región hidrofílica de secuencia  $[(X_1PGX_1G)_2 X_1PGX_2G(X_1PGX_1G)_2]_n$  en donde  $X_1$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofóbica,  $X_2$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofílica, y  $n$  es un número entero entre 5 y 10 y
- (ii) una región hidrofóbica de secuencia  $(X_3X_4IX_5G)_m$  en donde  $X_3$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofóbica,  $X_4$ ,  $X_5$  son G o P y  $m$  es entre 10 y 100.

45

Los términos “polinucleótido”, “polipéptido antigénico”, “región hidrofílica”, “aminoácido de cadena lateral hidrofóbica”, “aminoácido de cadena lateral hidrofílica” han sido explicados en detalle con anterioridad. En formas preferidas de realización,  $n$  es 10, en donde  $X_1$  es V y/o en donde  $X_2$  es E. En una forma de realización aún más preferida, la región hidrofílica tiene la secuencia  $[(VPGVG)_2VPGEG(VPGVG)]_{10}$ . En otras formas preferidas de realización,  $m$  es 60, en donde  $X_3$  es V, en donde  $X_4$  es G y/o en donde  $X_5$  es P. En una forma preferida de realización, la región hidrofóbica tiene la secuencia  $(VGIPG)_{60}$ .

50

En una forma preferida de realización, el segundo polinucleótido de la invención comprende adicionalmente una secuencia iniciadora de la traducción. En una forma de realización aún más preferida, la secuencia iniciadora de la traducción codifica un péptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3.

55

El segundo polinucleótido de la invención puede comprender, preferiblemente, uno o varios sitios que permitan insertar un polinucleótido de interés en dicho polinucleótido de forma que la expresión de dicho polinucleótido de lugar a una proteína de fusión formada por el polipéptido similar a elastina y el polipéptido codificado por el polinucleótido de interés. Preferiblemente, los sitios de clonaje se encuentran agrupados formando un sitio de clonaje múltiple tal y como aparece frecuentemente en vectores de clonaje. Así, el término “sitio de clonaje múltiple”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una serie de dos o más secuencias diana para endonucleasas de restricción próximas entre sí. Sitios de clonaje múltiple incluyen dianas para endonucleasas de restricción que permite la inserción de fragmentos que muestran extremos romos,

60

extremos 5' protuberantes o extremos 3' protuberantes. La inserción de polinucleótidos de interés se lleva a cabo usando métodos estándar de biología molecular tal y como se describen, por ejemplo, por Sambrook et al (*supra*.)

- 5 El segundo polinucleótido de la invención puede aportarse de forma aislada o, preferiblemente, puede aportarse formando parte de un vector para facilitar su propagación y manipulación. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo a la invención.
- 10 La invención se ilustra a continuación en base a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

#### EJEMPLO 1

##### *Producción de polímeros ELPs*

- 15 En la presente invención, se empleó un péptido de 20 aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de la proteína de 16 kDa Hsp 16.3 de *Mycobacterium tuberculosis*, como un antígeno inmunodominante para el desarrollo de vacunas subunitarias basadas en secuencias similares a elastina.
- 20 La proteína Hsp 16.3 de 144 aminoácidos (SEQ ID NO:4) es el mayor constituyente de la membrana de *M. tuberculosis*. Puede inducir *in vivo* respuestas proliferativas de células T así como reacciones retardadas de hipersensibilidad en ratones y cobayas. El estudio de las respuestas de las células T con células de nódulos linfáticos murinas sugieren que el péptido 91-110 SEQ ID NO: 5, que también es
- 25 derivado de la proteína purificada (Bosze S. et al. Biopolymers (Peptide Science), 76 (2004) 467-476), contiene un epítipo de células T.

En la presente invención se ha desarrollado un sistema para desencadenar una respuesta inmune generando una única construcción, evitando los métodos de conjugación convencionales en un método de fabricación fácil, estandarizable y escalable con características consistentes de estabilidad, monodispersidad y económico.

30 Las construcciones E<sub>50</sub>I<sub>60</sub> (SEQ ID NO: 6), Ag E<sub>50</sub>I<sub>60</sub> (SEQ ID NO: 7) y Ag E<sub>50</sub>A<sub>60</sub> (SEQ ID NO: 8) se prepararon con la tecnología de ADN recombinante.

35 Las construcciones E<sub>50</sub>I<sub>60</sub> y Ag E<sub>50</sub>I<sub>60</sub> comprendían el bloque hidrofílico [(VPGVG)<sub>2</sub> VPGE(VPGVG)<sub>2</sub>]<sub>10</sub> con secuencia (SEQ ID NO: 9) y el bloque hidrofóbico (VGIPG)<sub>60</sub> con secuencia (SEQ ID NO:10). La construcción Ag E<sub>50</sub>A<sub>60</sub> comprendía el bloque hidrofílico [(VPGVG)<sub>2</sub> VPGE(VPGVG)<sub>2</sub>]<sub>10</sub> con secuencia (SEQ ID NO: 9) y el bloque hidrofóbico (VPAVG)<sub>60</sub> con secuencia (SEQ ID NO:11)

40 Dichas construcciones se transformaron y expresaron en *E coli* obteniendo las proteínas E<sub>50</sub>I<sub>60</sub> (SEQ ID NO: 12), Ag E<sub>50</sub>I<sub>60</sub> (SEQ ID NO: 13) y Ag E<sub>50</sub>A<sub>60</sub> (SEQ ID NO:14).

#### EJEMPLO 2

##### *Purificación y caracterización de los polímeros ELPs y de sus partículas resultantes*

45 La producción de ELPs en *E. coli* como sistema de expresión implica que la proteína recombinante lleve incorporada los productos del sistema de expresión, incluyendo lípidos (como endotoxinas bacterianas) y proteínas del huésped. Estos productos pueden ser eliminados mediante el protocolo de purificación mediante ciclos de temperatura y un tratamiento adicional con hidróxido sódico.

50 La purificación mediante ciclos térmicos consiste en la precipitación de los polímeros cuando se reducía el pH a 4 y se aumentaba la temperatura a 60 °C, tras su separación por centrifugación se solubilizaba el precipitado en agua fría. Tras 3 ciclos de purificación, el precipitado de proteína se resuspendió en PBS estéril frío y a continuación se añadió hidróxido sódico estéril a una concentración final de 0,4 N y se mezcló manualmente. La mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos y a continuación se añadió 5 M de cloruro sódico hasta una concentración final de 2 M. La proteína se precipitó a 25 °C, se centrifugó a 8.500 g durante 20 minutos a 25 °C y se resuspendió en PBS frío. Este proceso se repitió tres veces. Tras el tercer tratamiento, se ajustó el pH de la solución que contenía la proteína a pH 6-8 para una siguiente desalación y liofilización.

55

60

	Peso molecular estimado (Da)	Peso molecular experimental (Media $\pm$ Des.est.) (Da)	Error peso molecular (%)	Producción (mg/L)	Niveles de endotoxina (EU/mg)
E <sub>50l60</sub>	46981	46999 $\pm$ 19.96	0.04	78.0	<0.1
Ag-E <sub>50l60</sub>	49194	49149 $\pm$ 3.30	0.1	85.5	<0.1
Ag-E <sub>50A60</sub>	49194	49255 $\pm$ 15.95	0.1	75.0	<0.1

**Tabla 1:** Correlación entre las masas esperadas y experimentales obtenidas para Ag-E<sub>50l60</sub>, E<sub>50l60</sub> and Ag-E<sub>50A60</sub> ELPs tras el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOFF y el contenido de endotoxina tras los 3 ciclos de purificación y un segundo tratamiento con hidróxido sódico para la eliminación de endotoxinas. El nivel de endotoxinas se determinó mediante el kit Endpoint Chromogenic LAL Assay de Lonza.

El tamaño y la pureza de las ELP se analizaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 12 % y a continuación se realizó una tinción negativa con Cobre (Figura 1). La banda del gel se analizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 2), se identificó con exactitud la masa de los ELPs (Tabla 1) y las secuencias se confirmaron mediante análisis composicional de aminoácidos (Tabla 2).

Polímero	E <sub>50l60</sub>		Ag-E <sub>50l60</sub>		Ag-E <sub>50A60</sub>	
	Estimado	Experimental	Estimado	Experimental	Estimado	Experimental
asp	0	0.67	1	1.6	0	0
ser	1	1.77	4	3.12	4	4.61
glu	11	12.41	13	12.79	13	14.97
gly	220	222.92	222	226.75	162	165.26
arg	0	0.5	1	1.54	1	1.44
thr	0	0.48	1	1.02	1	1.04
ala	0	0.72	2	2.66	62	66.59
pro	111	110.27	112	111.94	112	108.40
tyr	0	0.23	0	1.13	1	1.81
val	151	146.75	155	150.83	215	208.16
met	1	n.d.	1	0.96	1	1.32
lys	0	0.44	0	0.25	0	0
ile	60	62.05	60	59.77	0	0
leu	2	2.47	3	3.66	3	3.88
phe	0	0.74	2	1.93	2	2.84

**Tabla 2:** Composición de aminoácidos esperada y experimental de Ag-E<sub>50l60</sub>, E<sub>50l60</sub> and Ag-E<sub>50A60</sub> ELPs, basado en el método de separación cromatográfica HPLC.

Brevemente, para analizar la composición de aminoácidos, cada muestra se disolvió en 400  $\mu$ l de agua y 200  $\mu$ l de esta disolución se hidrolizó tras añadir 60  $\mu$ l de ácido  $\alpha$ -aminobutírico 2,5 mM, como control interno, con 6 M HCl y 1% fenol durante 2,5 horas a 155  $^{\circ}$ C. Tras la evaporación completa, el hidrolizado fue resuspendido en 300 ml de 20 mM HCl y se preparó una nueva dilución 1/3. Los aminoácidos de esta

solución se analizaron por HPLC con detector de UV empleando un sistema de gradiente de HPLC modelo 600 con detector Waters (Waters 2487).

5 La transición de temperatura inversa de cada polímero se determinó mediante mediciones turbidimétricas a una densidad óptica de 350 nm y por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

10 Se prepararon soluciones de 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{E}_{50\text{l}60}$  y  $\text{Ag-E}_{50\text{l}60}$  en PBS frío (pH 7,4) filtradas con filtros de PVDF de 0,1  $\mu\text{m}$ . A continuación estas soluciones se emplearon para medir la densidad óptica a 350 nm en un rango de 10  $^{\circ}\text{C}$  - 60  $^{\circ}\text{C}$  en un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-Vis con una cámara para la muestra termostatzada (Figura 3). Se observa que prácticamente no hay diferencia entre los valores de la temperatura de transición entre los polímeros  $\text{E}_{50\text{l}60}$  y  $\text{Ag-E}_{50\text{l}60}$ , (inician a 14 $^{\circ}\text{C}$  y se estabilizan a 20 $^{\circ}\text{C}$  (Figura 4) mientras que los valores de transición observados para  $\text{Ag-E}_{50\text{l}60}$  y  $\text{Ag-E}_{50\text{A}60}$  son claramente diferentes (el de  $\text{Ag-E}_{50\text{A}60}$  inicia a 37 $^{\circ}\text{C}$  y se estabiliza a 45 $^{\circ}\text{C}$ ) (Figura 5).

15 La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizó en un Mettler Toledo 822e con un enfriador de nitrógeno líquido. La calibración de la temperatura y entalpía se realizó con una muestra control de indio. A continuación 20  $\mu\text{l}$  de una solución ELP de 50 mg/ml se colocó en un recipiente de aluminio de 40  $\mu\text{l}$ , herméticamente sellada. El mismo volumen de PBS se colocó en el recipiente de referencia. Se realizaron 4,5 ciclos consecutivos de calentamiento- enfriamiento a 5  $^{\circ}\text{C}$  /min desde 0  $^{\circ}\text{C}$  a 40  $^{\circ}\text{C}$  y de 40  $^{\circ}\text{C}$  a 0  $^{\circ}\text{C}$ , tras 5 minutos a 0  $^{\circ}\text{C}$  (Tabla 3).

Ciclos de calentamiento /enfriamiento	1 <sup>er</sup> ciclo		2 <sup>o</sup> ciclo		3 <sup>o</sup> ciclo		4 <sup>o</sup> ciclo		5 <sup>o</sup> ciclo	
	$T_t$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) $\Delta H$ ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$T_{t-c}$ $\Delta H-c$	$T_{t-e}$ $\Delta H-e$	$T_{t-c}$ $\Delta H-c$						
$\text{E}_{50\text{l}60}$	14.34 - 10.15	12.74 +10.18	14.43 -9.37	12.74 +11.68	14.43 -9.17	12.74 +10.16	14.34 -9.44	12.82 +9.83	14.43 -9.71	n.d.
$\text{Ag-E}_{50\text{l}60}$	14.25 -9.03	12.59 +8.99	14.42 -9.81	12.50 +9.43	14.42 -9.63	12.50 +9.19	14.42 -9.76	12.50 +9.74	14.42 - 10.00	n.d.
$\text{Ag-E}_{50\text{A}60}$	32.81 - 15.72	22.02 19.38	32.81 - 16.80	22.11 19.27	32.81 - 17.01	22.11 18.86	32.81 - 16.84	22.02 18.84	32.81 - 15.67	n.d.

25 **Tabla 3:** Picos de temperatura de transición ( $T_t$ ) y valores de entalpía ( $\Delta H$ ) obtenidos tras los picos de integración de cada ciclo de calentamiento-enfriamiento (c y e respectivamente) obtenido con los experimentos DSC con  $\text{E}_{50\text{l}60}$ ,  $\text{Ag-E}_{50\text{l}60}$  and  $\text{Ag-E}_{50\text{A}60}$  ELPs en PBS a pH 7.4.

30 Dado que la temperatura de estabilización de la transición del polímero  $\text{Ag-E}_{50\text{A}60}$  se aproxima a valores fisiológicos existe el riesgo de que, a 37 $^{\circ}\text{C}$  la transición del polímero con alanina no haya concluido en las condiciones que, a priori, son requeridas para su uso, dotándole de una mayor inestabilidad y, por ende, mayor variabilidad farmacocinética. Por este motivo, todas las caracterizaciones posteriores se concentraron en los polímeros basados en las secuencias de  $\text{E}_{50\text{l}60}$  que, garantizan una mayor reproducibilidad en los resultados.

35 Los resultados de microscopia electrónica transmitida por temperatura criogénica (Cryo-TEM) y difusión dinámica de la luz (DLS) confirmaron el ensamblaje espontáneo de las nanopartículas  $\text{E}_{50\text{l}60}$  y  $\text{Ag E}_{50\text{l}60}$ . Brevemente, los polímeros se disolvieron en PBS pH 7,4 a una concentración de 1 mg/ml y se filtraron en frío con filtros PVDF de 0,1  $\mu\text{m}$  y se analizaron con un ángulo de dispersión de 90 $^{\circ}$  en un instrumento Brookhaven Instrument Corp (Holtsville, NY) que consiste en un láser HE-Ne 35 mW ( $\lambda$ : 632,8 nm), un goniómetro BI-200SM y el software 3.59. La escala de intensidad se equilibró con la dispersión del Tolueno. Los ELPs se analizaron en un rango de 10  $^{\circ}\text{C}$  a 50  $^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se equilibraron durante 10 minutos antes de las mediciones con un baño termostático para el control de la temperatura. La duración de los experimentos fue de 3 minutos por cada temperatura. Los diámetros efectivos determinados por las funciones de correlación de DLS, se analizaron con el método Contin y la polidispersidad fue obtenida por análisis cumulante (Figura 6 y Tabla 4).

T (°C)	E <sub>50l60</sub>		Ag-E <sub>50l60</sub>	
	Tamaño (nm)	Índice de Polidispersidad (IPD)	Tamaño (nm)	Índice de Polidispersidad (IPD)
16	380	0,069	260	0,092
18	381,9	0,191	405,1	0,065
20	51,4	0,201	54	0,085
22	49,2	0,146	50,3	0,072
26	49,3	0,105	51,6	0,096
30	49,6	0,098	51,8	0,075
34	48,8	0,100	51,4	0,095
37	48,2	0,086	50,2	0,079
40	48,7	0,086	50,1	0,084
45	46,2	0,143	50,4	0,061
50	46,9	0,107	49,6	0,068

**Tabla 4:** Tamaño de las partículas e Índice de polidispersidad, a diferentes temperaturas, en el rango de 14-50 °C, mediante mediciones de difusión dinámica de la luz (DLS), tras análisis Contin y cumulante, respectivamente.

5

Los análisis Cryo-TEM se realizaron en muestras vitrificadas, tras ser equilibradas a 37 °C en un microscopio electrónico de transmisión de barrido JEOL Jem-2200FS con una Cámara digital y un filtro de energía en columna (Omega) (Figura 6). El tamaño de las partículas se analizó estadísticamente con el software Image J a partir de las imágenes Cryo TEM (Figura 7).

10

Para confirmar el tamaño medio de las partículas ELP se empleó la espectroscopía de correlación de fotones (PCS) con un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), así como para determinar el potencial Z y la movilidad electroforética de ELP disuelto en PBS, en dos temperaturas diferentes por encima y por debajo de la transición de temperatura (4°C y 37°C respectivamente) (Tabla 5).

15

Polímero (T °C)	Tamaño (nm)	Índice de polidispersidad (IPD)	Potencial Zeta (mV)	Movilidad electroforética (µmcm/Vs)
E <sub>50l60</sub> (4 °C)	n.d.	0.92	-10,2	-0.477
E <sub>50l60</sub> (37 °C)	55.71	0.07	-10,3	-0.908
Ag-E <sub>50l60</sub> (4 °C)	n.d.	0.55	-11	-0.465
Ag-E <sub>50l60</sub> (37 °C)	56.04	0.04	-12,1	-1.065

**Tabla 5:** Confirmación del tamaño medio de las partículas y el índice de polidispersidad (IPD), el potencial Z y la movilidad electroforética de las nanopartículas E<sub>50l60</sub> and Ag-E<sub>50l60</sub> in PBS a pH 7, medido por espectroscopía de correlación de fotones (PCS) en un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

20

El alto potencial zeta negativo es debido básicamente a la carga del grupo carboxilato del amino ácido glutámico del bloque hidrofílico y es importante para evitar que haya interacciones inespecíficas con la membrana plasmática de las células sanguíneas que también presentan externamente la misma carga. De esta forma, la internalización de las nanopartículas se produce sólo de forma específica por las células encargadas de presentar los antígenos.

25

### EJEMPLO 3

#### *Ensayos de citotoxicidad*

30

La investigación de la actividad profiláctica de un compuesto requiere conocer previamente su nivel de citotoxicidad para la posterior implementación de un régimen de dosificación adecuado, garantizando de esta forma que la citotoxicidad no interferirá en los resultados de estudios posteriores. Con este propósito se llevó a cabo la determinación de la citotoxicidad in vitro de los preparados vacunales sobre células de bazo de ratón sin tratamiento previo.

35

El día en el que se sacrificaron los ratones, se extrajo el bazo y fue procesado para obtener células, de manera que se homogenizó, filtro y purificó mediante gradiente de Ficoll. Finalmente se recogieron las

células y a continuación se sembraron en una placa. Se aislaron 1,6 millones de células mononucleares y se establecieron 7 grupos comparativos:

- 5 Grupo 1: células control sin tratar.  
 Grupo 2: células pulsadas con 2µg/ml de antígeno desnudo.  
 Grupo 3: células pulsadas con 1µg/ml de antígeno desnudo.  
 Grupo 4: células pulsadas con el antígeno vehiculizado en el polímero de elastina (Ag-E<sub>50l60</sub>) equivalente a 2µg/ml de antígeno desnudo.
- 10 Grupo 5: células pulsadas con el b-péptido vehiculizado en el polímero de elastina (Ag-E<sub>50l60</sub>) equivalente a 1µg/ml de antígeno desnudo.  
 Grupo 6: células únicamente tratadas con el polímero sin antígeno (E<sub>50l60</sub>) equivalente al grupo 4.  
 Grupo 7: células tratadas con el polímero sin antígeno (E<sub>50l60</sub>) equivalente al grupo 5.
- 15 A las 24 horas se recogieron los precipitados celulares y los sobrenadantes. Los precipitados de células se utilizaron para determinar la viabilidad celular determinando la presencia de fenómenos de apoptosis y necrosis gracias a la doble tinción de anexina-V y Ioduro de propidio, por citometría de flujo. Tras analizar estadísticamente los resultados de viabilidad celular obtenidos por citometría se observó que era similar en cada uno de los grupos. Además no había toxicidad apreciable en ninguno de los tratamientos (Figura 8).
- 20

#### EJEMPLO 4

##### *Ensayos inmunológicos.*

- 25 Para evaluar la utilidad de los polímeros de elastina como vehículos para el desarrollo de vacunas para prevenir la infección por *M. tuberculosis* se utilizaron 5 grupos de 8 ratones hembras de entre 6-10 semanas de la raza BALB/cByJ. Estos ratones fueron marcados el día en el que se inició el tratamiento y pesados a lo largo de todo el experimento. Los ratones crecieron normalmente sin signo alguno de enfermedad ni se observó pérdida de peso a lo largo del experimento (Fig. 9). La ganancia media de peso fue de 440 mg por semana y no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Al final del experimento se sacrificaron los ratones por dislocación cervical.
- 30

El esquema general de trabajo fue el siguiente: se inyectaron subcutáneamente 3 dosis de 200µl a intervalos de 2 semanas (días 0, 14 y 28) con los siguientes contenidos: 50 µg de Ag-E<sub>50l60</sub> (equivalente a 1,97 µg de antígeno desnudo) en PBS en el primer grupo (dosis 1); 100 µg de Ag-E<sub>50l60</sub> (equivalente a 3,94 µg de antígeno desnudo) en PBS en el segundo grupo (dosis 2); 95,5 µg de E<sub>50l60</sub> (equivalente a 100 µg de Ag-E<sub>50l60</sub>) en PBS en el tercer grupo; 3,94 µg de antígeno desnudo en PBS en el cuarto grupo y PBS al quinto grupo de ratones. Las dosis se habían calentado previamente a 37°C durante 30 min para permitir que se formaran las nanopartículas y no contenían ningún agente adyuvante.

35

- 40 A intervalos regulares se extrajeron 0,5 ml de sangre por la vena de la cola mediante Microvette® CB 300 K2E (SARSTEDT, Toronto, Canada). La sangre se mantenía a temperatura ambiente y se centrifugaba a 2500 rpm durante 10 min. Se recogía el plasma resultante y se congelaba a -80°C hasta su uso.

- 45 Se evaluó el nivel de citoquinas en el plasma de los días 1, 15 y 29 mediante el ensayo Biorad® 8 plex assay (Hercules, CA, USA), los días 1, 15 y 29. Este sistema permite la cuantificación de 8 diferentes citoquinas Th1/Th2 con los siguientes límites de detección (pg/ml): IL-1β (2,46), IL-2 (3,89), IL-4 (6,78), IL-5 (2,76), IL-10 (1,3), GM-CSF (2,13), IFN-γ (3,35), TNF-α (3,46). Los niveles resultantes de citoquinas fueron comparados por el test de Mann Whitney U para grupos no relacionados y por el test del signo de rangos Wilcoxon para muestras pareadas. Todos los valores de p son bilaterales y se consideró P < 0.05 como estadísticamente significativo y P < 0.01 como altamente significativo.
- 50

Los resultados del nivel de citoquinas se exponen en la Tabla 6.

Grupo	Citoquina	Día 1	Día 15	Día 29
1 Ag-E <sub>50l60</sub> Dosis 1	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	93.9 [92.6]	51.9 [20.3]	73.1 [39.9]
	<b>IL-5</b>	11.7 [10.9]	9.5 [4.3]	87.4 [125.5]
	<b>IL-10</b>	29.2 [17.9]	19.1 [9.3]	16.7 [11.7]
	<b>GM-CSF</b>	31.1 [12.7]	21.8 [14.9]	20.9 [14.6]
	<b>INF-<math>\gamma</math></b>	71.1 [18.8]	60.2 [19.3]	51.9 [20.3]
	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	127.8 [60.2]	88.8 [18.0]	89.5 [29.5]
2 Ag-E <sub>50l60</sub> Dosis 2	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	51.7 [17.4]	33.7 [30.8]	43.7 [42.3]
	<b>IL-5</b>	9.3 [14.4]	7.8 [8.8]	158.4 [290.0]
	<b>IL-10</b>	22.5 [13.9]	9.2 [9.5]	12.3 [10.5]
	<b>GM-CSF</b>	18.6 [13.4]	5.4 [6.1]	12.8 [13.4]
	<b>INF-<math>\gamma</math></b>	55.6 [21.2]	34.6 [30.1]	24.8 [21.2]
	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	81.7 [30.4]	62.0 [30.6]	52.6 [25.2]
3 E <sub>50l60</sub>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	19.7 [21.3]	20.4 [19.5]	28.9 [38.2]
	<b>IL-5</b>	4.3 [3.4]	3.9 [2.2]	11.7 [20.4]
	<b>IL-10</b>	5.4 [4.8]	3.1 [2.6]	5.9 [7.2]
	<b>GM-CSF</b>	2.9 [2.3]	2.3 [2.3]	6.1 [8.1]
	<b>INF-<math>\gamma</math></b>	26.4 [19.2]	20.3 [11.9]	29.8 [28.5]
	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	47.3 [19.4]	52.9 [25.6]	84.3 [101.6]
4 Ag	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	22.4 [13.8]	29.1 [20.9]	32.4 [16.8]
	<b>IL-5</b>	4.8 [2.6]	8.0 [3.2]	7.8 [3.7]
	<b>IL-10</b>	29.5 [14.9]	23.4 [16.3]	25.2 [13.7]
	<b>GM-CSF</b>	16.9 [26.0]	27.4 [20.6]	29.2 [24.2]
	<b>INF-<math>\gamma</math></b>	49.0 [14.6]	63.5 [25.8]	58.9 [36.2]
	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	101.0 [38.3]	110.8 [35.9]	111.7 [45.7]
5 PBS	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	29.5 [18.2]	15.0 [15.5]	17.6 [17.7]
	<b>IL-5</b>	6.3 [2.9]	6.0 [2.1]	4.5 [2.7]
	<b>IL-10</b>	34.6 [17.3]	20.6 [11.9]	16.2 [12.2]
	<b>GM-CSF</b>	24.1 [18.3]	17.7 [14.5]	10.2 [12.6]
	<b>INF-<math>\gamma</math></b>	54.0 [17.6]	48.9 [16.6]	41.0 [14.7]
	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	124.3 [121.1]	99.3 [23.4]	77.8 [31.7]

**Tabla 6:** Niveles de citoquinas en las diferentes muestras de plasma. Los datos se presentan como la media y entre corchetes el rango intercuartil.

- 5 En el primer día de extracción los ratones expuestos a ambas dosis del polímero Ag-E<sub>50l60</sub> mostraron niveles superiores de IL-1 $\beta$  que el resto de grupos aunque no mostraron diferencias significativas a lo largo del tiempo (Figura 10). Los datos de los mismos grupos (1 y 2) sí mostraron un aumento significativo con el tiempo en los niveles de IL-5 en plasma (aumento de 7.5 veces para la dosis 1 desde el día 1 al 29 y de 17 veces para la dosis 2 con  $P < 0.05$  en ambos casos). Por el contrario, el grupo 3 que recibió el vehículo libre E<sub>50l60</sub> no indujo la elevación en los niveles de ninguna de las citoquinas analizadas salvo un ligero incremento progresivo en los niveles de TNF- $\alpha$  que, en ningún caso superaron los alcanzados por el grupo control. No se encontraron niveles detectables del IL-2 y IL-4 en ningún caso.

- 15 Al final del periodo de inmunización (día 29) y, a diferencia de los niveles de IL-1 $\beta$ , que tendieron a disminuir ligeramente, IL-5 presentó valores significativamente superiores en los grupos vacunados con Ag-E<sub>50l60</sub> (Figura 10).

- 20 Además se evaluó la presencia de inmunoglobulinas específicas en los plasmas extraídos los días 7, 21 y 35 desde el inicio del experimento. Se utilizó la técnica de ELISA incubando el plasma sobre placas previamente recubiertas con los respectivos agentes inyectados (Ag-E<sub>50l60</sub>, E<sub>50l60</sub>), mientras que se usó una placa recubierta con Streptavidin para capturar eficazmente el antígeno desnudo marcado con biotina. También se realizaron los ensayos de ELISA sobre placas recubiertas con un filtrado proteico de cultivo de *M. tuberculosis* (CFP). El plasma se diluyó en PBS y se analizó por triplicado para cada animal, usando diluciones 1:25000 del anticuerpo policlonal de cabra anti-Ig M de ratón (A8786) y 1:10000 del anticuerpo policlonal de cabra anti-Ig G de ratón (A3673), ambos de Sigma (St. Quentin, France) para detectar la presencia de las correspondientes inmunoglobulinas específicas. Los dos anticuerpos secundarios estaban marcados con Peroxidasa para poder cuantificar su presencia mediante el reactivo

3,3',5,5' Tetramethylbenzidine y la lectura de la correspondiente absorbancia a 370 nm. Los datos se estudiaron por análisis de varianza usando el programa GraphPad Prism versión 4 en combinación con el método de Bonferroni. Se consideró  $P < 0.05$  como un resultado estadísticamente significativo y  $P < 0.001$  como altamente significativo.

5

En la Figura 11 se observan las absorbancias resultantes de la detección de los anticuerpos IgM e IgG específicos presentes en las diferentes muestras de plasma analizadas (muestra preinmune: semana 0; y muestras inmunizadas: semanas 1, 3 y 5).

10

Al analizar la generación de ambos tipos de anticuerpos (IgM e IgG) se observa que las muestras sanguíneas procedentes del grupo 5 tratados con PBS mostraron una baja reactividad y variabilidad cuando se incubaron sobre cualquiera de los 4 recubrimientos (Ag- $E_{50I60}$ ,  $E_{50I60}$ , Antígeno biotinilado y CFP). También destaca la baja respuesta general obtenida en el grupo 4 inmunizado con el antígeno desnudo y que en todos los test analizados resultó idéntica sino inferior al obtenido con el placebo. Esto demuestra la baja capacidad inmunogénica que induce *per se* el antígeno de *M. tuberculosis* utilizado en el ensayo tanto en la generación de IgMs como en IgGs cuando no se utiliza ningún tipo de adyuvante o vehículo. El resto de grupos dieron resultados variables dependiendo del grupo probado, del anticuerpo detectado y del tiempo analizado.

15

20

Las muestras procedentes de los grupos 1 y 2 inmunizados con Ag- $E_{50I60}$  mostraron los niveles más altos de anticuerpos IgM específicos para todos los recubrimientos excepto el realizado con  $E_{50I60}$  donde resultaron semejantes. Los niveles de IgMs anti-Ag- $E_{50I60}$  fueron muy superiores a los generados por el antígeno desnudo ( $P < 0.01$  para la dosis 1 y  $P < 0.05$  para la 2), aunque en el caso del revestimiento hecho con la mezcla de proteínas bacterianas (CFP) el aumento altamente significativo ( $P < 0.001$ ) se obtuvo sólo con la dosis más alta de Ag- $E_{50I60}$  (grupo 2), esto posiblemente se deba también al bajo nivel del antígeno presente en la mezcla proteica CFP. La respuesta de IgMs frente al Ag se mantiene significativamente alta y prácticamente constante con el tiempo mientras que aumenta cuando se analiza frente al CFP y decrece cuando se compara con los recubrimientos que contienen el ELP. Es decir, la generación de IgMs frente a la parte de ELP es inicialmente fuerte (semana 1) y posteriormente se va reduciendo paulatinamente en concomitancia con una maduración de la señal específica frente al Ag de *M. tuberculosis* (señal creciente en CFP y mantenimiento frente al Ag) lo cual indica que el vehículo ELP provoca una fuerte respuesta inicial en IgMs tanto hacia la parte ELP ( $E_{50I60}$ ) como frente al Ag que transporta, pero mientras que la primera decrece con el tiempo la segunda madura y es dosis-dependiente con el Ag limitante.

30

35

La memoria inmunológica que, de forma ideal, se genera tras la administración repetida de un antígeno lleva una respuesta inmune secundaria que promueve un aumento mucho más rápido, más intenso y duradero en la producción de IgG específica frente a dicho antígeno. Los niveles de IgGs específicos en los diferentes grupos a estudio de nuevo mostraron que los grupos que recibieron PBS y antígeno desnudo no daban señal apreciable ni diferenciadora, confirmándose de nuevo la inocuidad de la técnica profiláctica aplicada y la baja capacidad inmunogénica del péptido utilizado cuando se inyecta sin ningún vehículo ni adyuvante. Por el contrario, se observó una intensa señal en los dos grupos inmunizados con Ag- $E_{50I60}$  significativamente superior a la desarrollada por el grupo 3 (inmunizado con  $E_{50I60}$ ) tanto en IgGs anti- $E_{50I60}$  como anti-Ag- $E_{50I60}$ . A diferencia de la respuesta de IgMs, las IgGs se desarrollaron a partir de la semana 3 (tras sendas inmunizaciones en las semanas 0 y 2) con una tendencia creciente entre las semanas 3 y 5 en el caso exclusivo de los grupos 1 y 2, y estabilizándose o reduciéndose en el caso del grupo 3 ( $E_{50I60}$ ). Esto corrobora la curva típica de una respuesta humoral exitosa demostrando que tan sólo la quimera Ag- $E_{50I60}$  es capaz de madurar significativamente la afinidad de sus anticuerpos ( $P < 0.001$  entre los grupos 1 y 2 y el grupo 3). La baja respuesta inducida por el  $E_{50I60}$  indica que es necesaria la presencia de un antígeno procedente de un patógeno para producir la buscada maduración en las IgGs. Esta sinergia también queda patente en el hecho de que una dosis inferior de inmunógeno (50  $\mu$ g de Ag- $E_{50I60}$  en el grupo 1) produzca una reacción que duplica (semana 3) y triplica (semana 5) la señal provocada por el vehículo ELP desnudo (95,5  $\mu$ g de  $E_{50I60}$  en grupo 3) ( $P < 0.001$  en semanas 3 y 5 sobre Ag- $E_{50I60}$ ). La falta de respuesta cuando el plasma de los grupos 1 y 2 se analizaron buscando IgGs específicas anti-Ag puede ser entendida porque el Antígeno biotinilado que recubre las placas de Streptavidin no se presenta adecuadamente en la forma natural reconocida por las IgGs, o también porque el Antígeno no es lo suficientemente grande para madurar una respuesta exclusiva que los IgMs si demuestran. Por ello, se puede inferir que los IgGs generados reconocen mayoritariamente epítomos con presencia de aminoácidos del Ag y del bloque ELP demostrando la importancia de éste como vehículo de presentación de antígenos de baja inmunogenicidad.

40

45

50

55

60

La mayoría de las respuestas inmunes de las células  $T_H$  muestran una combinación de rasgos  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$ ; sin embargo, después de una inmunización prolongada, la respuesta puede resultar dominante como  $T_{H1}$  o  $T_{H2}$ . El perfil de citoquinas (tabla 6) evidencia la existencia de un modelo de secreción bifásico caracterizado por la elevación temprana de IL-1 $\beta$  (una citoquina característicamente  $T_{H1}$ ) junto con un

incremento dosis-dependiente de los niveles plasmáticos de IL-5 (típicamente  $T_H2$ ) en las fases más tardías. Por lo tanto, el patrón de inmunización definido por la secreción de citoquinas y las funciones inmunes determinan claramente una respuesta tipo Th-2 según revela la producción de IL-5 en las etapas finales de la inmunización y en la activación de la expresión de IgMs e IgGs.

5

El aumento de los niveles séricos de la citoquina IL-1 $\beta$  es un indicador diagnóstico de la fase inflamatoria, que hace sospechar una relación en la interacción precoz entre las células T y las APC. Dado que la mayor fuente celular de IL-1 $\beta$  son los macrófagos pero también los neutrófilos, células epiteliales y endoteliales, su claro aumento podría ser interpretado como un síntoma de la activación de estas líneas celulares en presencia de la quimera Ag-E<sub>50I60</sub>, que no sucede con el resto de preparaciones.

10

De esta manera, IL-1 $\beta$  estaría promoviendo el desarrollo de una respuesta inicial pro-celular necesaria para el desarrollo ulterior de la respuesta humoral de tipo  $T_H2$  (Spellberg B et al, Clin Infect Dis. 32(1):76-102 (2001)). De hecho, la IL-1 $\beta$  se ha utilizado para proporcionar una actividad adyuvante para la inducción de respuestas de anticuerpos en suero en los ratones vacunados (Gwinn et al, Vaccine. 28(42):6901-14 (2010); Staats HF et al, J Immunol 162(10):6141-7 (1999); Bradney et al, J Virol 76(2):517-24 (2002). A su vez, IL-5 se ha asociado a la inducción de los perfiles de memoria Th2 en respuesta a la vacunación en los niños (White OJ et al, Vaccine. 28(14):2648-52 (2010)).

15

20

La respuesta inmune humoral está especializada de forma que la exposición a diferentes antígenos inducen cambios en los linfocitos B para producir los diferentes isotipos de inmunoglobulinas más adecuadas para combatir la amenaza. La IgM es la primera inmunoglobulina sintetizadas por las células plasmáticas en respuesta al inmunógeno. El principal estímulo para el cambio de isotipo durante la activación de las células B es la síntesis de citoquinas por las células T colaboradoras. IL-5, es una citocinas Th2 clave para en el desarrollo de anticuerpos específicos contra dichos antígenos inmunogénicos de forma que, en ausencia de señales inductoras, las células B sintetizan IgM. Mientras que cuando las células B se activan por las señales de las células T colaboradoras (por ejemplo con la IL-5) se producen la maduración isotípica. La inducción de IL-5 y la posterior secreción de IgG específica fue un fenómeno cooperativo, ya que sólo se observó en presencia de la construcción del antígeno con el polímero. Por el contrario, ELP, sin el antígeno no indujo la producción de anticuerpos IgG específicos ni tampoco variaciones significativas en los perfiles de citoquinas, lo que indica una ausencia de impacto biológico del polímero desprovisto de secuencia antigénica. Estos resultados refuerzan la propuesta para el empleo de los ELPs como vehículos antigénicos en el desarrollo de vacunas más eficaces.

25

30

35

La naturaleza pentamérica de la IgM contribuye probablemente a amplificar la señal detectada contra los diferentes recubrimientos antigénicos y permite apreciar mejor las diferencias entre los grupos de ratones ensayados. La serología de IgM de los ratones inmunizados con el Ag-E<sub>50I60</sub> mostró una tendencia opuesta al ser comparada entre los diferentes revestimientos analizados. Así, los niveles séricos tendían a aumentar con el tiempo cuando se analizaron sobre el Ag desnudo y frente a la mezcla de proteínas de la micobacteria (CFP), mientras que tendían a disminuir frente a los pocillos revestidos con los polipéptidos que contenían el polímero tipo elastina (Ag-E<sub>50I60</sub> y E<sub>50I60</sub>). Esta tendencia contrasta con los niveles de IgG detectados en el mismo grupo y con los mismos recubrimientos en los que se detecta un aumento progresivo de los niveles de IgG frente a Ag-E<sub>50I60</sub> y E<sub>50I60</sub> mientras que no se detecta señal contra el antígeno desnudo.

40

45

La hipótesis de la selección clonal predice sólo que una pequeña proporción de cada linfocito individual es específico para cada antígeno particular. La naturaleza monomérica de la inmunoglobulina IgG unido a la menor sensibilidad del ELISA con el Ag biotinilado podría ser las responsables de la ausencia de anticuerpos IgG contra el Ag desnudo en los grupos 1 y 2 (inmunizados con Ag-E<sub>50I60</sub>). Sin embargo, otra posible explicación para tal ausencia podría basarse en que la configuración espacial de los diferentes epítomos de la molécula proteica puede influenciar la unión de los anticuerpos de diferentes formas. Por ello, el sistema inmune reconoce el antígeno presentado por el soporte de ELP como un determinante conformacional nuevo con mayor intensidad que el antígeno aislado, como sugiere también el hecho de que no hay maduración de la afinidad de los IgG en los ratones inmunizados con el E<sub>50I60</sub> sin antígeno bacteriano.

50

55

**REIVINDICACIONES**

1. Un conjugado que comprende
  - (i) un polipéptido similar a elastina que comprende
    - (a) al menos una región hidrofílica de secuencia  $[(X_1PGX_1G)_2 X_1PGX_2G(X_1PGX_1G)_2]_n$  y
    - (b) al menos una región hidrofóbica de secuencia  $(X_3X_4IX_5G)_m$  en donde  $X_1$  y  $X_3$  son aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica,  $X_2$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofílica,  $X_4$  y  $X_5$  son G o P, , n es entre 5 y 10 y m es entre 10 y 100.
  - y
  - (ii) al menos una molécula antigénica seleccionada del grupo formado por un péptido, un ácido nucleico o un polisacárido
2. Conjugado según la reivindicación 1 en donde n es 10.
3. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en donde  $X_1$  es V.
4. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde  $X_2$  es E.
5. Conjugado según la reivindicación 4 en donde el componente (a) tiene la secuencia  $[(VPGVG)_2 VPGEG(VPGVG)]_{10}$ .
6. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde m es 60.
7. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde  $X_3$  es V.
8. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde  $X_4$  es G.
9. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde  $X_5$  es P.
10. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde el componente (b) tiene la secuencia  $(VGIPG)_{60}$ .
11. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde el polipéptido similar a elastina comprende adicionalmente una región polipeptídica que permite la traslocación de dicho polipéptido a través de membranas biológicas.
12. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde el polipéptido similar a elastina comprende adicionalmente al menos una secuencia de adhesión celular.
13. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en donde el polipéptido similar a elastina comprende adicionalmente al menos una secuencia con capacidad de unir ácidos nucleicos.
14. Conjugado según la reivindicación 13 en donde la secuencia con capacidad de unir ácidos nucleicos es una región rica en aminoácidos básicos.
15. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en donde el polipéptido similar a elastina comprende adicionalmente un péptido de inicio de la traducción.
16. Conjugado según la reivindicación 15 en donde el péptido de inicio de la traducción es la secuencia descrita en SEQ ID NO:3.
17. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en donde el componente (ii) es un péptido antigénico.
18. Conjugado según la reivindicación 18 en donde el péptido antigénico es un péptido antigénico de *M. tuberculosis*.
19. Conjugado según la reivindicación 18 en donde el péptido antigénico de *M. tuberculosis* es un péptido de la proteína Hsp 16.3 (SEQ ID NO: 4).
20. Conjugado según la reivindicación 19 en donde el péptido antigénico de la proteína Hsp 16.3 de *M. tuberculosis* es el péptido con secuencia SEQ ID NO: 5.

21. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20 en donde los componentes (i) y (ii) forman una única cadena polipeptídica.
- 5 22. Conjugado según la reivindicación 21 en donde el componente (ii) se encuentra en posición C-terminal con respecto al componente (i).
23. Conjugado según la reivindicación 21 en donde el componente (ii) se encuentra en posición N-terminal con respecto al componente (i).
- 10 24. Conjugado según la reivindicación 23 que comprende adicionalmente una región que promueve la traslocación a través de membranas biológicas en posición N-terminal con respecto al componente (i).
- 15 25. Nanopartícula formada por la asociación de dos o más conjugados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.
26. Nanopartícula según la reivindicación 25 en donde dicha nanopartícula tiene un diámetro inferior a 200 nm.
- 20 27. Polinucleótido que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24.
28. Vector que contiene un polinucleótido según la reivindicación 27.
- 25 29. Célula que contiene el conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, la nanopartícula según la reivindicación 25 o 26, el polinucleótido según la reivindicación 26 o el vector según la reivindicación 27.
- 30 30. Uso de un conjugado según las reivindicaciones 1 a 24, de una nanopartícula según las reivindicaciones 25 o 26, de un polinucleótido según la reivindicación 27, de un vector según la reivindicación 28 o de célula según la reivindicación 29 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad para estimular y/o inducir la respuesta inmune de un individuo frente a la molécula antigénica.
- 35 31. Uso según la reivindicación 30 en donde el componente (ii) es un antígeno de *M.tuberculosis* y en donde la respuesta inmune de un individuo frente a la molécula antigénica es una respuesta inmune frente a tuberculosis.
- 40 32. Uso según la reivindicación 30 o 31 en donde el polipéptido, la nanopartícula, el polinucleótido, el vector o la célula es administrada por vía mucosa o tópica.
33. Polinucleótido adecuado para la expresión de una proteína de fusión formada por un polipéptido similar a elastina y un polipéptido antigénico de interés que comprende una secuencia que codifica dicho polipéptido similar a elastina en donde dicho polipéptido similar a elastina comprende:
- 45 (a) una región hidrofílica de secuencia  $[(X_1PGX_1G)_2 X_1PGX_2G(X_1PGX_1G)_2]_n$  en donde  $X_1$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofóbica,  $X_2$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofílica, y  $n$  es un número entero entre 5 y 10 y
- (b) una región hidrofóbica de secuencia  $(X_3X_4IX_5G)_m$  en donde  $X_3$  es un aminoácido de cadena lateral hidrofóbica,  $X_4$  y  $X_5$  son G o P y  $m$  es entre 10 y 100.
- 50 34. Polinucleótido según la reivindicación 33 en donde  $n$  es 10, en donde  $X_1$  es V y/o en donde  $X_2$  es E.
35. Polinucleótido según la reivindicación 34 en donde la región hidrofílica codificada por la primera secuencia tiene la secuencia  $[(VPGVG)_2VPGEG(VPGVG)]_{10}$ .
- 55 36. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35 en donde  $m$  es 60, en donde  $X_3$  es V, en donde  $X_4$  es G y/o en donde  $X_5$  es P.
- 60 37. Polinucleótido según la reivindicación 33 en donde la región hidrofóbica codificada por la segunda secuencia tiene la secuencia  $(VGIPG)_{60}$ .
38. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 37 que comprende adicionalmente una secuencia iniciadora de la traducción.

- 39. Polinucleótido según la reivindicación 38 en donde la secuencia iniciadora de la traducción codifica un péptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3.
- 5 40. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 39 que comprende adicionalmente uno varios sitios de clonaje que permita insertar un polinucleótido de interés en dicho polinucleótido de forma que la expresión de dicho polinucleótido de lugar a una proteína de fusión formada por el polipéptido similar a elastina y el polipéptido codificado por el polinucleótido de interés.
- 10 41. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 40.

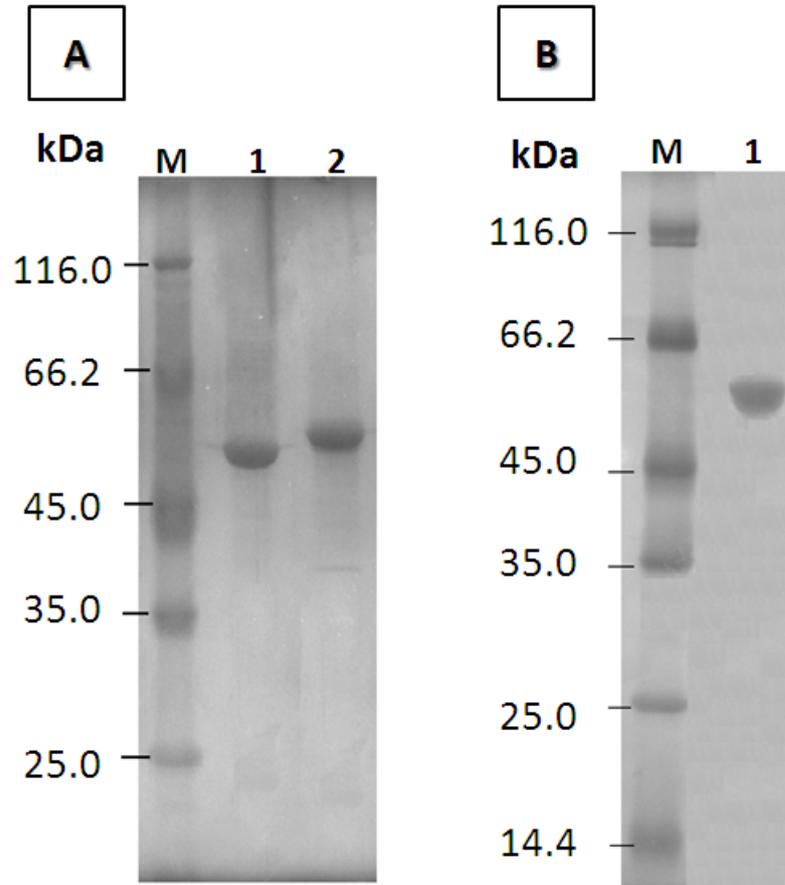


Fig. 1

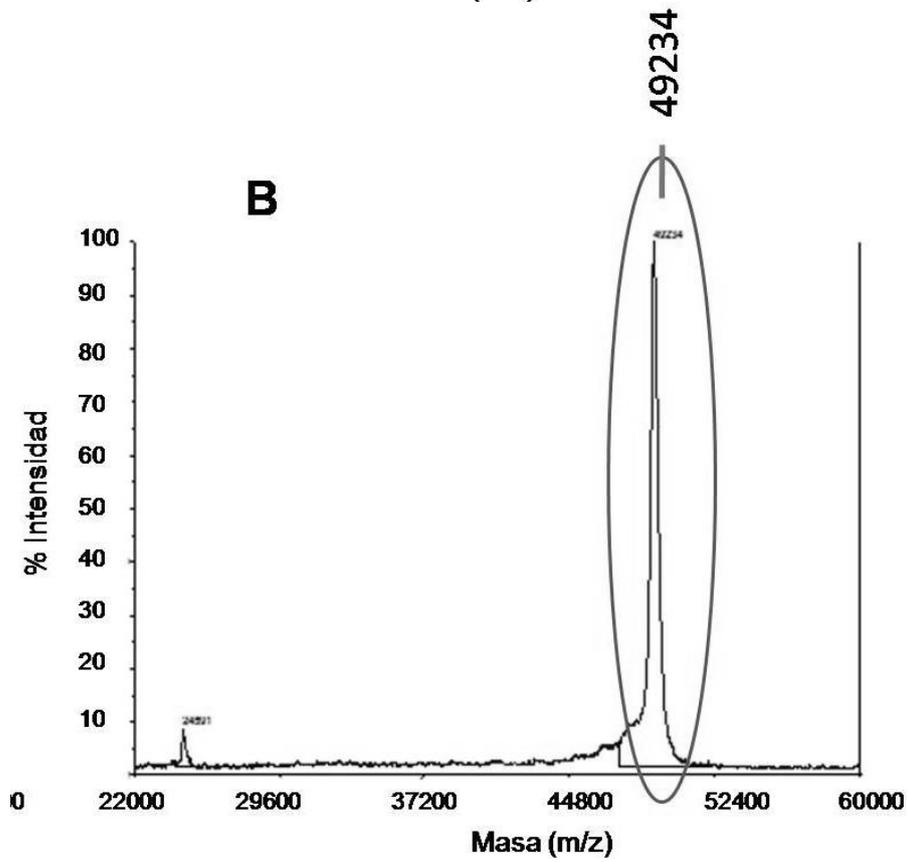
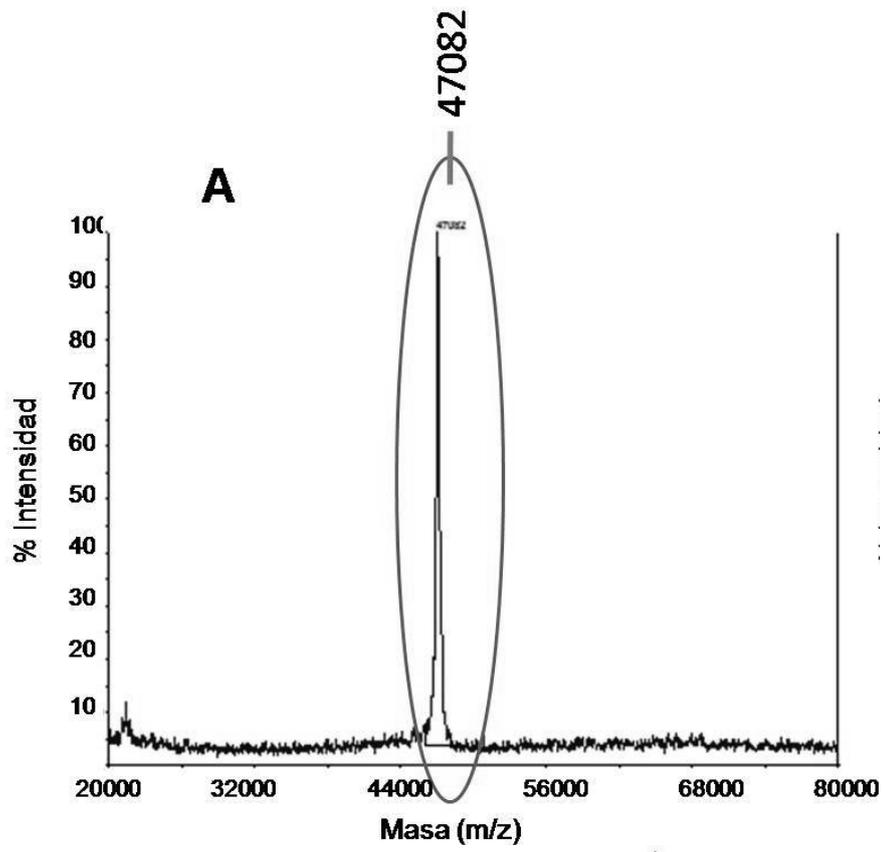


Fig. 2

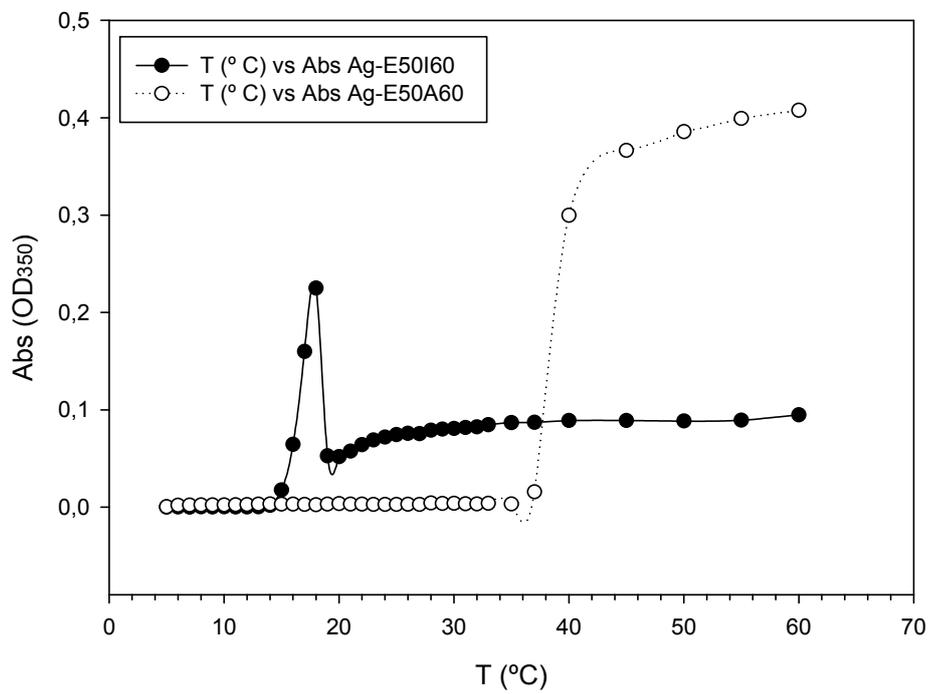
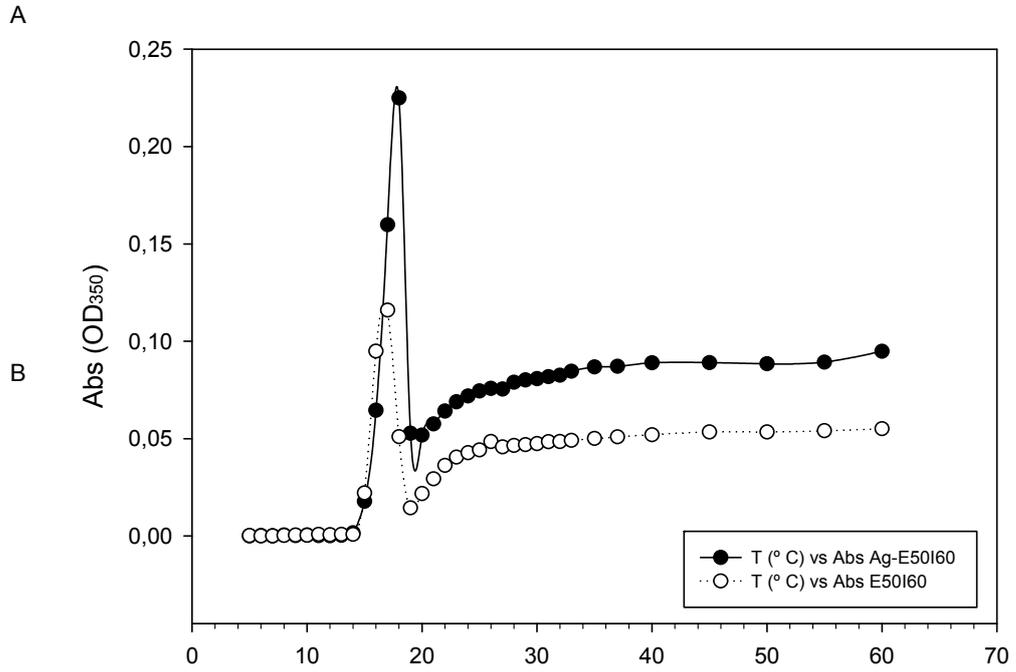


Fig. 3

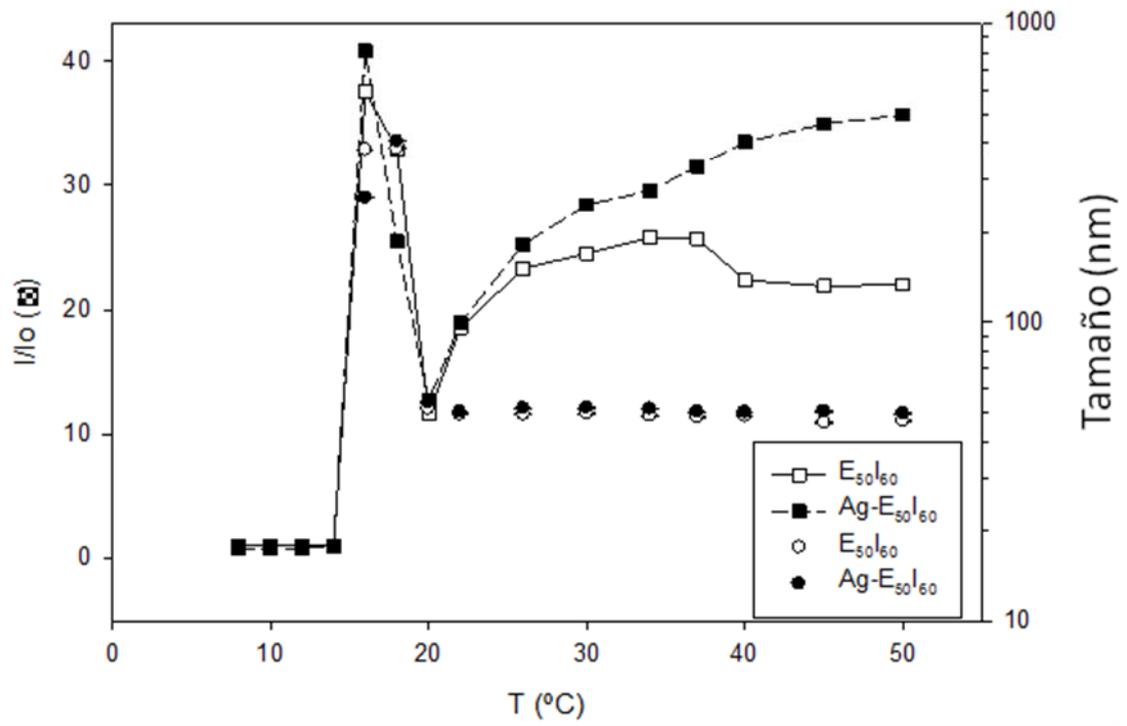


Fig. 4

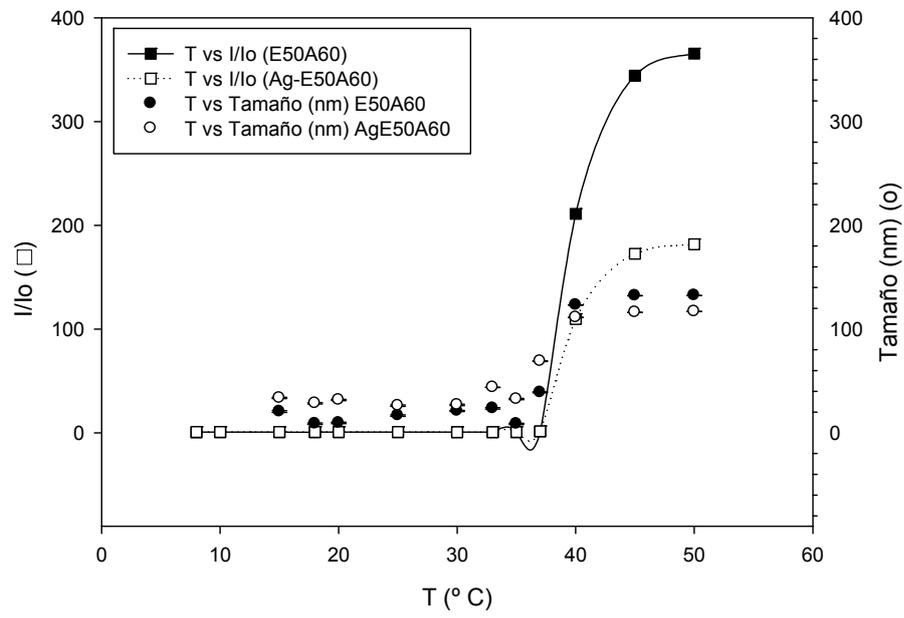


Fig. 5

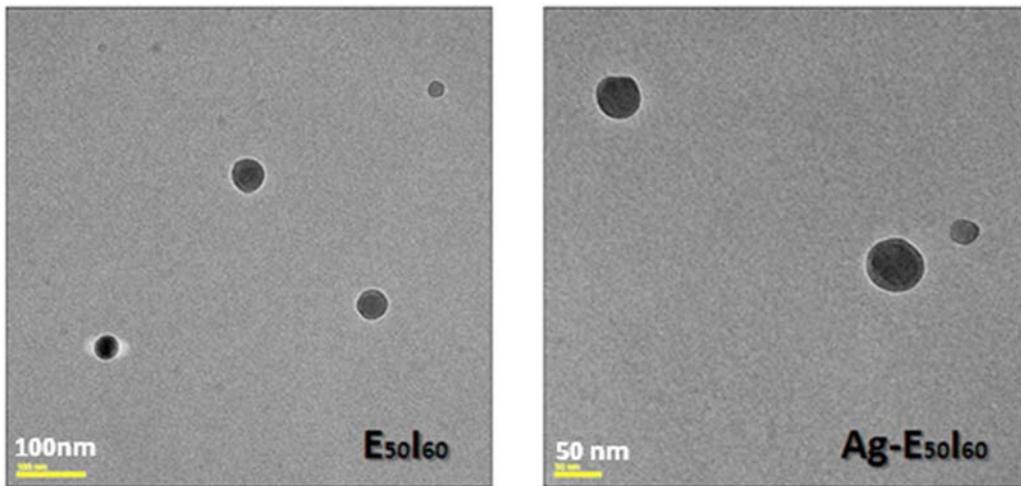


Fig. 6

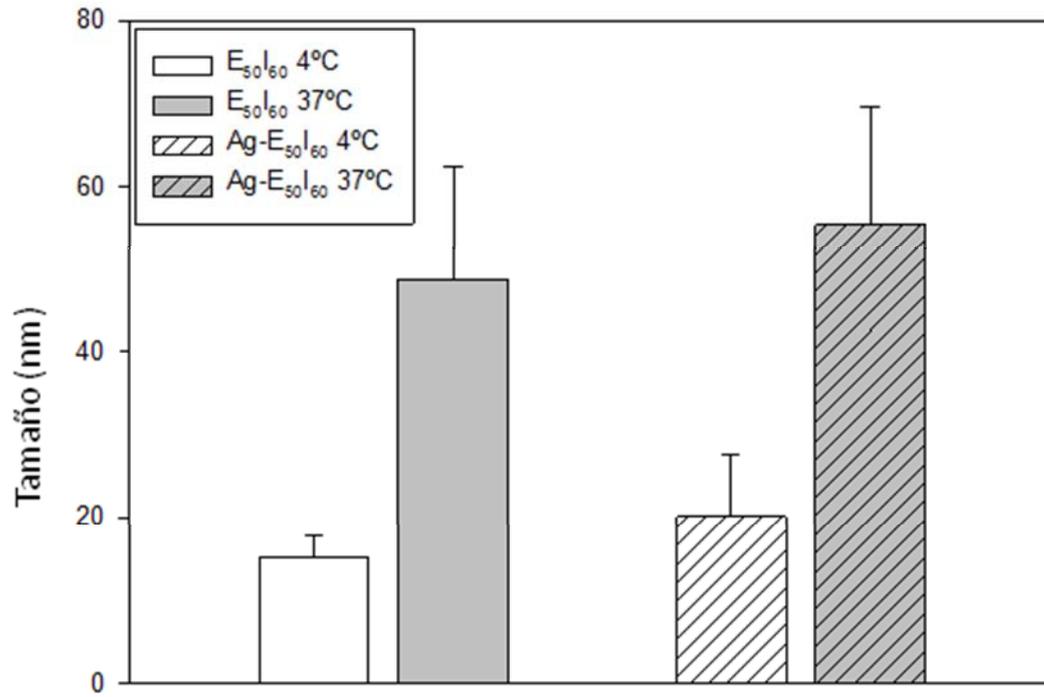


Fig. 7

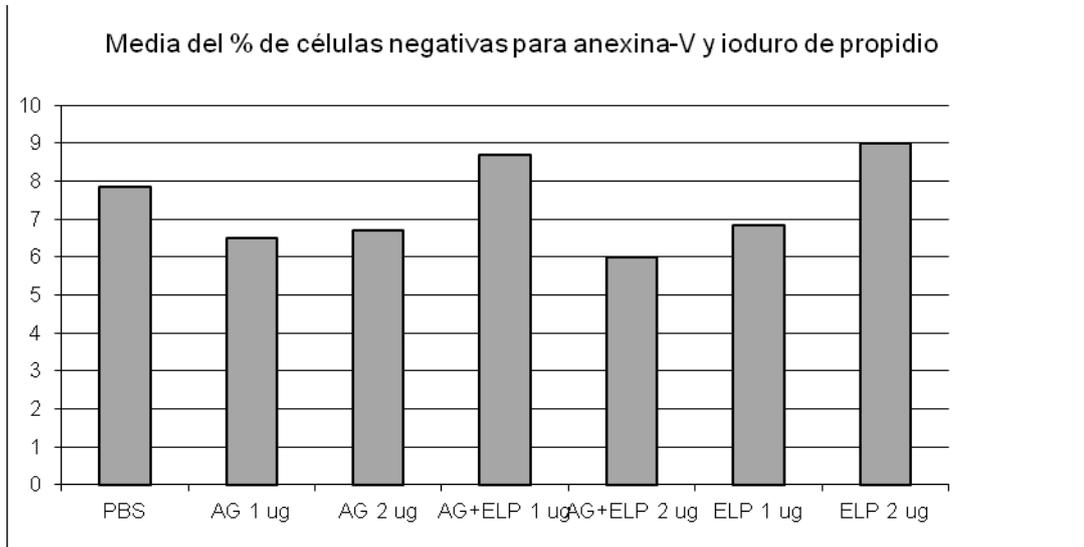


Fig. 8

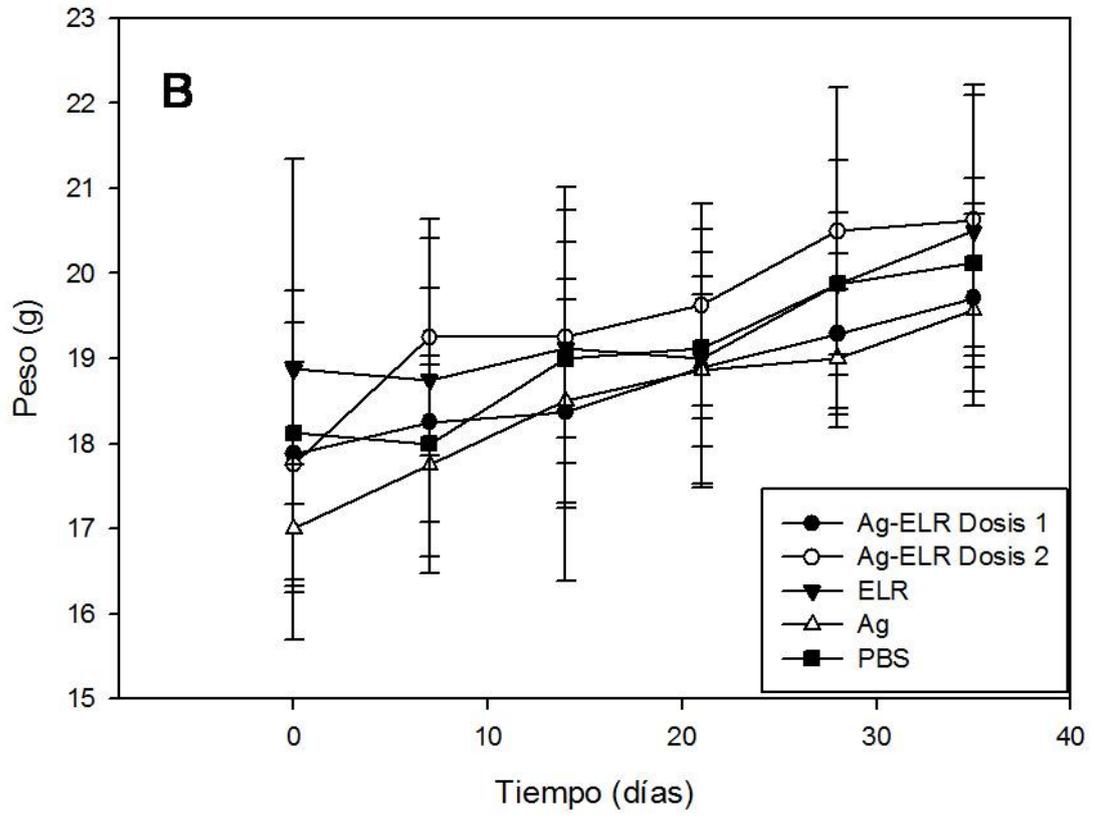


Fig. 9

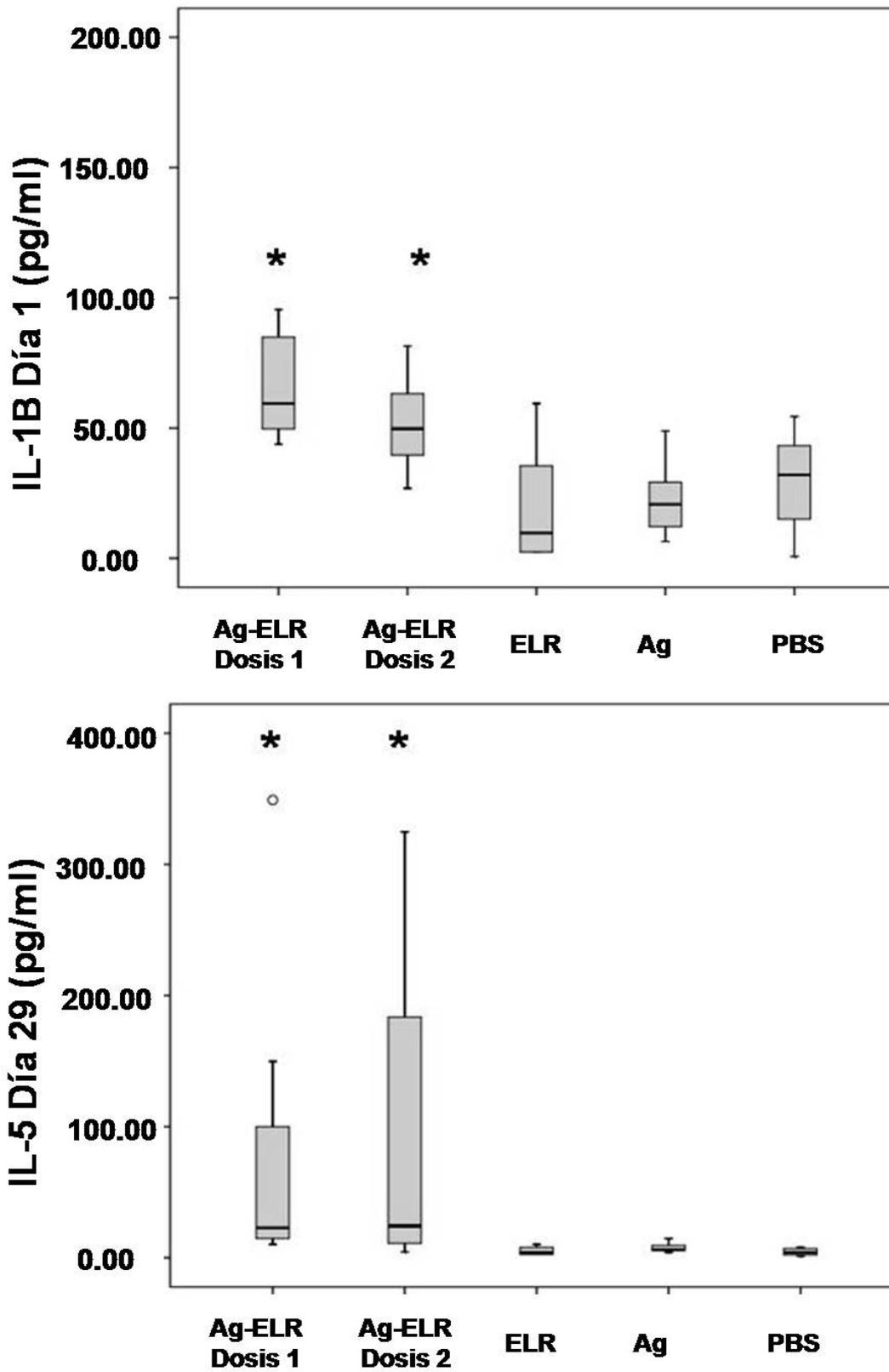


Fig. 10

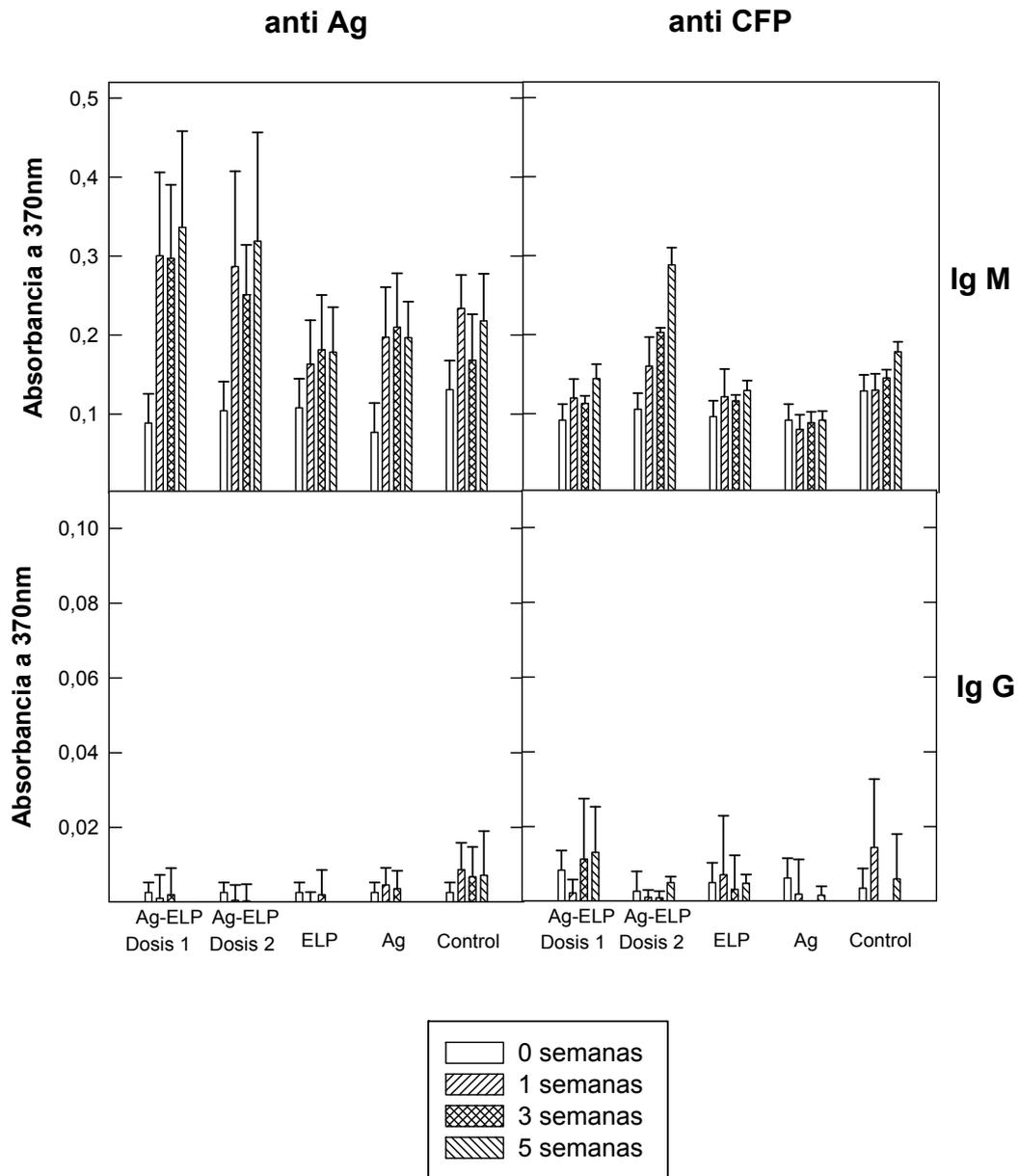


Fig. 11

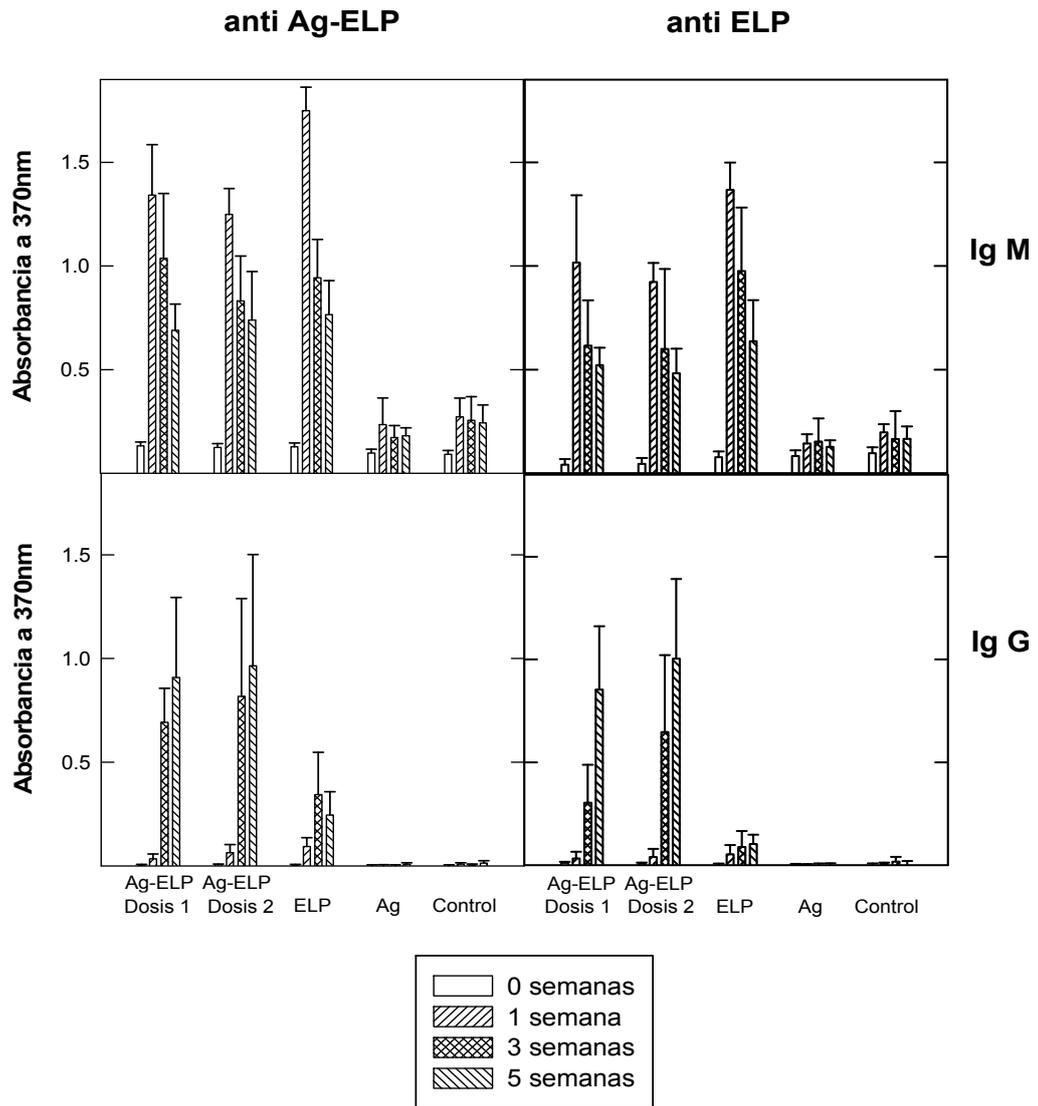


Fig. 11 (cont.)