

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 357**

51 Int. Cl.:

A61K 39/015 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2013 PCT/US2013/033071**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2013 E 13713332 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2830652**

54 Título: **Composiciones antigénicas y métodos**

30 Prioridad:

30.03.2012 US 201261618021 P
15.05.2012 US 201261647105 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2017

73 Titular/es:

ARTIFICIAL CELL TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
5 Science Park, Suite 13
New Haven, CT 06511, US

72 Inventor/es:

POWELL, THOMAS J. y
BOYD, JAMES GORHAM

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 612 357 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones antigénicas y métodos

5 Campo de la divulgación

La presente divulgación se relaciona con composiciones antigénicas y usos de las mismas, específicamente composiciones en películas de capas múltiples que contienen epítomos antigénicos.

Antecedentes

10 Como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 7,615,530, las películas de capas múltiples electrostáticas capa a capa proveen una plataforma para composiciones inmunogénicas para uso como vacunas, por ejemplo. En una película de capas múltiples capa por capa electrostática, la deposición de polielectrolitos, cargados opuestamente sobre una superficie, tal como una partícula, provee una estructura de capa múltiple estable. Los epítomos de polipéptidos pueden ser incorporados en un polielectrolito cargado, tal como un polipéptido, permitiendo la incorporación de un epítomo de polipéptido en la película. Las películas que contienen los epítomos
15 pueden ser utilizadas para disparar una respuesta inmune y proveer protección contra una diana, tal como un patógeno.

A la vez que las composiciones divulgadas en la Patente de los Estados Unidos No. 7,615,530 son adecuadas para su propósito previsto, sería ventajoso incrementar la inmunogenicidad de las composiciones.

20 De Haes, W., et al., 2010, Molecular Therapy, 18(7), 1408-1416, provee microcápsulas de polielectrolitos que contienen el antígeno p24 del VIH-1 y el ligando polil:C de TLR3 y el uso de los mismos para estimular respuestas inmunes específicas a VIH-1.

Su, X., et al., 2009, ACS Nano, 3(11), 3719-3729 provee películas de capa múltiples ensambladas capa por capa formadas a partir de un poli (β -aminoéster) catiónico, ovalbúmina y CpG inmunoestimulador (fosfato de citosina rico en diéster guanina).

25 Se describen aquí composiciones en películas de capas múltiples modificadas adicionalmente para la producción de respuestas inmunes a antígenos peptídicos.

Resumen

En un aspecto, una composición comprende,

30 una primera película de capas múltiples que comprende una pluralidad de capas de polielectrolitos cargados de manera opuesta, en donde una de las capas de polielectrolitos en la película de capas múltiples comprende un primer polielectrolito antigénico, en donde el primer polielectrolito antigénico comprende un epítomo de polipéptido viral, bacteriano, fúngico o de parásito unido covalentemente a un polielectrolito,

en donde la película de capa múltiple comprende un ligando de receptor similar a Toll (ligando TLR) enlazado covalentemente al primer polielectrolito antigénico

35 en donde el ligando TLR es una lipoproteína o un lipopéptido, y

en donde los polielectrolitos en la película de capas múltiples comprenden un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular de más de 1000 y al menos 5 cargas por molécula.

40 En un aspecto adicional, la invención provee la composición del primer aspecto para uso en un método para disparar una respuesta inmune en un organismo vertebrado que comprende administrar dicha composición al organismo vertebrado.

Breve descripción de los dibujos

45 Las figuras 1 a 3 muestran respuestas a anticuerpos disparadas por micropartículas Pam3Cys.T1B de malaria en ratones C57BL/6. En la figura 1, en el día 28, se probaron sueros en ELISA contra el péptido T1B. Los resultados muestran un título de anticuerpo medio \pm SD anti-T1B IgG de 10 ratones por grupo. \S P <0.05 comparado con el grupo MP-1167. En la figura 2, el ELISA de T1B fue repetido con una dilución 1:250 de sueros individuales, y cada suero fue probado con anticuerpos para la detección específica de isotipos.

5 Los resultados muestran la media \pm SD de 10 ratones por grupo. En la figura 3, en el día 56, los ratones fueron expuestos a mosquitos infectados con PfPb, y la carga de parásitos en el hígado 40 horas después fue medida por qPCR. Los resultados muestran ratones individuales (círculos) y promedios de grupo (barras). Los insertos muestran el número de ratones protegidos (\geq 90% de reducción en la carga parasitaria en comparación con el promedio del grupo con PBS mostrado por la línea horizontal punteada), la reducción porcentual en promedio por grupo en comparación con el promedio del grupo con PBS. *P <0.05 en comparación con el grupo PBS. #P <0.05 en comparación con el grupo ACT-1167.

La figura 4 es una gráfica de la respuesta a IL8 versus % de partículas en suspensión que muestran que las micropartículas que contienen MPLA activan las células TLR-4 en una forma dependiente de la dosis.

10 La figura 5 es una gráfica de la absorbancia de imiquimod (IM) de soluciones y partículas disueltas.

La figura 6 muestra la respuesta a anticuerpo disparada por inmunización con micropartículas de T1BT*. Se inmunizaron ratones C57BL/6J con los tratamientos indicados en el día 0, 21 y 42. Los sueros recolectados en el día 49 fueron probados en ELISA contra el péptido T1B. Los resultados muestran la media \pm SD de 10 ratones por grupo.

15 La figura 7 muestra respuesta a anticuerpo disparada por inmunización con micropartículas de T1BT*. Los sueros fueron probados a 1:250 y las placas fueron probadas con anticuerpos para la detección específica de isotipos. Los resultados muestran la media \pm SD de 10 ratones por grupo.

20 La figura 8 muestra las respuestas de células T a micropartículas de T1BT*. Se inmunizaron ratones C57BL/6 con los tratamientos indicados en los días 0, 21 y 42. Se recolectaron células de bazo en día 49 y se reestimularon con péptido T1B en placas de IFN γ e IL-5 ELISPOT. Los datos representan la media \pm SD de 3.

Las características más arriba descritas y otras serán evidentes y entendidas por las personas experimentadas en el arte a partir de la siguiente descripción detallada, dibujos y reivindicaciones anexas.

Descripción detallada

25 Se divulgan aquí películas de capa múltiples que comprenden un epítipo de polipéptido viral, bacteriano, fúngico o de parásito, también denominados antígenos, en donde las películas en capas múltiples son capaces de disparar una respuesta inmune en un huésped por administración al huésped. A la vez que las películas contienen epítopos de patógenos que han demostrado disparar una respuesta inmune, es deseable desarrollar estrategias para mejorar la respuesta inmune. Los inventores han encontrado aquí que la incorporación de ligandos de receptores tipo Toll (TLR) en las películas puede mejorar la respuesta inmune tanto cuantitativa como cualitativamente. Mientras que los ligandos TLR han sido utilizados previamente como adyuvantes para vacunas, la administración en la forma de una película de capas múltiples con un antígeno de un patógeno provee un medio efectivo y conveniente para administrar tanto el adyuvante como el epítipo.

35 Específicamente, se divulgan aquí composiciones que contienen películas en capa múltiple que comprenden capas alternantes de polielectrolitos cargados de manera opuesta. Opcionalmente, uno o más de los polielectrolitos es un polipéptido. Las películas con capas múltiples comprenden un epítipo de polipéptido viral, bacteriano, fúngico o de parásito. El epítipo de polipéptido está enlazado de manera covalente a un polielectrolito. En una realización, el polielectrolito es un polipéptido que comprende el epítipo del polipéptido y tiene carga suficiente para la deposición en una película de capas múltiples. Las composiciones también incluyen un ligando de TLR de lipopéptido o lipoproteína depositado como parte de las películas de capa múltiple, específicamente el epítipo de polipéptido y el ligando receptor de TLR están unidos de manera covalente al mismo polielectrolito, y así están en la misma película de capas múltiples. Disposiciones adicionales incluyen el ligando TLR depositado sobre un sustrato tal como un núcleo antes de la deposición de la película de capas múltiples; el epítipo de polipéptido y el ligando del receptor de TLR unidos a diferentes polielectrolitos, y/o presentes en una película de capas múltiples diferente; el epítipo de polipéptido y el ligando del receptor de TLR enlazados covalentemente a diferentes polielectrolitos, pero depositados en capa con la misma película de capas múltiples; el epítipo de polipéptido y el ligando del receptor de TLR unidos covalentemente a diferentes polielectrolitos, pero dispuestos en capas en diferentes películas de capas múltiples las cuales son mezcladas subsecuentemente antes de la administración; el ligando del receptor de TLR depositado sobre un núcleo antes de la deposición de un polielectrolito que comprende el epítipo de polipéptido; el ligando del receptor de TLR codepositado con uno de los polielectrolitos de la película de capas múltiples; y el ligando del receptor de TLR depositado en una etapa o etapas separadas de la deposición de los polielectrolitos de la película de capas múltiples.

En cada una de las realizaciones siguientes, pueden emplearse dos o más ligandos de TLR. Los dos o más ligandos de TLR pueden estar en la misma película de capas múltiples o en diferentes películas de capas múltiples que se mezclan subsecuentemente para formar una composición.

En una realización, el primer polielectrolito comprende dos o más epítomos del mismo virus, bacteria, hongo o parásito. Los epítomos pueden ser contiguos sobre la cadena polipeptídica, o espaciados mediante una región espaciadora. De manera similar, los epítomos pueden estar en el terminal N del polipéptido, el terminal C del polipéptido, o en cualquier sitio entre ellos.

- 5 Hay que anotar que cuando el primer polielectrolito antigénico es un polipéptido, el polipéptido contiene carga suficiente para deposición sobre una película de capas múltiples de polipéptidos. En una realización, la carga neta por residuo del polipéptido es mayor que o igual a 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 o 0.5 a pH 7.0, como se explica aquí.

10 En una realización, la película de capas múltiples está depositada sobre una partícula de núcleo, tal como una partícula de CaCO₃, una partícula de látex, o una partícula de hierro. Son particularmente útiles tamaños de partículas del orden de 5 nanómetros (nm) a 500 micrómetros (nm) de diámetro, como lo son también partículas más grandes, que tengan diámetros de 1 μm o más, tales como partículas con diámetro de 3 μm. También pueden usarse partículas hechas de otros materiales como núcleo con la condición de que sean biocompatibles, tengan distribución de tamaño controlable, y tengan suficiente carga de superficie (bien sea positiva o negativa) para enlazar los péptidos de polielectrolito. Ejemplos incluyen nanopartículas y micropartículas hechas de materiales tales como ácido poliláctico (PLA), copolímero de ácido poliláctico ácido glicólico (PLGA), polietileno glicol (PEG), quitosano, ácido hialurónico, gelatina, o combinaciones de los mismos. Las partículas de núcleo también pueden hacerse de materiales que se consideren inapropiados para uso humano con la condición de que puedan ser disueltas y separados de la película de capas múltiples después de la fabricación de la película. Ejemplos de las sustancias de núcleo patrón incluyen polímeros orgánicos tales como látex o materiales inorgánicos tales como sílica.

Las películas de capa múltiple de uso en la invención comprenden un epítomo de polipéptido, tal como, por ejemplo, los epítomos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 7,615,530.

25 Antígenos virales adecuados incluyen, pero no se limitan a, antígenos retrovirales tales como antígenos de VIH-1 incluyendo los productos genéticos de los genes gag, pol y env, la proteína Nef, la transcriptasa reversa y otros componentes del VIH; antígenos virales de hepatitis tales como las proteínas S, M y L del virus de la hepatitis B, el antígeno pre-S del virus de la hepatitis B, y otras hepatitis, por ejemplo, hepatitis A, B y C, componentes virales; antígenos virales de influenza tales como hemaglutinina y neuraminidasa y otros componentes virales de la influenza; antígenos virales de sarampión tales como la proteína de fusión del virus de sarampión y otros componentes del virus del sarampión; antígenos virales de rubéola tales como las proteínas E1 y E2 y otros componentes del virus de la rubéola; antígenos rotavirales tales como VP7sc y otros componentes rotavirales; antígenos citomegalovirales tales como la glicoproteína B de envoltura y otros componentes de antígenos citomegalovirales; antígenos virales sinciciales respiratorios tales como las proteínas de unión (G), fusión (F) y de matriz (M2) y otros componentes de antígenos virales sinciciales respiratorios; antígenos virales del herpes simplex tales como proteínas tempranas inmediatas, glicoproteína D y otros componentes del antígeno viral de herpes simplex; antígenos virales de varicela zoster tales como gpl, gpII y otros componentes de antígenos virales de varicela zoster; antígenos virales de encefalitis japonesa, tales como las proteínas E, M-E, M-E-NS 1, NS 1, NS 1-NS2A, 80%E, y otros componentes de antígenos virales de encefalitis japonesa; antígenos virales de rabia, tales como glicoproteína de la rabia, nucleoproteínas de la rabia y otros componentes de antígenos virales de la rabia; y combinaciones que comprenden uno o más de los antígenos anteriores.

40 Antígenos bacterianos adecuados incluyen, pero no se limitan a, antígenos bacterianos de la tosferina, tales como la toxina de la tosferina, hemaglutinina filamentosa, pertactina, FIM2, FMI3, adenilato ciclasa y otros componentes de antígenos bacterianos de la tosferina; antígenos bacteriano de la difteria tales como toxinas o toxoides de la difteria y otros componentes de antígenos bacterianos de la difteria; antígenos bacterianos del tétano tales como toxinas o toxoides del tétano y otros componentes de antígenos bacterianos del tétano; antígenos bacterianos de estreptococos tales como proteínas M y otros componentes de antígenos bacterianos de estreptococos; antígenos bacterianos de bacillus gram-negativos; antígenos bacterianos de mycobacterium tuberculosis tales como la proteína 65 de shock por calor (HSP65), la proteína secretada principal de 30 kDa, el antígeno 85A y otros componentes antígenos micobacterianos; componentes de antígeno bacterianos de Helicobacter pylori; antígenos bacterianos de neumococos tales como neumolisina, y otros componentes de antígenos bacterianos de neumococos; antígenos bacterianos de haemophilus influenza; antígenos bacterianos de ántrax tales como antígeno protector de ántrax y otros componentes de antígeno bacteriano de ántrax; antígenos bacterianos de rickettsiae tales como *romps* y otros componentes de antígenos bacterianos de rickettsiae; y combinaciones que comprenden uno o más de los antígenos anteriores.

55 Antígenos fúngicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, componentes de antígenos fúngicos de cándida; antígenos fúngicos de histoplasma tales como proteína 60 de choque por calor (HSP60) y otros componentes de antígenos fúngicos de histoplasma; antígenos fúngicos de criptococos tales como polisacáridos capsulares y otros componentes de antígenos fúngicos de criptococos; antígenos fúngicos de coccidioides tales como antígenos de esférula y otros componentes de antígenos fúngicos de coccidioides; y antígenos fúngicos de tinea tales como tricofitina y otros componentes de antígenos fúngicos de coccidioides; y combinaciones que comprenden uno o más

de los antígenos anteriores.

Antígenos de protozoarios y otros parásitos adecuados incluyen, pero no se limitan a antígenos de plasmodium falciparum tales como antígenos de superficie de merozoita, antígenos de superficie de esporozoita, antígenos de circumesporozoita, antígenos de superficie de gametocito/gameto, antígeno de etapa en sangre pf 1 55/RESA, y otros componentes de antígenos de plasmodio; antígenos de toxoplasma tales como SAG-1, p30 y otros componentes de antígenos de toxoplasma; antígenos de esquistosomas tales como glutatona-S-transferasa, piramiosina y otros componentes antigénicos de esquistosoma; antígenos de leishmania principal y otras leishmanias tales como gp63, lipofosfoglicano y su proteína asociada y otros componentes antigénicos de la leishmania; y antígenos de Trypanosoma cruci tal como el antígeno de 75-77 kDa, el antígeno de 56 kDa y otros componentes antigénicos de tripanosoma; y combinaciones que comprenden uno o más de los antígenos de parásito anteriores.

En una realización, el epítipo de polipéptido es de virus sincicial respiratorio, tal como un epítipo de la proteína de unión (G) y sus subunidades, la proteína de fusión (F) y sus subunidades, y la proteína de matriz (M2) y sus subunidades. En otra realización, el epítipo de polipéptido es de virus de influenza como un epítipo de la proteína de hemaglutinina (HA) y sus subunidades, la proteína de neuraminidasa (NA) y sus subunidades, o el ectodominio de proteína de matriz (M2). En otra realización, el epítipo de polipéptido es del parásito de la malaria, tal como Plasmodium falciparum, P. vivax, P. ovale y P. malariae, e incluyendo, por ejemplo, la proteína circumesporozoita (CS) y subunidades que incluyen los epítopos T1, B y T*.

Tal como se utiliza aquí, los antígenos de proteínas de circumesporozoita de Plasmodium falciparum son:

T1: DPNANPNVDPNANPNV (SEQ ID NO: 1)

B: NANP (SEQ ID NO: 2)

T*: EYLNKIQNSLSTEWSPCSVT (SEQ ID NO: 3)

En ciertas realizaciones, el epítipo T, B o T*, particularmente el epítipo B se repite 2 o más veces.

Las películas de capa múltiple para uso en la invención también incluyen un ligando para el receptor similar a Toll o ligando TLR, el cual es una lipoproteína o un lipopéptido. Los ligandos TLR son moléculas que se enlazan a los TLRs y bien activan o reprimen los receptores de TLR. La activación de la señalización a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados con el patógeno (PAMPs) e imitaciones lleva a la activación transcripcional de genes que codifican citoquinas, quimioquinas y moléculas coestimuladoras proinflamatorias, las cuales pueden controlar la activación de la respuesta inmune adaptativa específica del antígeno. Los TLRs han sido perseguidos como dianas terapéuticas potenciales para diversas enfermedades inflamatorias y cáncer. Después de la activación, las TLRs inducen la expresión de un cierto número de familias de proteínas, incluyendo citoquinas inflamatorias, interferones tipo 1, y quimioquinas. Los ligandos del receptor de TLR pueden funcionar como adyuvantes para la respuesta inmune.

Ligandos TLR de ejemplo incluyen un ligando TLR1, un ligando TLR2, un ligando TLR3, un ligando TLR4, un ligando TLR5, un ligando TLR6, un ligando TLR7, un ligando TLR 8, un ligando TLR9 y combinaciones de los mismos.

Ligandos TLR1 de ejemplo para uso en la invención incluye lipoproteínas bacterianas de triacilo tales como Pam3Cys ([N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína]). Ligandos TLR2 de ejemplo para uso en la invención incluyen lipoproteínas bacterianas de diacilo tales como Pam2Cys (Pam2Cys [S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína]) y lipopéptido-2 (MALP2) de micoplasma activador de macrófago. Ligandos TLR6 de ejemplo para uso en la invención son los diacil lipopéptidos. TLR1 y TLR6 requieren heterodimerización con TLR2 para reconocer los ligandos. Los TLR1/2 son activados por la triacil lipoproteína (o un lipopéptido, tal como Pam3Cys), mientras que TLR6/2 son activados por las lipoproteínas diacilo (por ejemplo Pam2Cys) aunque puede haber algún reconocimiento cruzado.

El Zymosan puede ser mencionado como un ligando de TLR no lipoproteína. Otros incluyen el ligando TLR3 de ejemplo, Poli(I:C); los ligandos TLR4 de ejemplo, lipopolisacárido (LPS), monofosfolípido A (MPLA), proteína de fusión del virus sincicial respiratorio, y proteína de envoltura del virus de tumor mamario en ratón; el ligando TLR5 de ejemplo, flagelina; los ligandos TLR7 de ejemplo, análogos de nucleósidos tales como loxoribina (análogo de la guanosina) e imidazoquinolinas tales como imiquimod y R848; el ligando TLR8 de ejemplo, ARN de cadena sencilla; y el ligando de ejemplo TLR9, ADN oligodesoxinucleótido CpG no metilado.

El primer polielectrolito antigénico de la composición de la invención, por ejemplo, un polipéptido antigénico, tiene un ligando de TLR de lipoproteína o lipopéptido enlazado covalentemente al mismo. Por ejemplo, el Pam3Cys puede ser acoplado covalentemente a una cadena polipeptídica mediante química de síntesis del polipéptido estándar. En

una realización, el Pam3Cys está enlazado covalentemente a un polipéptido antigénico a través de un enlace covalente directo mediante un enlace amida formado entre el ácido carboxílico de Pam3Cys-OH (disponible comercialmente de Bachem, Inc.) al terminal N de un péptido. Una forma conveniente de lograr esta reacción es acoplar el Pam3Cys-OH en la presencia de un reactivo formador de enlace amida tal como HBTU (O-benzotriazol-
 5 N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluoro-fosfato), HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametil uronio hexafluorofosfato Metanamino), o el DIPCDI (N,N'-Diisopropilcarbodiimida) a un péptido sintético sobre una perla de resina para síntesis en fase sólida. El avance de la reacción de acoplamiento puede monitorizarse colorimétricamente mediante el ensayo con ninhidrina y, después de su terminación, el exceso de Pam3Cys-OH y otros reactivos puede eliminarse por lavado. El conjugado de péptido de Pam3Cys sintético es escindido de la resina
 10 y purificado por cromatografía. Por ejemplo, los péptidos de Pam3Cys pueden ser purificados por HPLC en fase reversa utilizando una columna C4 y un gradiente de agua/isopropanol. Una ventaja de esta metodología es que el polipéptido de Pam3Cys/antigénico está estrictamente controlado en una relación 1:1.

El Pam3Cys-OH puede ser conjugado específicamente a la ϵ -amina de la cadena lateral del residuo de lisina, bien sea específicamente a un péptido enlazado a una resina como se describió más arriba o de forma no específica a un péptido o proteína no protegido utilizando un reactivo de acoplamiento soluble en agua tal como EDC/sulfo-NHS. El
 15 producto de esa reacción es purificado, por ejemplo, por cromatografía de permeación en gel o diálisis, y luego incorporado en una partícula por LBL u otros métodos.

El Pam3Cys-OH puede ser conjugado a un polielectrolito altamente cargado tal como polilisina y luego incorporado en una película de LBL junto con uno o más péptidos diseñados. Así, el Pam3Cys-OH, por ejemplo, es conjugado por amida a una secuencia que contiene un exceso de carga tal como un segmento de polilisina de aproximadamente cuatro hasta aproximadamente catorce residuos de longitud y se purifica como se describió más
 20 arriba, o en el caso de Pam3Cys-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-OH (Pam3Cys-SK₄) adquirida de un proveedor comercial (EMD Biosciences). Péptidos tales como estos podrían ser incorporados en una película en una etapa antes, durante o después de la incorporación del polipéptido antigénico. La ventaja de esta metodología sería que solamente uno o (tal vez varios) péptidos de polielectrolito de Pam3Cys podrían ser utilizados en cualquier combinación con polipéptidos antigénicos diseñados, simplificando grandemente la síntesis. Además, la estequiometría del polipéptido diseñado Pam3Cys/antigénico puede ser variada según se desee para utilizar la potencia o minimizar toxicidades.
 25

Los reactivos de Pam3Cys comercialmente disponibles Pam3Cys-OH o Pam3Cys-SK₄ pueden ser incorporados en partículas directamente a través de un proceso diferente de LBL. Estos incluyen durante la precipitación de las partículas (por ejemplo durante la precipitación de las partículas de núcleo tales como CaCO₃), la fabricación de partículas (por ejemplo durante la dispersión de agua en aceite de PLGA), o la fabricación de liposomas. Finalmente es posible que la hidrofobicidad de Pam3Cys podría llevar a la adsorción a una superficie. Así la incubación simple de partículas en soluciones de Pam3Cys-OH o Pam3Cys-SK₄ podría dar como resultado una partícula antigénica
 30 con el ligando de TLR-2 incorporado.
 35

La conjugación de monofosforil lípido A (MPLA) a un péptido diseñado es posible y las químicas apropiadas son conocidas en la técnica. Estas químicas permiten la conjugación específica de derivados de MPLA a DPs modificados a través de la reacción de cicloadición azida/alquino (química *click*), lo cual ocurre rápida y eficientemente en reguladores acuosos (Guo et al. US20090239378). Los conjugados de antígenos de carbohidratos asociados a tumores a MPLA han sido hechos utilizando esta tecnología y los conjugados resultantes han demostrado ser inmunogénicos en ratones.
 40

Alternativamente, debido a su alta naturaleza hidrófoba el MPLA adsorberá eficientemente a las superficies. Así, una solución diluida de MPLA, por ejemplo 10-100 μ g/mL en reguladores acuosos neutros diluidos se adsorberá a una suspensión de micropartículas de CaCO₃ recubiertas con películas de los péptidos diseñados. La eficiencia del proceso de carga puede ser monitorizada bien sea por métodos químicos o por un bioensayo basado en células.
 45

Se han conjugado análogos de imiquimod a anticuerpos monoclonales (Stoermer et al. US20090035323). Estos conjugados muestran capacidad de modulación de la respuesta inmune indicando que se retiene actividad de TLR-7 suficiente en el análogo de imiquimod para potenciar la respuesta inmune. Pueden hacerse conjugados similares con péptidos diseñados e incorporados en partículas de vacuna. Además, se han previsto conjugados para imiquimod con enlazantes lábiles (Stoermer et al. 20100158928). En estos ejemplos, el imiquimod jugaría el papel de un profármaco. En la forma conjugada, el análogo del imiquimod es inactivo, pero por escisión del enlazante lábil (por un proceso bien sea químico o enzimático) se libera imiquimod soluble activo para la estimulación inmune.
 50

El imiquimod soluble puede ser incorporado en partículas por coprecipitación con un núcleo tal como CaCO₃. La solubilidad del imiquimod en agua desciende rápidamente en y por encima de pH 6. Así al mezclar una solución de CaCl₂ e imiquimod a pH 5 con una solución de Na₂CO₃ dará como resultado partículas de CaCO₃ con imiquimod atrapado en la sal a pH neutro y ligeramente alcalino. La fagocitosis de las partículas las colocaría entonces en compartimientos ácidos los cuales disolverían netamente el CaCO₃ y liberarían el imiquimod soluble.
 55

En otra realización, un sustrato tal como un núcleo plantilla también tiene depositado sobre el mismo un ligando de TLR antes de la deposición de las capas de polielectrolito. En otra realización, un ligando de TLR también podría ser codepositado con una o más capas de polielectrolito durante el ensamblaje de la película de capas múltiples.

5 Las películas de capas múltiples de polielectrolitos son películas delgadas (por ejemplo, de un espesor de pocos nanómetros a micrómetros) compuestas de capas alternantes de polielectrolitos con carga opuesta. Tales películas pueden ser formadas por ensamblaje capa por capa sobre un sustrato adecuado. En el autoensamblaje electrostático capa por capa ("LBL"), la base física de la asociación de los polielectrolitos es la atracción electrostática. La configuración de la película es posible porque el signo de la densidad de carga superficial de la película se invierte con la deposición de capas sucesivas. La generalidad y relativa simplicidad del proceso para películas LBL permite la deposición de muchos diferentes tipos de polielectrolitos sobre muchos diferentes tipos de superficie. Las películas de capas múltiples de polipéptidos son un subconjunto de películas de capas múltiples de polielectrolitos, comprendiendo al menos una capa que comprende un polipéptido cargado, denominado aquí como polipéptido diseñado. Una ventaja clave de las películas de capas múltiples de polipéptidos sobre las películas hechas a partir de otros polímeros es su biocompatibilidad. Las películas de LBL también pueden ser utilizadas para encapsulación. Las aplicaciones de las películas y microcápsulas de polipéptidos incluyen, por ejemplo, nanorreactores, biosensores, células artificiales y vehículos para administración de fármacos.

El término "polielectrolito" incluye materiales policatiónicos y polianiónicos, que tienen un peso molecular de más de 1000 y al menos 5 cargas por molécula. Materiales policatiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, polipéptidos y poliaminas. Las poliaminas incluyen, por ejemplo, un polipéptido tal como poli-L-lisina (PLL) o poli-L-ornitina, polivinil amina, poli (aminoestireno), poli (aminoacrilato), poli (N-metil aminoacrilato), poli (N-etilaminoacrilato), poli (N,N-dimetil aminoacrilato), poli (N,N-dietilaminoacrilato), poli(aminometacrilato), poli(N-metil amino- metacrilato), poli(N-etil aminometacrilato), poli(N,N-dimetil aminometacrilato), poli(N,N-dietil aminometacrilato), poli(etileneimina), poli (dialil dimetilamonio cloruro), poli(N,N,N-trimetilaminoacrilato cloruro), poli(metilacrilamidopropiltrimetil amonio cloruro), quitosano y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales policatiónicos anteriores. Materiales polianiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, un polipéptido tal como ácido poli-L-glutámico (PGA) y ácido poli-L-aspártico, un ácido nucleico tal como ADN y ARN, alginato, carragenanoPARR39 , furcellarano, pectina, xantano, ácido hialurónico, heparina, heparan sulfato, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de dextrano, ácido poli(met) acrílico, celulosa oxidada, carboximetil celulosa, polisacáridos ácidos y croscarmelosa, polímeros y copolímeros sintéticos que contienen grupos carboxilos sobrantes, y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales polianiónico anteriores. En una realización, el epítipo polipeptídico y el electrolito tienen el mismo signo de carga.

En una realización, una o más capas de polielectrolito de la película, opcionalmente incluyendo el polielectrolito que comprende el epítipo polipéptido es un polipéptido diseñado. En una realización, los principios del diseño para polipéptidos adecuados para la deposición electrostática capa por capa están dilucidados en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2005/0069950. En resumen, las claves del diseño primario son la longitud y carga del polipéptido. La electrostática es la clave de diseño más importante porque es la base del LBL. Sin propiedades de carga adecuadas, un polipéptido puede ser no sustancialmente soluble en solución acuosa a pH 4 a 10 y puede no ser utilizado fácilmente para la fabricación de una película de capa múltiple por LBL. Otras claves del diseño incluyen la estructura física de los polipéptidos, la estabilidad física de las películas formadas a partir de los polipéptidos, y la biocompatibilidad y bioactividad de las películas y los polipéptidos constituyentes.

Un polipéptido diseñado significa un polipéptido que tiene carga suficiente para enlazamiento estable a una superficie con carga opuesta, esto es, un polipéptido que puede ser depositado sobre una capa de una película de capas múltiples en donde la fuerza impulsora para la formación de la película es la electrostática. Una película de corta estabilidad es una película que una vez formada, retiene más de la mitad de sus componentes después de la incubación en PBS a 37°C durante 24 horas. En realizaciones específicas, un polipéptido diseñado tiene al menos 15 aminoácidos de longitud y la magnitud de la carga neta por residuo de polipéptido es mayor que o igual a 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 o 0.5 a pH 7.0. Los aminoácidos de origen natural cargados positivamente (básicos) a pH 7.0 son arginina (Arg), histidina (His), ornitina (Orn) y lisina (Lys). Los residuos de aminoácidos de origen natural cargados negativamente (ácidos) a pH 7.0 son ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp). Una mezcla de residuos de aminoácidos de carga opuesta puede ser empleada en tanto la relación neta global de carga satisfaga los criterios especificados. En una realización, un polipéptido diseñado no es un homopolímero. En otra realización, el polipéptido diseñado es no ramificado.

Una clave del diseño es el control de la estabilidad de las películas de LBL del polipéptido. Los enlaces iónicos, los puentes de hidrógeno, las interacciones de van der Waals, y las interacciones hidrófobas contribuyen a la estabilidad de las películas de capa múltiple. Además, los enlaces disulfuro covalentes formados entre aminoácidos que contienen sulfhidrilo en los polipéptidos y dentro de la misma capa o en capas adyacentes puede incrementar la resistencia estructural. Los aminoácidos que contienen sulfhidrilo incluyen cisteína y homocisteína y estos residuos pueden ser incorporados fácilmente en péptidos diseñados sintéticos. Además, los grupos sulfhidrilo pueden ser incorporados en homopolímeros de polielectrolitos tales como poli-L-lisina o ácido poli-L-glutámico por métodos bien descritos en la literatura. Los aminoácidos que contienen sulfhidrilo pueden ser utilizados para "asegurar" (enlazar

entre sí) y “desasegurar” capas de una película de polipéptido de capas múltiples mediante un cambio en el potencial de oxidación. También, la incorporación de un aminoácido que contiene sulfhidrilo en un polipéptido diseñado permite el uso de péptidos relativamente cortos en la fabricación de películas, en virtud de la formación de enlaces de puentes disulfuro intermoleculares.

5 En una realización, los polipéptidos que contienen sulfhidrilo diseñados, bien sea sintetizados químicamente o producidos en un organismo huésped, son ensamblados por LBL en la presencia de un agente reductor para evitar la formación prematura de puentes disulfuro. Después del ensamblaje de la película, se retira el agente reductor y se agrega un agente oxidante. En la presencia del agente oxidante se forman puentes disulfuro entre los grupos sulfhidrilo, “asegurando” por lo tanto entre sí los polipéptidos dentro de capas y entre capas en donde hay grupos tiol presente. Agentes reductores adecuados incluyen ditiotreitól (DTT), 2-mercaptoetanol (BME), glutatióna reducida, clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y combinaciones de más de uno de estos agentes químicos. Agentes oxidantes adecuados incluyen glutatióna oxidada, tert-butilhidroperóxido (t-BHP), timerosal, diamida, 5,5'-ditiolbis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), 4,4'-ditiopiridina, bromato de sodio, peróxido de hidrógeno, tetrahionato de sodio, porfirindina, ortoyodosobenzoato de sodio, y combinaciones de más de uno de estos agentes químicos.

15 Como alternativa a los puentes de disulfuro, las químicas que producen otros enlaces covalentes pueden ser utilizados para estabilizar las películas de LBL. Para películas compuestas de polipéptidos, las químicas que producen enlaces amida son particularmente útiles. En la presencia de reactivos de acoplamiento apropiados, los aminoácidos ácidos (aquellos con cadenas laterales que contienen grupos de ácido carboxílico tales como ácido aspártico y ácido glutámico) reaccionaran con los aminoácidos cuyas cadenas laterales contienen grupos amina (tales como lisina y ornitina) para formar enlaces amida. Los enlaces amida son más estables que los puentes de disulfuro bajo condiciones biológicas y los enlaces amida no experimentarán reacciones de intercambio. Pueden utilizarse muchos reactivos para activar las cadenas laterales de polipéptidos para los enlaces amida. Los reactivos de carbodiimida, tales como la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) soluble en agua reaccionará con ácido aspártico o ácido glutámico a pH ligeramente ácido, formando un producto intermedio que reaccionará irreversiblemente con una amina para producir un enlace amida. Se agregan frecuentemente aditivos tales como N-hidroxisuccinimida a la reacción para acelerar la rata y eficiencia de la formación de amida. Después de la reacción los reactivos solubles son retirados de las nanopartículas o micropartículas por centrifugación y aspiración. Ejemplos de otros reactivos de acoplamiento incluyen diisopropilcarbodiimida, HBTU, HATU, HCTU, TBTU y PyBOP. Ejemplos de otros aditivos incluyen sulfo-N-hidroxisuccinimida, 1-hidroxibenzotriazol, y 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol. El grado de enlazamiento cruzado amida puede ser controlado modulando la estequiometría de los reactivos de acoplamiento, el tiempo de reacción, o la temperatura de la reacción, y pueden monitorizarse por técnicas tales espectroscopía de infrarrojo cotransformadas de Fourier (FT-IR).

Las películas de LBL con entrecruzamiento covalente tienen propiedades deseables tales como estabilidad incrementada. Una estabilidad mayor permite utilizar condiciones más restrictivas durante la fabricación de nanopartículas, micropartículas, nanocápsulas o microcápsulas. Ejemplos de condiciones restrictivas incluyen altas temperaturas, bajas temperaturas, temperaturas criogénicas, velocidades de centrifugación alta, reguladores salinos altos, reguladores de pH alto, reguladores de pH bajo, filtración y almacenamiento a largo plazo.

Un método para hacer una película de capas múltiples de polielectrolitos comprende depositar una pluralidad de capas de especies químicas con cargas opuestas sobre un sustrato. Al menos una capa puede comprender un polipéptido diseñado. Polielectrolitos depositados sucesivamente tendrán cargas netas opuestas. En un caso, la deposición de un polielectrolito comprende exponer el sustrato a una solución acuosa que comprende un polielectrolito a un pH el cual tiene una carga neta adecuada para LBL. En otros casos, la deposición de un polielectrolito sobre el sustrato se logra mediante la aspersión secuencial de soluciones de polipéptidos con cargas opuestas. En aún otras instancias, la deposición de sustrato se mediante aspersión simultánea de soluciones de polielectrolitos con cargas opuestas.

En el método LBL para la formación de una película de capas múltiples, las cargas opuestas de las capas adyacentes proveen la fuerza impulsora para el ensamblaje. No es crítico que los polielectrolitos en capas opuestas tengan la misma densidad de carga lineal neta, solamente que las capas opuestas tengan cargas opuestas. Un procedimiento de ensamblaje de película estándar por deposición incluye formar soluciones acuosas de los poliones a un pH en el cual son ionizados (esto es, pH 4-10), proveyendo un sustrato que porta una carga de superficie, y la inmersión alternada del sustrato en soluciones de polielectrolitos cargados. El sustrato es lavado opcionalmente entre la deposición de capas alternantes.

La concentración del polielectrolito adecuada para la deposición del polielectrolito puede ser determinada fácilmente por una persona de experiencia normal en el arte. Una concentración de ejemplo es 0.1 a 10 mg/mL. Para polielectrolitos no polipeptídicos típicos tales como poli (ácido acrílico) y poli (clorhidrato de ailamina), los espesores de capa típicos son aproximadamente 3 a aproximadamente 5 Å, dependiendo de la fuerza iónica de la solución. Los polielectrolitos cortos forman típicamente capas más delgadas que los polielectrolitos largos. Con referencia al espesor de película, el espesor de la película de polielectrolito depende de la humedad así como del número de capas y composición de la película. Por ejemplo, las películas de PLL/PGA de 50 nm de espesor se encogen a 1.6

nm al secarlas con nitrógeno. En general, pueden formarse películas de 1 nm a 100 nm o más en espesor dependiendo del estado de hidratación de la película y del peso molecular de los polielectrolitos empleados en el ensamblaje.

Además el número de capas requeridas para formar una película de capas múltiples de polielectrolitos estable dependerá de los polielectrolitos en la película. Para películas que comprenden solamente capas de polipéptido de peso molecular bajo, una película típicamente tendrá 4 o más bicapas de polipéptidos con cargas opuestas. Para películas que comprenden polielectrolitos de alto peso molecular tales como poli (ácido acrílico) y poli (clorhidrato de alilamina), las películas que comprenden una bicapa individual de polielectrolitos con cargas opuestas puede ser estable. Hay estudios que demuestran que las películas de polielectrolitos son dinámicas. Los polielectrolitos contenidos dentro de esa película pueden emigrar entre capas y pueden intercambiarse con polielectrolitos solubles de carga similar cuando se suspenden en una solución de polielectrolitos. Además las películas de polielectrolitos pueden desensamblarse o disolverse en respuesta a un cambio en el ambiente tal como temperatura, pH, fuerza iónica, o potencial de oxidación del regulador en suspensión. Así algunos polielectrolitos y particularmente polielectrolitos peptídicos exhiben estabilidad transitoria. La estabilidad de las películas de polielectrolitos para péptidos puede monitorizarse suspendiendo las películas en un regulador adecuado bajo condiciones controladas durante un período fijo de tiempo, y luego medir la cantidad de los péptidos dentro de la película como un ensayo adecuado tal como en análisis de aminoácidos, ensayos por HPLC o ensayos por fluorescencia. Las películas de polielectrolitos peptídicas son más estables bajo condiciones que son relevantes en su almacenamiento y uso como vacunas, por ejemplo, en reguladores neutros y temperaturas ambiente tales como 4°C a 37°C. Bajo estas condiciones las películas de polielectrolitos de péptidos estables retendrán la mayor parte de sus péptidos componentes durante al menos 24 horas y frecuentemente hasta por 14 días y más allá.

En una realización, un polipéptido diseñado comprende una o más regiones de adsorción en superficie enlazadas covalentemente a uno o más de los epítopos de polipéptido, en donde el polipéptido diseñado y la una o más regiones de adsorción de superficie tienen el mismo signo de carga, esto es, ambas están cargadas positivamente o negativamente de forma completa. Tal como se utiliza aquí, una región de adsorción de superficie es una región cargada de un polipéptido diseñado que ventajosamente provee carga suficiente de tal forma que un péptido contenga un epítipo de polipéptido, por ejemplo, puede ser depositado en una película de capas múltiples. En una realización, la una o más regiones adsorbentes de superficie y el uno o más epítopos de polipéptido tienen la misma polaridad neta. En otra realización, la solubilidad del polipéptido diseñado a pH 4 a 10 es mayor que o igual a aproximadamente 0.1 mg/mL. En otra realización, la solubilidad de polipéptido diseñado a pH 4 a 10 es mayor que o igual a aproximadamente 1 mg/mL. La solubilidad es una limitación práctica para facilitar la deposición de los polipéptidos desde la solución acuosa. Un límite superior práctico sobre el grado de polimerización de un polipéptido antigénico es de aproximadamente 1000 residuos. Es concebible, sin embargo, que podrían realizarse polipéptidos compuestos más grandes mediante un método apropiado de síntesis.

En una realización, un polipéptido diseñado comprende un epítipo de polipéptido sencillo flanqueado por dos regiones de adsorción de superficie, y una región de adsorción a superficie en terminal N y una región de adsorción en superficie de terminal C. En otra realización, un polipéptido diseñado comprende un epítipo de polipéptido sencillo flanqueado por una región de adsorción de superficie enlazada al terminal N del epítipo polipeptídico. En otra realización, un polipéptido diseñado comprende un epítipo de polipéptido antigénico flanqueado por una región de adsorción en superficie enlazada al terminal C del epítipo polipeptídico.

Cada una de las regiones independientes (por ejemplo, epítopos de polipéptido y regiones de adsorción en superficie) del polipéptido diseñado pueden ser sintetizadas separadamente por síntesis de péptidos en fase de solución, síntesis de péptidos en fase sólida, o manipulación genética de un organismo huésped adecuado. La síntesis de péptidos en fase en solución es el método utilizado para la producción de la mayoría de los agentes farmacéuticos peptídicos aprobados en el mercado hoy en día. Una combinación de métodos en fase de solución y en fase sólida pueden utilizarse para sintetizar péptidos relativamente largos e incluso proteínas pequeñas. Las compañías de síntesis de péptidos tienen la experticia y la experiencia para sintetizar péptidos difíciles sobre la base de cargo por servicio. Las síntesis se llevan a cabo bajo condiciones de buenas prácticas de manufactura (GMP) y a una escala adecuada para ensayos químicos y lanzamiento comercial de fármacos.

Alternativamente, las diversas regiones independientes pueden ser sintetizadas juntas como una cadena polipeptídica individual por síntesis de péptidos en fase en solución, síntesis de péptidos en fase sólida o manipulación genética de un organismo huésped adecuado. La selección de metodología en cualquier caso particular será materia de conveniencia o economía.

Si los diversos epítopos de polipéptidos y las regiones de adsorción en superficies son sintetizados separadamente, una vez purificados, por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico o por cromatografía líquida de alto rendimiento, se unen por síntesis de enlace peptídico. Esto es, el terminal N de la región de adsorción en superficie y el terminal C del epítipo polipeptídico son unidos covalentemente para producir el polipéptido diseñado. Alternativamente, el terminal C de la región de adsorción en superficie y el terminal N del epítipo polipeptídico son enlazados covalentemente para producir el polipéptido diseñado. Los fragmentos individuales pueden ser obtenidos

como segmentos completamente protegidos, completamente no protegidos o parcialmente protegidos. Los segmentos pueden ser unidos covalentemente en reacción en fase en solución o reacción en fase sólida. Si un fragmento de polipéptido contiene una cisteína como su residuo en N terminal y otro fragmento polipéptido contiene un tioéster o un precursor de tioéster en su residuo C terminal los dos fragmentos se acoplarán espontáneamente en solución mediante una reacción específica comúnmente conocida (para los experimentados en el arte) como Ligación Nativa. La Ligación Nativa es una opción particularmente atractiva para la síntesis de péptidos diseñados porque puede ser llevada a cabo con fragmentos de péptidos completamente desprotegidos o parcialmente protegidos en solución acuosa y a concentraciones diluidas.

En una realización, los epítomos de polipéptidos y/o las regiones de adsorción en superficie son unidas por enlaces peptídicos o no peptídicos tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 7,723,294, la cual enseña el uso de enlaces no peptídicos para unir segmentos de polipéptidos para uso en películas de capas múltiples. Enlazantes no peptídicos adecuados incluyen, por ejemplo, enlazantes alquilo tales como, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_s-\text{C}(\text{O})-$, en el que $s=2-20$. Los enlazantes alquilo están sustituidos opcionalmente por grupos que no generan impedimento estérico tales como alquilo inferior (por ejemplo, C_1-C_6), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH_2 , fenil o similares. Otro enlazante no peptídico de ejemplo es un enlazante de polietilen glicol tal como $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{C}(\text{O})-$ donde n es tal que el enlazante tiene un peso molecular de 100 a 5000 Da, específicamente 100 a 500 Da. Muchos de los enlazantes descritos aquí están disponibles en proveedores comerciales en una forma adecuada para uso en síntesis de péptidos en fase sólida.

De acuerdo con la invención uno o más epítomos de polipéptidos están unidos covalentemente a uno o más polielectrolitos, tales como un polipéptido u otro polielectrolito, a través de enlaces covalentes. Ejemplos de enlaces covalentes adecuados incluyen amidas, ésteres, éteres, tioéteres y disulfuros. Una persona experimentada en el arte puede aprovechar un rango de grupos funcionales encontrados dentro del péptido del epítomo para diseñar un enlace para un electrolito adecuado. Por ejemplo, un ácido carboxílico en el péptido de epítomo puede ser encontrado bien en el terminal C o en la cadena lateral de los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico. Los ácidos carboxílicos pueden ser activados con reactivos de acoplamiento de péptidos adecuados tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para reacción con aminas primarias o secundarias que se encuentran en polielectrolitos peptídicos tales como poli-L-lisina. El enlace amida resultante es estable bajo condiciones ambientales. Por el contrario, los grupos ácido en un polielectrolito peptídico pueden ser activados con EDC para la reacción con grupos amina en el péptido de epítomo. Grupos amina útiles pueden encontrarse en el terminal N del péptido de epítomo o en la cadena lateral de residuos de lisina.

Los péptidos de epítomos también pueden ser unidos a polielectrolitos a través de puentes disulfuro. Los polielectrolitos tales como PGA o PLL pueden ser modificados químicamente de tal manera que una fracción de sus cadenas laterales contenga grupos sulfhidrilo. En la presencia de un oxidante adecuado, estos sulfhidrilos reaccionarán con el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína contenido dentro del péptido del epítomo. La cisteína puede ser bien una cisteína nativa de la secuencia de proteínas de un patógeno tal como Plasmodium protozoan o puede ser una cisteína no nativa que fue incorporada intencionalmente en el epítomo durante la síntesis del péptido. Oxidantes adecuados incluyen DTNB, 2,2'-ditiopiridina, peróxido de hidrógeno, cistina y glutatona oxidada. La unión de péptido de epítomo a polielectrolitos a través de puentes de disulfuro es particularmente útil. Los disulfuros son estables bajo condiciones normales de fabricación y almacenamiento de película pero son escindidos fácilmente por agentes reductores encontrados de forma natural en las células, los cuales liberan el péptido del epítomo para procesamiento inmune.

Los péptidos de epítomos también pueden ser unidos a polielectrolitos a través de enlaces tioéster. Los péptidos de epítomos sintéticos pueden ser sintetizados con electrófilos apropiados tales como grupos haloacetilo que reaccionan específicamente con sulfhidrilos. Por ejemplo, un péptido de epítomo que contiene un cloroacetilo en su terminal N formará un enlace estable a polielectrolitos que portan sulfhidrilo tales como el PGA-SH descrito más arriba.

Los péptidos de epítomo también pueden ser unidos de manera covalente a polielectrolitos a través de moléculas enlazantes bifuncionales. Los enlazantes bifuncionales contienen usualmente dos grupos electrofílicos que pueden reaccionar con nucleófilos presentes bien sobre el péptido del epítomo o la molécula de polielectrolito. Comercialmente se venden dos clases de moléculas enlazantes, enlazantes homobifuncionales y enlazantes heterobifuncionales. Los enlazantes homobifuncionales contienen dos copias de un grupo electrofílico unidas por un espaciador no reactivo. Frecuentemente los electrófilos son ésteres activos, tales como ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) o ésteres de sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo NHS) los cuales reaccionan con aminas nucleofílicas. Ejemplos de ésteres de NHS homobifuncionales incluyen bis(sulfosuccinimidil) suberato, disuccinimidil glutarato, ditiobis(succinimidil) propionato, disuccinimidil suberato, disuccinimidil tartrato. Algunas veces los electrófilos son grupos aldehído que forman imidas con aminas nucleofílicas sobre las moléculas de epítomo y polielectrolito. Los enlaces imida son transitoriamente estables pero pueden ser convertidos en estructuras estables con agentes reductores tales como borohidruro de sodio o hidrogenación catalítica. El enlazante aldehído homobifuncional más comúnmente utilizado es glutaraldehído.

Otros enlazantes homobifuncionales usados comúnmente contienen electrófilos que reaccionan específicamente

con tioles nucleofílicos, los cuales pueden ser utilizados para enlazar los péptidos de epítipo que contiene cisteína a polielectrolitos que contienen sulfhidrilo como se describió más arriba. Ejemplos de enlazantes homobifuncionales específicos de sulfhidrilo incluyen 1,4-bismaleimidobutano, 1,4 bismaleimidil-2,3-dihidroxitobutano, bismaleimidohexano, bis-maleimidoetano, 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido]butano, ditiobismaleimidoetano, 1,6-hexano-bis-vinilsulfona.

Los miembros de la clase heterobifuncional de reactivos de entrecruzamiento contienen dos diferentes grupos de reactividad, frecuentemente pero no siempre electrófilos, los cuales reaccionan específicamente con diferentes grupos funcionales en moléculas de sustrato. Particularmente útiles son enlazantes que contienen un grupo electrofílico que es específico para un sulfhidrilo y otro electrófilo que es específico para una amina. Ejemplos de estos reactivos incluyen *N*-sulfosuccinimidil[4-yodoacetil]aminobenzoato, *N*-succinimidil[4-yodoacetil]aminobenzoato, succinimidil 3-[bromoacetamido]propionato, *N*-succinimidil yodoacetato, sulfosuccinimidil 4-[*N*-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato, succinimidil 4-[*N*-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato, ([*N*-maleimidocaproiloxi]sulfosuccinimida éster, *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisulfosuccinimida éster, *N*-succinimidil 3-(2-piridilditio)-propionato, succinimidil 6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato, 4-succinimidiloxicarbonil-metil-*a*-[2-piridilditio]tolueno.

El amplio rango de funcionalidad que normalmente está presente tanto en péptidos de epítipo como en polielectrolitos o que puede ser instalado fácilmente en cualquiera molécula permite que se escoja una estrategia de enlazamiento que se ajuste mejor a los sustratos de interés. Un ejemplo probable es el enlazamiento de un péptido de epítipo que contiene cisteína a PLL.

De acuerdo con la invención los segmentos de polipéptidos pueden ser unidos en una variedad de formas, dependiendo de la química enlazante no peptídica. Por ejemplo, el terminal N del primer segmento de polipéptido está unido al terminal C del segundo segmento de polipéptido. El terminal N del primer segmento de polipéptido está unido al terminal N del segundo segmento de polipéptido; el terminal C del primer segmento de polipéptido está unido al terminal C del segundo segmento de polipéptido; el terminal C del primer segmento de polipéptido está unido al terminal N del segundo segmento de polipéptido; el terminal C o el terminal N del primer segmento de polipéptido está unido a una cadena lateral sobrante del segundo segmento de polipéptido; o el terminal C o el terminal N del segundo segmento de polipéptido está unido a una cadena lateral sobrante del primer segmento de polipéptido. Independientemente del punto de unión, sin embargo, el primero y segundo segmentos están unidos covalentemente por un enlazante no peptídico.

En una realización, un polipéptido diseñado es una combinación única de una o más regiones de adsorción en superficie covalentemente unidas y uno o más epítopos de polipéptido. No hay limitación particular en la longitud de los epítopos de polipéptido, los cuales pueden ser epítopos lineales o epítopos conformacionales. Los epítopos pueden comprender cualquiera desde aproximadamente tres residuos de aminoácidos hasta varios cientos de residuos de aminoácidos para epítopos conformacionales complejos.

En una realización, un polipéptido diseñado comprende un epítipo de polipéptido y una región de adsorción en superficie. En otra realización, un polipéptido diseñado comprende un epítipo de polipéptido y dos regiones de adsorción en superficie, una unida al terminal N del epítipo de polipéptido y una unida al terminal C del epítipo de polipéptido. El propósito de las regiones de adsorción en superficie es permitir la adsorción del polipéptido sobre una superficie con carga opuesta con el fin de construir una película de capas múltiples.

El número de regiones de adsorción en superficie en un polipéptido diseñado con respecto al número y/o longitud de los epítopos de polipéptidos está relacionado con los requerimientos de solubilidad. Por ejemplo, si el epítipo de polipéptido es una secuencia de aminoácidos corta de, por ejemplo, tres residuos de aminoácidos, solamente una región de adsorción en superficie de al menos ocho residuos de aminoácidos se requerirá para adsorber el polipéptido diseñado sobre una superficie cargada adecuadamente. Si, por contraste, el epítipo de polipéptido es un dominio estructural plegado soluble de una proteína que comprende, por ejemplo, 120 residuos de aminoácidos, pueden requerirse dos regiones de adsorción en superficie para impartir cargas suficientes para que el polipéptido diseñado sea soluble en agua y adecuado para adsorción. Las regiones de adsorción en superficie podrían ser contiguas y localizadas en el terminal N del dominio, contiguas y localizadas en el terminal C del dominio, o no contiguas con uno en el terminal N y uno en el terminal C. Adicionalmente, el epítipo de polipéptido puede contener un segmento cargado (bien sea cargado negativamente o cargado positivamente) dentro de su secuencia nativa que pueda servir como región de adsorción en superficie.

Un polipéptido o antígeno puede contener uno o más determinantes antigénicos distinguibles. Un determinante antigénico puede referirse a una porción inmunogénica de una proteína de cadena múltiple.

En el arte se conocen bien métodos y técnicas para determinar la localización y composición de un determinante antigénico o epítipo para un anticuerpo específico. Estas técnicas pueden ser utilizadas para identificar y/o caracterizar epítopos para uso como epítopos de polipéptido. Un epítipo para un anticuerpo específico de antígeno puede determinarse por la "huella" del epítipo utilizando modificación química de las aminas/carboxilos expuestos

en la proteína antigénica. Un ejemplo de tal técnica de impresión de huellas es el uso de HXMS (intercambio hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en donde se presenta un intercambio hidrógeno/deuterio de los protones de amida de la proteína receptora y ligando, enlazamiento, y retrointercambio, en donde los grupos amida de esqueleto que participan en el enlazamiento de proteínas están protegidos del retrointercambio y por lo tanto permanecerán deuterados. Las regiones relevantes pueden ser identificadas en este punto por proteólisis péptica, cromatografía líquida de alto rendimiento en microcolumna instantánea, y/o espectrometría de masas por ionización con electroaspiración.

Otra técnica de identificación de epítomos adecuada es el mapeo de epítomos por resonancia magnética nuclear (RMN), en donde típicamente se compara la posición de las señales en los espectros de RMN de dos dimensiones del antígeno libre y del antígeno complejado con el péptido de enlazamiento al antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno típicamente es marcado isotópicamente de manera selectiva con ¹⁵N de tal manera que solamente señales correspondientes al antígeno y ninguna señal del péptido de enlazamiento a antígeno se observa en el espectro de RMN. Las señales del antígeno que se originan de los aminoácidos involucrados en la interacción con el péptido de enlazamiento al antígeno típicamente desplazará su posición en los espectros del complejo en comparación con los espectros del antígeno libre, y los aminoácidos involucrados en el enlazamiento pueden ser identificados de esa manera.

El mapeo/caracterización de los epítomos también puede hacerse por barrido de péptidos. En esta metodología, una serie de péptidos superpuestos que barren la longitud completa de la cadena de polipéptidos de un antígeno se preparan y prueban individualmente con respecto a su inmunogenicidad. El título de anticuerpo del antígeno de péptido correspondiente es determinado mediante un método estándar, por ejemplo, ensayo inmunosorbente enlazado a enzima. Los diversos péptidos pueden ser clasificados entonces con respecto a la inmunogenicidad, previendo una base empírica para la selección del diseño de péptidos para el desarrollo de vacunas.

Las técnicas de digestión con proteasa también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítomos. Las regiones/secuencias antigénicas relevantes determinantes pueden ser determinadas por digestión con proteasa, por ejemplo, utilizando tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 a la proteína antigénica por digestión durante la noche (O/N) a 37°C y pH 7-8 seguida por análisis por espectrometría de masas (MS) para la identificación del péptido. Los péptidos protegidos de la escisión por tripsina por la proteína antigénica pueden ser identificados subsecuentemente por comparación de muestras sometidas a la digestión con tripsina y muestras incubadas con CD38BP y luego sometidos a digestión por ejemplo con tripsina (revelando así una huella para el enlazante). Otras enzimas tales como la quimiotripsina, pepsina, etc., también pueden o alternativamente pueden ser usadas en un método de caracterización de epítomos similar. Además, la digestión con proteasa puede proveer un método rápido para determinar la localización de una secuencia determinante antigénica potencial dentro de una proteína antigénica conocida utilizando un anticuerpo conocido. Las técnicas de digestión con proteasa también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítomos.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende una pluralidad de epítomos de polipéptido, bien sea sobre el mismo o diferentes polielectrolitos, por ejemplo, polipéptidos diseñados. La pluralidad de los determinantes antigénicos puede ser del mismo o diferentes agentes infecciosos. En una realización, la composición inmunogénica comprende una pluralidad de polielectrolitos antigénicos únicos. En otra realización, la composición inmunogénica comprende una pluralidad de polielectrolitos inmunogénicos que comprenden epítomos de polipéptidos múltiples dentro de cada polielectrolito. Una ventaja de estas composiciones inmunogénicas es que determinantes antigénicos múltiples o conformaciones múltiples de un determinante antigénico lineal sencillo pueden estar presentes en una partícula de vacuna sintética individual. Tales composiciones con determinantes antigénicos múltiples pueden producir potencialmente anticuerpos contra múltiples epítomos, incrementando las posibilidades de que al menos algunos de los anticuerpos generados por el sistema inmune del organismo neutralizaran el patógeno o antígenos específicos diana o células cancerosas, por ejemplo.

La inmunogenicidad de una composición inmunogénica puede ser potenciada en un cierto número de formas. En una realización, la película de capas múltiples de uso en la invención comprende opcionalmente una o más moléculas bioactivas inmunogénicas adicionales. Aunque no es necesario, la una o más moléculas bioactivas inmunogénicas adicionales comprenderán típicamente uno o más determinantes antigénicos adicionales. Moléculas bioactivas inmunogénicas adicionales adecuadas incluyen, por ejemplo, un fármaco, una proteína, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un lípido, un fosfolípido, un carbohidrato, un polisacárido, un lipopolisacárido, una molécula estimuladora inmune de bajo peso molecular, o una combinación que comprende una o más de las moléculas bioactivas anteriores. Otros tipos de potenciadores inmunes adicionales incluyen un fragmento de membrana funcional, una estructura de membrana, un virus, un patógeno, una célula, un agregado de células, un organelo, o una combinación que comprende una o más de las estructuras bioactivas anteriores.

En una realización, la película de capa múltiple para uso en la invención comprende opcionalmente una o más moléculas bioactivas adicionales. La una o más moléculas bioactivas adicionales puede ser un fármaco. Alternativamente, la composición inmunogénica está en la forma de una carcasa hueca o un recubrimiento que rodea un núcleo. El núcleo comprende una variedad de diferentes encapsulantes, por ejemplo, una o más moléculas

bioactivas, incluyendo, por ejemplo un fármaco. Así, las composiciones inmunogénicas diseñadas como se describe aquí también podrán ser utilizadas para terapias combinadas, por ejemplo, para disparar una respuesta inmune y para la administración del fármaco objetivo. Los "núcleos" de microtamaño de un material terapéutico adecuado en forma "cristalinas" pueden ser encapsulados por una composición inmunogénica que comprende los polipéptidos antigénicos, en las microcápsulas resultantes podría ser utilizadas para la administración de fármacos. El núcleo puede ser insoluble bajo algunas condiciones, por ejemplo alto pH o baja temperatura, y soluble bajo las condiciones en las que ocurrirá la liberación controlada. El cambio en superficie de los cristales puede ser determinado por mediciones de potencial ζ (utilizada para determinar la carga en unidades electrostáticas sobre partículas coloidales en un medio líquido. La rata a la cual los contenidos de la microcápsula son liberados del interior de la microcápsula al ambiente circundante dependerá de un cierto número de factores, incluyendo el espesor de la coraza encapsulante, las propiedades antigénicas usadas en la coraza, la presencia de puentes disulfuro, el grado de entrecruzamiento de péptidos, temperatura, fuerza iónica y el método utilizado para ensamblar los péptidos. En general, cuanto más gruesas sean la cápsula, más largo es el tiempo de liberación.

En otra realización, la biomolécula inmunogénica adicional es una secuencia de ácidos nucleicos capaz de dirigir la síntesis en el organismo huésped de un inmunógeno deseado o de interferir con la expresión de información genética de un patógeno. En el primer caso, tal secuencia de ácidos nucleicos es, por ejemplo, insertada en un vector de expresión adecuado por métodos conocidos para los experimentados en el arte. Los vectores de expresión adecuados para producir transferencia genética de alta eficiencia *in vivo* incluyen vectores retrovirales, adenovirales y virales de vacuna. Elementos operativos de tales vectores de expresión incluyen al menos un promotor, al menos un operador, al menos una secuencia de guía, al menos un codón de terminación, y cualquier otra secuencia de ADN necesario o preferida para la transcripción y traducción subsiguientes adecuadas del ácido nucleico vector. En particular, se contempla que tales vectores contendrán al menos un origen de replicación reconocido por el organismo huésped junto con el cual un marcador seleccionable y al menos una secuencia promotora capaz de iniciar la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos. En este último caso, se prepararon múltiples copias de tal secuencia de ácidos nucleicos para administración, por ejemplo, por encapsulación de los ácidos nucleicos dentro de una película de capas múltiples de polipéptidos en la forma de una cápsula para administración intravenosa.

En la construcción de un vector de expresión recombinante, debe anotarse adicionalmente que pueden insertarse copias múltiples de la secuencia de ácidos nucleicos de interés y elementos operacionales participantes en cada vector. En tal disposición, el organismo huésped producirá cantidades mayores por vector de la proteína deseada. El número de copias múltiples de la secuencia de ácidos nucleicos que pueden ser insertadas en el vector están limitadas solamente por la capacidad del vector resultante debido a su tamaño, para ser transferidas, replicadas y/o transcritas en un microorganismo huésped apropiado.

En una realización adicional, la composición inmunogénica comprende una mezcla de moléculas bioactivas de polielectrolitos/inmunogénicas antigénicas. Estas pueden ser derivadas del mismo antígeno, pueden ser diferentes antígenos del mismo agente infeccioso o enfermedad, o pueden ser de diferentes agentes infecciosos o enfermedades. El complejo o mezcla generará por lo tanto una respuesta inmune contra una serie de antígenos y posiblemente una serie de agentes infecciosos o enfermedades según lo especifiquen los componentes peptídicos/proteínicos antigénicos del sistema de administración.

En una realización, la composición de película de capas múltiples/inmunogénica evoca una respuesta del sistema inmune a un patógeno. En una realización, una composición de vacuna comprende una composición inmunogénica de la invención en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Así, un método de vacunación contra una enfermedad patogénica comprende la administración a un sujeto que requiere vacunación de una cantidad efectiva de una composición inmunogénica.

Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas grandemente metabolizadas, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, partículas de virus inactivos, y similares. Sales farmacéuticamente aceptables también pueden ser utilizadas en la composición, por ejemplo, sales minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos. La composición también puede contener líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsificantes, o agentes reguladores del pH. También pueden utilizarse liposomas como portadores.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden ser utilizadas en un método para disparar una respuesta inmune contra una enfermedad o patógeno en un vertebrado (por ejemplo, vacunación). Dicho método comprende administrar una composición inmunogénica de la invención al vertebrado. En una realización, el polielectrolito contiene el epitopo polipeptídico en la capa más exterior o la expuesta al solvente de la película de capa múltiple. La composición inmunogénica puede ser administrada por vía oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, sublingual, intradérmica, pulmonar, o transdérmica, bien sea con o sin una dosis de refuerzo. En general, las composiciones son administradas de una manera compatible con la formulación de la dosificación, y en

cantidad tal que sea profiláctica y/o terapéuticamente efectiva. Las cantidades precisas de composición inmunogénica que van a ser administradas dependen del juicio del médico y pueden ser peculiares para cada sujeto. Será evidente para los experimentados en el arte que la cantidad terapéuticamente efectiva de una composición inmunogénica dependerá, *inter alia*, de la programación de administración, la dosis unitaria del antígeno administrado, si las composiciones son administradas en combinación con otros agentes terapéuticos y el estado inmune y la salud del receptor. Una dosificación terapéuticamente efectiva puede ser determinada por el médico de experiencia normal trabajando con base en las características del paciente (edad, peso, sexo, condición, complicaciones, otras enfermedades, etc.), como es bien conocido en el arte. Adicionalmente, puesto que se realizan estudios de rutina, surgirá más información específica con respecto a los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento de condiciones diversas en diversos pacientes, y el profesional de experiencia normal, considerando el contexto terapéutico, edad y salud general del receptor, es capaz de establecer la dosificación apropiada.

La composición inmunogénica comprende opcionalmente un adyuvante. Los adyuvantes en general comprenden sustancias que refuerzan la respuesta inmune del huésped de manera no específica. La selección de un adyuvante depende del sujeto que va a ser vacunado. Preferiblemente, se utiliza un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una vacuna para un humano debería evitar adyuvantes de emulsión oleosos o hidrocarbonados, incluyendo adyuvantes de Freund completos e incompletos. Un ejemplo de un adyuvante adecuado para uso con humanos es alum (gel de alúmina). Una vacuna para un animal, sin embargo, puede contener adyuvantes no apropiados para uso con humanos.

Se contempla que una respuesta inmune puede ser disparada a través de la presentación de una proteína o péptido capaces de disparar tal respuesta. En una realización, el antígeno es un epítipo llave, el cual da lugar a una fuerte respuesta inmune a un agente particular de una enfermedad infecciosa, esto es, un epítipo inmunodominante. Si se desea, puede incluirse más de un antígeno o epítipo en la composición inmunogénica con el fin de incrementar la probabilidad de una respuesta inmune.

En una realización, se incorporan múltiples epítopos de polipéptido en una película LBL de uso en la invención. Los epítopos distinguibles pueden ser sintetizados o expresados dentro de una molécula de péptido diseñada individual. Se espera que la colocación de epítopos múltiples dentro de un péptido diseñado individual tenga ciertas ventajas. Por ejemplo debería simplificar el proceso de fabricación de LBL e incrementar la reproducibilidad. Adicionalmente, la colocación de epítopos múltiples dentro de un péptido diseñado individual asegurará las relaciones molares de los distintos epítopos en una relación deseada, por ejemplo 1:1.

Alternativamente, los epítopos pueden ser incorporados en péptidos diseñados separados. Los péptidos diseñados son incorporados en una película de LBL durante una o más etapas de formación de capas. La fabricación de películas utilizando múltiples péptidos diseñados distintos puede presentar también ciertas ventajas. Simplificaría la síntesis de péptidos diseñados reduciendo los costes. También permite que las dosis relativas de cada péptido diseñado dentro de la película sean variadas y optimizadas. Si, por ejemplo, los datos biológicos preclínicos o clínicos indicaron que una vacuna óptima debería contener cinco copias de un epítipo por cada copia de un segundo epítipo (relación 5:1) la metodología de péptido diseñado del epítipo separado facilitaría la manufactura de tal vacuna.

Los péptidos diseñados se adsorben a la superficie de una película LBL en virtud de la atracción electrostática entre las regiones de adsorción en superficie cargada del péptido diseñado y la superficie con carga opuesta de la película. La eficiencia de la adsorción dependerá de la composición de las regiones de adsorción en superficie. Los péptidos así diseñados con diferentes epítopos pero se adsorberán en regiones de adsorción en superficie similares con eficiencia similar. Para fabricar una película con dos péptidos diseñados distintos cada uno en una relación molar 1:1 se podrían mezclar los péptidos a esa relación molar y luego depositarlos simultáneamente en esa capa en particular. Alternativamente, se podría depositar cada péptido individualmente en capas separadas. La relación molar de péptidos adsorbidos reflejará largamente aquellas concentraciones relativas en las cuales fueron conformados en la capa o el número de etapas de formación de capa durante las cuales fueron incorporados.

La cantidad de péptidos diseñados incorporados en una película LBL puede medirse en una variedad de maneras. El análisis cuantitativo de aminoácidos (AAA) es particularmente bien apropiado para este propósito. Las películas que contienen péptidos diseñados son descompuestas en sus aminoácidos constituyentes por tratamiento con ácido clorhídrico concentrado (6 M) y calentamiento, típicamente a 115°C durante 15 horas. Las cantidades de cada aminoácido son medidas entonces utilizando técnicas cromatográficas bien conocidas por los experimentados en el arte. Los aminoácidos que se presentan en solamente uno de los péptidos diseñados en una película pueden ser utilizados como trazadores para ese péptido. Cuando los péptidos diseñados carecen de aminoácidos únicos, pueden incorporarse aminoácidos no naturales (por ejemplo ácido aminobutírico u homovalina) en los péptidos diseñados durante la síntesis. Estos aminoácidos trazadores son fácilmente identificados durante el experimento de AAA y pueden ser utilizados para cuantificar la cantidad de péptido en la película.

Tal como se utiliza aquí, una respuesta a células T específica es una respuesta que es específica a un epítipo de

interés, específicamente un epítipo de polipéptido.

Tal como se utiliza aquí, una respuesta de anticuerpo específica es una respuesta que es específica a un epítipo de interés, específicamente un epítipo de polipéptido como se divulga aquí.

5 Tal como se utiliza aquí, "capa" indica un incremento en espesor, por ejemplo, sobre un patrón para formación de película, después de una etapa de adsorción. "Capas múltiples" significa múltiples incrementos de espesor (esto es, dos o más). Una "película de capas múltiples con polielectrolitos" es una película que comprende uno o más incrementos de espesor de polielectrolitos. Después de la deposición, las capas de una película de capas múltiples no permanecerán como capas discretas. En efecto, es posible que haya un intercalamiento significativo de especies, particularmente en las interfaces de incremento del espesor. El intercalamiento, o la ausencia del mismo pueden ser
10 monitorizados por técnicas analíticas tales como mediciones de potencial ζ , espectroscopía de fotoelectrones por rayos X, y espectrometría de masas de ion secundario con tiempo de vuelo.

"Aminoácidos" significa un bloque constitutivo de un polipéptido. Tal como se utiliza aquí, "aminoácidos" incluye los 20 L-aminoácidos de origen natural comunes, todos los otros aminoácidos naturales, todos los aminoácidos no naturales, y todos los imitadores de aminoácidos, por ejemplo, peptoides.

15 "Aminoácidos de origen natural" indica glicina más los 20 L-aminoácidos de origen natural, que son alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, metionina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, glutamina, arginina, lisina, histidina, fenilalanina, ornitina, tirosina, triptófano y prolina.

"Aminoácido no natural" significa un aminoácido diferente a los 20 L-aminoácidos de origen natural comunes. Un aminoácido no natural puede tener cualquier estereoquímica L- o D-.

20 "Peptoide" o glicina N-sustituida, significa un análogo del monómero de aminoácido correspondiente, con la misma cadena lateral que el aminoácido correspondiente pero con la cadena lateral unida al átomo de nitrógeno del grupo amino más que a los carbonos α del residuo. Consecuentemente, los enlaces químicos entre los monómeros en un polipeptoide no son enlaces peptídicos, lo cual puede ser útil para limitar la digestión proteolítica.

25 "Secuencia de aminoácido" y "secuencia" significa una longitud contigua de una cadena de polipéptidos que tiene al menos dos residuos de aminoácidos de longitud.

"Residuos" significa un aminoácido en un polímero u oligómero; es el residuo de un monómero de aminoácido a partir del cual se formó el polímero. La síntesis de polipéptidos involucra deshidratación, esto es una molécula de agua individual es "pérdida" por adición del aminoácido a una cadena polipeptídica.

30 Tal como se utiliza aquí "péptido" y "polipéptido" se refiere a una serie de aminoácidos conectados uno al otro por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y alfa-carboxi de aminoácidos adyacentes, y puede contener o estar libre de modificaciones tales como glicosilación, oxidación de cadena lateral, o fosforilación, con la condición de que tales modificaciones, o la carencia de las mismas, no destruya la inmunogenicidad. Tal como se utiliza aquí, el término "péptido" pretende referirse tanto a un péptido como a un polipéptido o proteína.

35 "Polipéptido diseñado" significa un polipéptido que tiene carga suficiente para enlazamiento estable a una superficie con carga opuesta, esto es, un polipéptido que puede ser depositado en una capa de una película con capas múltiples en donde la fuerza de impulso para la formación de película es electrostática. En realizaciones específicas, un polipéptido diseñado tiene al menos 15 aminoácidos de longitud y la magnitud de la carga neta por residuo del polipéptido es mayor que o igual a 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 o 0.5 a pH 7.0. En una realización, la relación del número de residuos cargados de la misma polaridad menos el número de residuos de la polaridad opuesta al número total de
40 residuos en el polipéptido es mayor de o igual a 0.5 a pH 7.0. En otras palabras, la magnitud de la carga neta por residuo de polipéptidos es mayor que o igual a 0.5. Mientras que no hay un límite superior absoluto referente a la longitud de polipéptido, en general, los polipéptidos diseñados adecuados para la deposición en LBL tiene un límite de longitud superior práctico de 1000 residuos. Los polipéptidos diseñados pueden incluir secuencias encontradas en la naturaleza tales como epítipos de polipéptidos así como regiones que proveen funcionalidad a los péptidos
45 tales como regiones cargadas también denominadas aquí como regiones de adsorción en superficie, las cuales permiten que los polipéptidos diseñados sean depositados sobre una película de capas múltiples de polipéptido.

"Estructura primaria" significa la secuencia lineal contigua de aminoácidos en una cadena de polipéptidos, y "estructuras secundarias" significa los tipos más o menos regulares de estructura en una cadena de polipéptidos estabilizados por interacciones no covalentes, usualmente puentes de hidrógeno. Ejemplos de estructuras
50 secundaria incluyen la hélice α , lámina β y giro β .

"Película de capas múltiples de polipéptido" significa una película que comprende uno o más polipéptidos diseñados como se definió más arriba. Por ejemplo, una película de capas múltiples de polipéptido comprende una primera

capa que comprende un polipéptido diseñado y una segunda capa que comprende un polipéptido que tiene una carga neta de polaridad opuesta al polipéptido diseñado. Por ejemplo, si la primera capa tiene una carga positiva neta, la segunda capa tiene una carga negativa neta; y si la primera capa tiene una carga negativa neta, la segunda capa tiene una carga positiva neta. La segunda capa comprende otro polipéptido diseñado u otro polielectrolito.

5 “Sustrato” significa un material sólido con una superficie adecuada para la adsorción de polielectrolitos a partir de solución acuosa. La superficie de un sustrato puede tener esencialmente cualquier forma, por ejemplo, plana, esférica, en forma de barra, etc. Una superficie de sustrato puede ser regular o irregular. Un sustrato puede ser un cristal. Un sustrato puede ser una molécula bioactiva. Los sustratos varían en tamaño desde nanoescala hasta macroescala. Además, un sustrato comprende opcionalmente varias subpartículas pequeñas. Un sustrato puede ser
10 hecho de material orgánico, material inorgánico, material bioactivo, o una combinación de los mismos. Ejemplos no limitantes de sustratos incluye galletas de silicio, partículas coloidales cargadas, por ejemplo, micropartículas de CaCO₃ o de melanina formaldehído; células biológicas tales como eritrocitos, hepatocitos, células bacterianas, o células de levadura; redes poliméricas orgánicas, por ejemplo, redes de copolímeros de poliestireno o estireno; liposomas; organelas; y virus. En una realización un sustrato es un dispositivo médico que es un marcador de paso
15 artificial, un implante coclear, o una cánula endoluminal.

Cuando un sustrato es desintegrado de alguna otra manera removido durante o después de la formación de película, se denomina “una plantilla” (para la formación de película). Las partículas de plantilla pueden ser disueltas en solventes apropiadas o eliminadas por tratamiento térmico, por ejemplo, se utilizan partículas de plantilla de melanina-formaldehído parcialmente entrecruzadas, la platilla puede ser desintegrada por métodos químicos moderados, por ejemplo, en DMSO, o por cualquier cambio en el valor del pH. Después de la disolución de las partículas de platilla, permanecerán las carcacas de capas múltiples huecas que están compuestas de capas de polielectrolitos alternantes.

Una “cápsula” es una película de polielectrolitos en la forma de una carcaca hueca o un recubrimiento que circunda un núcleo. El núcleo comprende una variedad de diferentes encapsulantes, por ejemplo, una proteína, un fármaco, o una combinación de los mismos. Las cápsulas con diámetros menores de 1 μm se denominan como nanocápsulas. Las cápsulas con diámetros mayores de aproximadamente 1 μm se denominan como microcápsulas.

“Entrecruzamiento” significa la formación de un enlace, o varios enlaces, o muchos enlaces covalentes entre dos o más moléculas.

30 “Molécula bioactiva” significa una molécula, macromolécula o ensamblaje macromolecular que tiene un efecto biológico. El efecto biológico específico puede ser medido en un ensayo adecuado y normalizando por unidad de peso o por molécula de la molécula bioactiva. Una molécula bioactiva puede ser encapsulada, retenida tras de, o encapsulada dentro de una película de polielectrolitos. Ejemplos no limitantes de una molécula bioactiva son un fármaco, un cristal de un fármaco, una proteína, un fragmento funcional de una proteína, un complejo de proteínas, una lipoproteína, un oligopéptido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un ribosoma, un agente terapéutico activo,
35 un fosfolípido, un polisacárido, un lipopolisacárido. Tal como se utiliza aquí, “molécula bioactiva” abarca adicionalmente estructuras biológicamente activas, tales como, por ejemplo, un fragmento de membrana funcional, una estructura de membrana, un virus, un patógeno, una célula, un agregado de células, o una organela. Ejemplos de una proteína que puede ser encapsulada o retenida detrás de una película de polipéptidos son hemoglobina; enzimas tales como por ejemplo glucosa oxidasa, ureasa, lisozima y similares; proteínas de matriz extracelular, por ejemplo, fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno; y un anticuerpo. Ejemplos de una célula que puede ser
40 encapsulada o retenida tras una película de polielectrolitos son una célula isleta trasplantada, una célula eucariota, una célula bacteriana, una célula vegetal, y una célula de levadura.

“Biocompatible” significa no producir un efecto sustancial adverso sobre la salud por ingestión oral, aplicación tópica, aplicación transdérmica, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inhalación, implantación, o inyección intravenosa. Por ejemplo, películas biocompatibles incluyen aquellas que no producen una respuesta inmune sustancial cuando entran en contacto con el sistema inmune de, por ejemplo, un ser humano.

“Respuesta inmune” significa la respuesta del sistema inmune celular o humoral a la presencia de una sustancia en cualquier lugar del cuerpo. Una respuesta inmune puede ser caracterizada en una serie de maneras, por ejemplo, mediante un incremento en la corriente sanguínea del número de anticuerpos que reconocen un cierto antígeno. Los anticuerpos son proteínas secretadas por las células B, y un inmunógeno es una entidad que dispara una respuesta inmune. El cuerpo humano lucha contra la infección e inhibe la reinfección incrementando el número de anticuerpos en la corriente sanguínea y en todas partes.

“Antígeno” significa una sustancia extraña que dispara una respuesta inmune (por ejemplo, la producción de moléculas de anticuerpo específico) cuando se introduce en los tejidos de un organismo vertebrado susceptible. Un antígeno contiene uno o más epítopos. El antígeno puede ser una sustancia pura, una mezcla de sustancias (incluyendo células o fragmentos de células). El término antígeno incluye un determinante antigénico adecuado, un autoantígeno, un antígeno mismo, un antígeno de reacción cruzada, un haloantígeno, un tolerógeno, un

alérgeno, un hapteno y un inmunógeno, o partes de los mismos, y combinaciones de los mismos, y estos términos se utilizan indistintamente. Los antígenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son polipéptidos. Los antígenos que disparan respuestas inmunes fuertes se conocen como fuertemente inmunogénicos. El sitio de un antígeno al cual puede enlazarse específicamente un anticuerpo complementario se denomina epítipo o determinante antigénico.

“Antigénico” se refiere a la capacidad de una composición para dar lugar a anticuerpos específicos para la composición o para dar lugar a una respuesta inmune mediada por células.

Tal como se utilizan aquí, los términos “epítipos” y “determinante antigénico” se utilizan indistintamente e indican la estructura o secuencia de un antígeno, por ejemplo, una proteína o un péptido diseñado, que es reconocida por un anticuerpo. Ordinariamente un epítipo estará sobre la superficie de una proteína. Un “epítipo continuo” es aquel que involucra varios residuos de aminoácidos contiguos, no aquel que involucra residuos de aminoácidos que pueden estar en contacto o en la región limitada de espacio en una proteína plegada. Un “epítipo conformacional” involucra residuos de aminoácidos de diferentes posiciones de la secuencia lineal de una proteína que entran en contacto en la estructura tridimensional de la proteína. Para que ocurra una interacción eficiente entre el antígeno y el anticuerpo, el epítipo debe estar fácilmente disponible para enlazamiento. Así, el epítipo o determinantes antigénicos están presentes en el ambiente celular natural del antígeno, o son expuestos solamente cuando se desnaturalizan. En su forma natural pueden ser citoplasmáticos (solubles), asociados a la membrana o secretados. El número, localización y tamaño de los epítipos dependerá de cuánto se presenta el antígeno durante el proceso de confección del anticuerpo.

Tal como se utiliza aquí, una “composición de vacuna es una composición que dispara una respuesta inmune en un mamífero al cual se administra y que protege el organismo inmunizado contra el ataque subsecuente por el agente inmunizante o un agente de reacción cruzada inmunológicamente. La protección puede ser completa o parcial con respecto a la reducción en síntomas o infección en comparación con un organismo no vacunado. Un agente de reacción cruzada inmunológicamente puede ser, por ejemplo, la proteína completa (por ejemplo, glucosiltransferasa) de la cual se ha derivado un péptido subunidad para uso como inmunógeno. Alternativamente, un agente de reacción cruzada inmunológicamente puede ser una proteína diferente, la cual es reconocida en total o en parte por anticuerpos disparados por el agente inmunizante.

Tal como se utiliza aquí una “composición inmunogénica” prevé abarcar una composición que dispara una respuesta inmune en un organismo al cual se administra y la cual puede o puede no proteger el mamífero inmunizado contra el ataque subsecuente con el agente inmunizante. En una realización, una composición inmunogénica es una composición de vacuna.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Protocolos de prueba

Ratones e inmunizaciones: Se obtuvieron C57BL/6J hembra, de 6-8 semanas de edad de Jackson Laboratories y se alojaron en NorthEast Life Sciences, New Haven. Los ratones fueron aclimatados al ambiente durante al menos una semana antes de su uso. Se resuspendieron micropartículas en PBS hasta la concentración DP deseada (por ejemplo, 10 µg/100 µl/inyección) y se sometieron a sonicación durante 10 minutos inmediatamente antes de cargar la jeringa e inmunizar. Los ratones fueron inmunizados con la suspensión en la almohadilla de la pata posterior (f.p.) en los días 0, 21 y 42. Los ratones con control positivo fueron inmunizados subcutáneamente (s.c.) con el péptido diseñado (DP) en adyuvante de Freund completo (CFA) en el día 0 o adyuvante de Freund incompleto (IFA) en los días 21 y 42; los ratones de control negativo fueron inmunizados en falso con PBS.

ELISA: Los ratones fueron sangrados en los días 28 (después del primer refuerzo), 49 (después del segundo refuerzo) y 58 (postataque) y los sueros fueron recolectados para análisis de las respuestas anticuerpo utilizando placas de ELISA recubiertos con el péptido T1B. El enlazamiento al anticuerpo fue detectado con IgG antirratón de cabra marcado con HRP.

ELISPOT: Los ratones fueron sacrificados en el día 28, y los bazoos fueron recolectados y sumergidos en suspensiones de células individuales. Las células de bazo no fraccionadas fueron estimuladas con el péptido del epítipo mínimo indicado en placas con IFN γ o IL-5 ELISPOT utilizando reactivos (BD Biosciences) y placas (Millipore Corporation) comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante. El número de manchas sobre cada placa fue contado en un AID Viruspot Reader.

Ataque con PfPb: Los ratones C57BL/6J fueron inmunizados como se describió más arriba. En el día 56 los ratones recibieron ataque con PfPb (*Plasmodium berghei* transfectado con el gen CS de *P. falciparum*). El ataque fue

logrado anestesiando el ratón y permitiendo que mosquitos infectados con PfPb se alimentaran con ellos durante 10 minutos. Dos días después del ataque, los ratones atacados fueron sangrados y sacrificados, y se extrajo el ARN del hígado para análisis de la carga parasitaria por qPCR.

5 Ensayo de neutralización de esporozoitos transgénicos (TSNA): La actividad neutralizadora de parásitos de los sueros en el TSNA fue llevada a cabo por métodos conocidos en el arte. En resumen, se incubó una dilución 1:5 de cada muestra de suero con parásitos PfPb (*Plasmodium bergheii* transfectado con el gen CS de *P. falciparum*) durante 40 minutos sobre hielo. Las mezclas fueron agregadas a pozos que contenían células HepG2 y se incubaron a 37°C durante 72 horas. Los niveles de ARN 18S del parásito en cada cultivo fueron medidos qPCR y comparados con una curva estándar generada con cantidades conocidas del plásmido de ADNc 18S. La inhibición porcentual del crecimiento de los parásitos fue calculada por comparación con los pozos de control que contenían PfPb y células HepG2 sin suero.

15 Aislamiento de ARN y qPCR: Aproximadamente 40 horas después del ataque, se sacrificaron los ratones y se recolectaron los hígados y se lavaron dos veces con 10 ml de PBS estéril. Los hígados fueron homogenizados en 10 ml de TriReagent (Molecular Research Center, cat# TR118) utilizando un homogenizador politron (Fisher Scientific PowerGen 500) durante 1 minuto en el parámetro más alto. Los homogenizados fueron sometidos a vórtex durante 2 minutos y se dejaron asentar a temperatura ambiente durante 10 minutos. El homogenizado claro fue recolectado en tubos Eppendorf estériles a los cuales se agregaron 200 µl de cloroformo (Sigma C-0549). Las muestras fueron sometidas a vórtex durante 2 minutos, se dejaron asentar a temperatura ambiente durante 15 minutos, y luego se centrifugaron a 14.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa (450 µl) fue recolectada en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml a los cuales se agregó un volumen igual de isopropanol (Sigma 405-7). Las muestras fueron sometidas a vórtex durante 10 segundos, se dejaron asentar a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se centrifugaron a 14.000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sobrenadante fue decantado y la pella fue lavada con 1 ml de EtOH al 70% (Sigma E7023), se sometió a vórtex durante 10 segundos, y se centrifugó a 14.000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sobrenadante fue decantado y la pella fue secada a temperatura ambiente. Las pellas secas fueron resuspendidas en 200 µl de DEPC H₂O (Invitrogen cat# 750023) para el qPCR.

20 El ARN también fue aislado del homogeneizado TriReagent utilizando el protocolo Qiagen RNeasy MiniPrep (Qiagen), y se convirtió a ADNc utilizando iScript RT Supermix (Bio-Rad), cada uno de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se llevó a cabo la PCR sobre un CFX96 (Bio-Rad) para determinar el número de copias de ARNr 18S de *P. bergei* en el tejido del hígado. Las secuencias de cebador usadas fueron:

30 de avance 5'-AAGCATTAATAAAGCGAATACCTTAC-3' (SEQ ID NO: 4)

reversa 5'-GGAGATTGGTTTTGACGTTTATGTG-3' (SEQ ID NO: 5)

35 Las condiciones de ciclización utilizando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) fueron: 95°C durante 3 minutos, luego [95°C durante 20 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos] repetido 40 veces. Para determinar el número de copias, se utilizó un plásmido de concentración conocida que contenía la secuencia de ARNr 18S de *P. bergei* (NYU) para construir una curva estándar.

Ejemplo 1: Inmunogenicidad de Pam3Cys. Micropartículas de T1B de malaria.

Se sintetizó una serie de DP que contenía diversas configuraciones de T1B (véase Tabla 1). Las secuencias de los antígenos de proteínas de T1 y circumesporozoito de *B Plasmodium falciparum* se dan a continuación:

40 T1:DPNANPNVDPNANPNV (SEQ ID NO: 1)

B: NANP (SEQ ID NO: 2)

45 Se obtuvieron núcleos de CaCO₃ de PlasmaChem GmbH, Alemania (3 µm, mesoporosos, esféricos). Se obtuvieron PLL y PGA de Sigma-Aldrich, Estados Unidos. PLL, PGA y ACT-2062 (T1BT*K₂₀Y: DPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANPEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTSGNGKKKK KKKKKKKKKKKKKKKY (SEQ ID NO: 6)) fueron disueltos en HEPES 10 mM, pH 7.4. Se fabricaron partículas de LbL esencialmente como se describió para las nanopartículas de LbL (Powell et al. 2011. Vaccine 29:558). Después de ensamblar las 7 capas de base con PGA y PLL, la película fue entrecruzada utilizando EDC 200 mM y sulfo-NHS 50 mM en regulador de fosfato 200 mM, pH 6.5. Las partículas fueron lavadas dos veces con regulador HEPES 10 mM para eliminar cualquier reactivo residual. La DP (ACT-2062, SEQ ID NO: 6) fue agregada en la 8ª capa para generar la micropartícula ACT-1141. Las partículas maduras fueron lavadas y almacenadas como pellas húmedas a 4°C o temperatura ambiente hasta el uso.

50 El terminal N de DP-2163 (T1₃B₅ Pf) fue extendido utilizando síntesis en fase de solución agregando un espaciador

de serina-lisina-lisina-lisina-lisina seguido por un acoplamiento en el terminal N de un residuo de cisteína modificado con Pam3, incorporando así el ligando Pam3Cys de TLR2 para generar DP-2167 (Pam3.T13B5Pf).

Tabla 3: Lista de micropartículas

| Partícula # | DP # | Epítos y fuente | Secuencia |
|-------------------------|---------|-----------------|-------------------|
| MP-1140 MP-1141 MC-1142 | DP-2062 | T1BT* Pf | SEQ ID NO: 6 |
| MP-1167 | DP-2163 | T13B5 Pf | SEQ ID NO: 7 |
| MP-1164 | DP-2167 | Pam3.T13B5Pf | Pam3-SEQ ID NO: 7 |

5 SEQ ID NO: 7 (SKKKK(NANPNVDP)₃(NANP)₅K₂₀Y)

SKKKKNANPNVDPNANPNVDPNANPNVDPNANPNANPNANPNANPNANPNANPKKKKK
 KKKKKKKKKKKKKKKKY

Se inmunizaron ratones C57BL/6 con MP-1141, MP-1167, o MP-1164; se incluyeron ratones inmunizados con PBS o con DP-2062 (T1BT* (SEQ ID N: 6)) en CFA como controles negativo y positivo, respectivamente. El análisis por ELISA de los sueros recolectados en el día 28 muestra que MP-1164 que contiene el DP modificado con Pam₃Cys era comparable al control positivo DP-2062 (T1BT*) en adyuvante de Freund y estadísticamente más potente que MP-1167 que contenía el mismo DP sin Pam₃Cys (P=0.02, prueba de suma de Rank de Wilcoxon) (Figura 1). El MP-1164 produjo también un perfil de isotipo de anticuerpo idéntico al del grupo de control positivo, incluyendo el isotipo IgG2 asociado con Th1 que fue inducido mínimamente por MP-1167 o MP-1141 (Figura 2), cada uno de los cuales carece de Pam₃Cys. El MP-1164 modificado con Pam₃Cys fue eficaz como péptido DP 2062/grupo de control positivo CFA, protegiendo 90% de los ratones de infección en la etapa hepática (Figura 3). La protección se correlacionó con la neutralización del anticuerpo más fuertemente en el grupo MP-1164 (datos no mostrados), modestamente en el grupo MP-1141 (datos no mostrados), y débilmente en el grupo MP-1167 (datos no mostrados). Así, una modificación con Pam₃Cys simple de DP produjo y mejoro la vacuna LbL que dispara respuestas a anticuerpos más potentes y provee mayor nivel de protección frente al ataque por parásitos.

20 **Ejemplo 2:** Síntesis de péptidos diseñados de Pam₃Cys

Los péptidos diseñados que contenían secuencias antigénicas de la proteína de circumesporozoitos de malaria (*P. falciparum*) fueron sintetizadas por síntesis de péptidos en fase sólida paso a paso utilizando un sintetizador automatizado Liberty™ (CEM, Matthews, NC) con control de temperatura por microondas. Se usaron una resina de amida poliestireno Rink de carga baja (0.10 mmol), aminoácidos Fmoc estándar, activación por HBTU/DIEA, y acoplamiento doble de rutina. Después de la síntesis automatizada del 20% de la resina (0.02 mmol) fue desprotegida con Fmoc y tratada con una solución recién preparada de 30 mg de Pam3Cys-OH (0.032 mmol, Bachem Bioscience cat.# F.2630), 12 mg de HBTU, 8 uL de DIEA, en aproximadamente 1.5 mL de DCM/DMF al 20%. La suspensión fue agitada durante 4 horas, la resina fue filtrada y bien lavada, y el acoplamiento del Pam3Cys confirmado por ensayo cuantitativo con ninhidrina. La resina fue secada bajo vacío y el péptido fue escindido por tratamiento con TFA/triisopropilsilano/fenol/3,6-dioxo-1,8-octanodiol/agua (86:4:4:3:3) durante dos horas. El péptido crudo fue precipitado con éter y luego purificado por HPLC en fase reversa en C₄ utilizando un gradiente de agua (ácido trifluoroacético al 0.1%)/isopropanol. La identidad del péptido purificado fue confirmada por espectrometría de masas con electroaspersión (ESMS). Calculado (promedio) MW=8683.4 g/mol, encontrado MW=8682.1 g/mol.

Ejemplo 3: Fabricación de vacuna ACT-1164 de micropartículas para malaria (Pam₃-SEQ ID NO: 7)

Se prepararon en el momento soluciones de reserva de 1.0 mg/mL (p/v) de ácido poli-L-glutámico, sal de sodio, sal de HBr de poli-L-lisina, y poli-L-lisina marcada con FITC en regulador HEPES 10 mM pH 7. Se suspendieron 180 mg de micropartículas de carbonato de calcio (CaCO₃, PlasmaChem GmbH) en 3.0 mL de solución de PGA y se sometieron exhaustivamente a vórtex. La mezcla fue sacudida durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugada (2000 g durante 2 minutos), aspirada, lavada con regulador HEPES 10 mM para eliminar polímeros no enlazados, centrifugada de nuevo y aspirada. Las partículas fueron resuspendidas 3.0 mL de solución de PLL-FITC, sacudidas durante 10 minutos, luego centrifugadas y lavadas como se hizo anteriormente. Estas etapas fueron repetidas cinco veces más alternativamente utilizando soluciones de PGA y PLL hasta que se ensambló un total de siete capas sobre las partículas. Las partículas fueron suspendidas en 3.0 mL de HEPES que contenía 1.5 mg del péptido ACT-2167 diseñado. La mezcla fue sacudida durante 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugada y lavada dos veces. La cantidad total del péptido diseñado depositada fue medida por análisis de aminoácidos y se

encontró que era de 0.99 mg (66% de eficiencia). Las partículas fueron examinadas por microscopia con fluorescencia y se encontró que estaban bien dispersadas (datos no mostrados). Las partículas fueron almacenadas a 4°C como pellas húmedas durante 30 días. Alternativamente, las partículas fueron suspendidas a 30 mg/mL en manitol al 5% y carboximetilcelulosa al 0.2%, congeladas de forma instantánea en nitrógeno líquido, liofilizadas durante la noche a temperatura ambiente, y luego almacenadas a 4°C por hasta 12 meses.

Ejemplo 4: Síntesis alternativa de péptido diseñado que contenía Pam₂Cys

Se sintetiza un péptido diseñado sobre una resina en fase sólida como se describió en el Ejemplo 2. La resina desprotegida en terminal N (0.020 mol) es tratada con una solución preparada de 29 mg de Fmoc-Pam₂Cys-OH (0.032 mmol, Bachem Bioscience cat. # B-3760), 12 mg de HBTU, 8 uL de DIEA, en aproximadamente 1.5 mL de DCM/DMF al 20%. La suspensión es agitada durante 4 horas, la resina es filtrada y bien lavada, y el acoplamiento del Fmoc-Pam₂Cys es confirmado por ensayo cualitativo con ninhidrina. La resina es desprotegida en terminal N por tratamiento con piperidina al 20% en DMF durante 10 minutos, lavada exhaustivamente y secada bajo vacío. El péptido crudo es obtenido por escisión con TFA y purificado por HPLC en C₄ como se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 5: Incorporación del ligando MPLA de TLR-4 en micropartículas de vacuna de 3 µm

Se ensamblaron micropartículas de vacuna que contenían siete capas de homopolímeros y una capa del péptido diseñado sobre partículas de CaCO₃ de 3 µm como se describió en el Ejemplo 3. Las partículas de vacuna fueron suspendidas a 60 mg/mL en regulador HEPES y se colocaron alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf de 500 µL. Se preparó una solución de reserva de 5.0 mg/mL de lípido A monofosforilado en DMSO puro y se agregaron 0.2 µL o 2.0 µL a una alícuota de 100 µL (concentraciones finales de MPLA de 10 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente). Las partículas fueron sometidas a vórtex y sacudidas durante 20 minutos, centrifugadas y lavadas 3 veces con regulador HEPES. Las partículas fueron resuspendidas en 100 µL y probadas en un ensayo de TLR-4 basado en células. Los resultados mostraron que las partículas recubiertas con MPLA estimularon las células TLR-4 en una forma dependiente de la dosis (Figura 4).

Ejemplo 6: Coprecipitación de CaCO₃ e imiquimod

Una solución de 243 mg de cloruro de calcio deshidratado y 1.0 mg de imiquimod disueltos en 5.0 mL de agua se mezclan bajo agitación rápida con una solución de 137 mg de carbonato de sodio. La agitación se continúa durante 45-60 segundos y las micropartículas de CaCO₃ formadas son recolectadas por centrifugación. La cantidad de imiquimod encapsulado en las partículas se mide disolviendo una alícuota de partículas en HCl 1 M y midiendo la absorbancia en UV de la solución clara resultante a 317 nm.

Ejemplo 7: Incorporación del ligando imiquimod TLR-7 en micropartículas de vacuna de 3 µm

Se prepararon soluciones frescas de PGA y PLL como se describió en el Ejemplo 2. Se suspendieron 9.0 mg de partículas de CaCO₃ de 3 µm en 300 µL de solución de PGA y se balancearon durante 10 minutos. Las partículas fueron centrifugadas, aspiradas, lavadas con regulador HEPES 10 mM, resuspendidas en 300 µL de regulador y se retiraron 25 µL para el ensayo por UV. Se agregaron 6.0 µL de una solución de 5 mg/mL de imiquimod en agua (30 µg) y las partículas fueron sacudidas durante 10 minutos y luego centrifugadas. Se retiró una alícuota (25 µL) de sobrenadante para el ensayo por UV, las partículas fueron lavadas y luego resuspendidas en 275 µL de regulador y se retiró una alícuota (25 µL) para el ensayo por UV. Se agregaron siete capas de homopolímeros (PLL, PGA, PLL, PGA, PLL, PGA, PLL) como se describió en el Ejemplo 3. Las partículas fueron suspendidas en 250 µL de regulador y se retiraron alícuotas de 25 µL para remover el ensayo por UV. Las alícuotas de 25 µL fueron tratadas con 125 µL de HCl 1.0 M para disolver las partículas y se midió la OD a 317 nm de las soluciones resultantes ligeramente turbias en una placa de microtitulación. La absorbancia en UV muestra que la mayor parte del imiquimod soluble se enlazó a las partículas y permaneció enlazado durante las etapas de formación de capas subsecuentes (Figura 5).

Ejemplo 8: Ensayo basado en células HEK-293 para agonistas de TLR4

Un linaje de células HEK-293 transfectado de manera estable con los genes TLR4, MD2 y CD 14 humanos fue obtenido comercialmente y cultivado utilizando las condiciones descritas por el proveedor. Las muestras de partículas y/o estándares solubles de MPLA fueron diluidos en serie en DMEM/FBS al 10%, 100 µl/pozo. Las células transfectantes de TLR4 fueron ajustadas a 2 x 10⁵ células/mL en DMEM/FBS al 10%, se agregaron 100 µl a cada pozo y las células fueron incubadas a 37°C durante la noche. Los sobrenadantes fueron recolectados y la IL-8 secretada fue medida por ELISA en sándwich utilizando el siguiente par de anticuerpo monoclonal coincidente: anticuerpo con recubrimiento de IL-8 diluidos a 2 µg/ml en PBS y anticuerpo biotinilado de detección IL-8 diluido a 0.5 µg/ml en regulador para ELISA. Conjugado Avidina-HRP a dilución 1:1000 en regulador para ELISA y se utilizó sustrato TMB para desarrollar la placa. Después de detener la reacción con H₂SO₄ se leyó la densidad óptica a 450 nm.

Ejemplo 9: Inmunogenicidad y eficacia de Pam3Cys de malaria. T1BT*

Se inmunizaron ratones C57BL/6J, hembra de 6-8 semanas de edad con constructos entrecruzados ACT-1200 (T1BT*, bXL) o ACT-1201 (Pam,Cys.T1BT*, bXL), o constructos no entrecruzados ACT-1198 (T1BT*, nXL) o ACT-1199 (Pam,Cys.T1BT*, nXL) en los días 0, 28 y 42 a través de f.p.. Los constructos se describen en la siguiente tabla:

5

| ACT Partícula # | DP #, descripción y secuencia | Dosis administrada vía f.p. | Número de ratones por grupo |
|-----------------|--|-----------------------------|-----------------------------|
| PBS | - | - | 13 |
| 1198 | 2062, T1BT* nXL, SEQ ID NO: 6 | 10 µg | 13 |
| 1199 | 2149, Pam3cys. T1BT* nXL, SEQ ID NO: 7 | 10 µg | 13 |
| 1200 | 2062, T1BT* bXL, SEQ ID NO: 6 | 11.8 µg | 13 |
| 1201 | 2149, Pam3cys. T1BT* bXL, SEQ ID NO: 7 | 11.8 µg | 13 |

nXL = sin entrecruzamiento; bXL = capas de base entrecruzadas antes de la adición de DP.

Los sueros fueron recolectados en el día 49 para la determinación de los títulos de anticuerpos específicos de T1B por ELISA. Los resultados en la Figura 6 muestran que todos los constructos dispararon respuestas de anticuerpos específicas para T1B. El ACT-1198 sin entrecruzamiento (T1BT*) fue la formulación menos potente. La distribución de isotipos específicos de T1B fue determinada utilizando reactivos para la detección específica de isotipos en ELISA. La Figura 7 muestra que todos los constructos dispararon predominantemente isotipos IgG₁ e IgG_{2b} (asociados a Th2), mientras que ACT-1199 y ACT-1201 dispararon el isotipo IgG_{2c} (asociado con Th1, equivalente a IgG_{2a} en la cepa BALB/c), produciendo un perfil y potencia cercanamente idénticos al inducido por el péptido ACT-2062 en CFA/IFA.

10

En el día 49 las respuestas en células T fueron medidas por ELISPOT. Los ratones inmunizados con todos los constructos excepto ACT-1198 alcanzaron respuestas celulares sacudidas evidenciadas por IFN γ e IL-5 ELISPOT (Figura 8). De manera notable, el ACT-1200 disparó un alto número de células secretoras de IL-5 mientras que el ACT-1201 que contenía Pam3Cys no lo hizo.

15

Estos resultados sugieren que tanto el entrecruzamiento como la inclusión de Pam3Cys incrementa la potencia de las micropartículas, y la combinación de ambas modificaciones en la misma micropartícula dará como resultado mejoras cuantitativas (título de anticuerpos) y cualitativas (isotipo de anticuerpo y fenotipo de células T) en comparación con la micropartícula no modificada

20

El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones debe considerarse que cubre tanto el singular como el plural, al menos que se indique otra cosa aquí o lo contradiga claramente el texto. Los términos primero, segundo, etc., tal como se utilizan aquí no pretenden denotar ningún ordenamiento en particular, sino simplemente por conveniencia denotar una pluralidad de, por ejemplo, capas. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye", y "que contiene" se deben considerar como términos de extremo abierto (esto es, que significan "que incluye, pero no se limita a") a menos que se indique otra cosa. La citación de rangos de valores pretende simplemente servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, al menos que se indique aquí otra cosa, y cada valor separado está incorporado en la especificación como si fuese citado individualmente aquí. Los puntos finales de todos los rangos están incluidos dentro del rango y son combinables independientemente. Todos los métodos descritos aquí pueden ser ejecutados en un orden adecuado a menos que se indique aquí otra cosa o se contradiga claramente de otra manera por el contexto. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o del lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como"), pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reivindique otra cosa. Ninguna expresión en la especificación debería considerarse como indicadora de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención tal como se utiliza aquí.

25

30

35

Listado de secuencias

<110> Artificial Cell Technologies, Inc. Powell, Thomas J Boyd, James G

40

<120> Composiciones antigénicas y métodos

<130> ATE0024US3

5 <150> 61/618021
<151> 2012-03-30

<150> 61/647105
<151> 2012-05-15

<160> 8

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

15

<400> 1

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val
1 5 10 15

20 <210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

25 <400> 2

Asn Ala Asn Pro

1

<210> 3

<211> 20

30 <212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 3

Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro
1 5 10 15

Cys Ser Val Thr
20

35

<210> 4

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Cebador

45 <400> 4

aagcattaa taaagcgaat acatccttac 30

<210> 5

<211> 25

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 5
ggagattggt tttgacgttt atgtg 25

10 <210> 6
<211> 73
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Péptido diseñado

<400> 6

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val
1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Glu Tyr Leu Asn
20 25 30

Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr
35 40 45

Ser Gly Asn Gly Lys Lys
50 55 60

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
65 70

20 <210> 7
<211> 70
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Péptido diseñado

<400> 7

Ser Lys Lys Lys Lys Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn
1 5 10 15

Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn

ES 2 612 357 T3

20

25

30

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn
 35 40 45

Pro Lys
 50 55 60

Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
 65 70

<210> 8

<211> 60

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido diseñado

10 <400> 8

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val
 1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr
 20 25 30

Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 35 40 45

Lys
 50 55 60

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende

Una primera película de capas múltiples que comprende una pluralidad de capas de polielectrolitos con cargas opuestas, en la que una de las capas de polielectrolitos en la película de capas múltiples comprende un primer polielectrolito antigénico, en la que el primer polielectrolito antigénico comprende un epítipo de polipéptido viral, bacteriano, fúngico o de parásito enlazado de manera covalente a un polielectrolito,

en la que la película de capas múltiples comprende un ligando receptor a Toll (ligando TLR) enlazado covalentemente al primer polielectrolito antigénico

en la que el ligando TLR es una lipoproteína o un lipopéptido, y

10 en la que los polielectrolitos en la película de capas múltiples comprenden un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular de más de 1000 Da y al menos 5 cargas por molécula.

2. La composición de la reivindicación 1 en la que el ligando TLR es un lipopéptido diacilo, lipoproteína diacilo, una lipoproteína triacilo o un lipopéptido triacilo.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que el primer polielectrolito antigénico es un polipéptido.

15 4. La composición de la reivindicación 1, en la que la primera película de capas múltiples está depositada sobre una partícula núcleo.

5. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una segunda película de capas múltiples que comprende una pluralidad de capas del polielectrolitos con cargas opuestas, en la que una de las capas en la que la segunda película de capas múltiples comprende un segundo polielectrolito antigénico,

20 en la que el segundo polielectrolito antigénico comprende un epítipo de polipéptido viral, bacteriano, fúngico o de parásitos,

en la que el primero y segundo polielectrolitos antigénicos comprenden diferentes epítipos de polipéptidos del mismo o diferentes organismos.

6. La composición de la reivindicación 5, en la que el primero y segundo polielectrolitos antigénicos son polipéptidos.

25 7. La composición de la reivindicación 6, en la que la primera y segunda capas múltiples son depositadas sobre partículas núcleo.

8. La composición de la reivindicación 1, en donde el ligando receptor similar a Toll enlaza los receptores TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 o TLR9.

30 9. La composición de la reivindicación 1, en donde el ligando TLR es N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína (Pam₃Cys), [S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína] (Pam₂Cys) o una combinación de los mismos.

10. La composición de la reivindicación 1, en la que el primer polielectrolito es un polipéptido y N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)propil]cisteína está enlazada covalentemente al polipéptido.

11. La composición de la reivindicación 1, que comprende dos o más ligandos de receptor similar a Toll diferentes.

35 12. La composición de la reivindicación 1, en la que la película de capas múltiples comprende un polielectrolito de polipéptido y en la que el polipéptido está entrecruzado covalentemente con la película de capas múltiples.

13. La composición de la reivindicación 12, en la que los entrecruzamientos covalentes son enlaces amida que involucran grupos funcionales de cadenas laterales de aminoácidos.

40 14. La composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para uso en un método para disparar una respuesta inmune en un organismo vertebrado que comprende administrar dicha composición al organismo vertebrado.

Figura 1

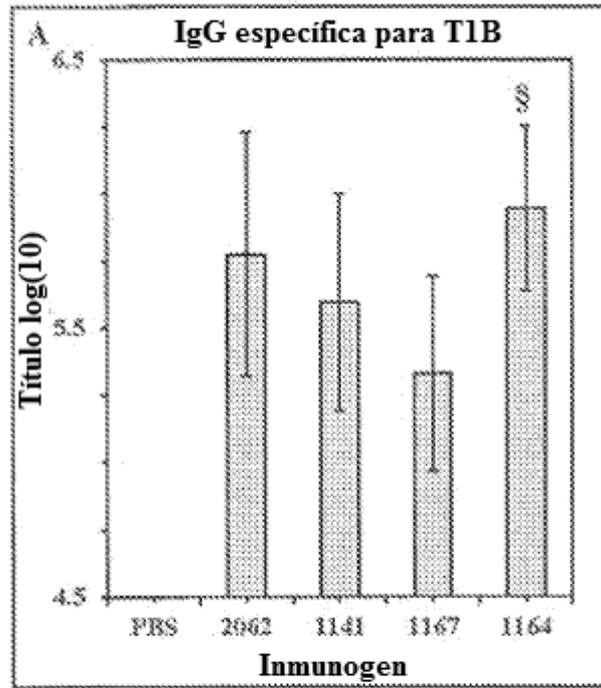


Figura 2

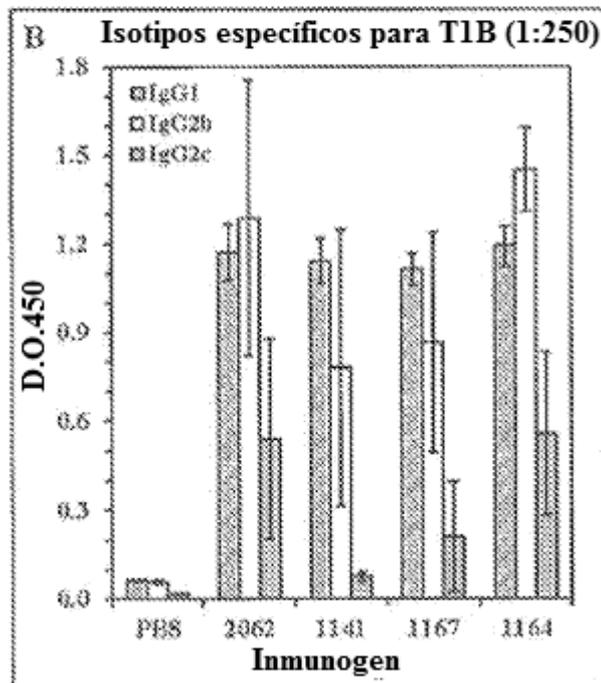


Figura 3

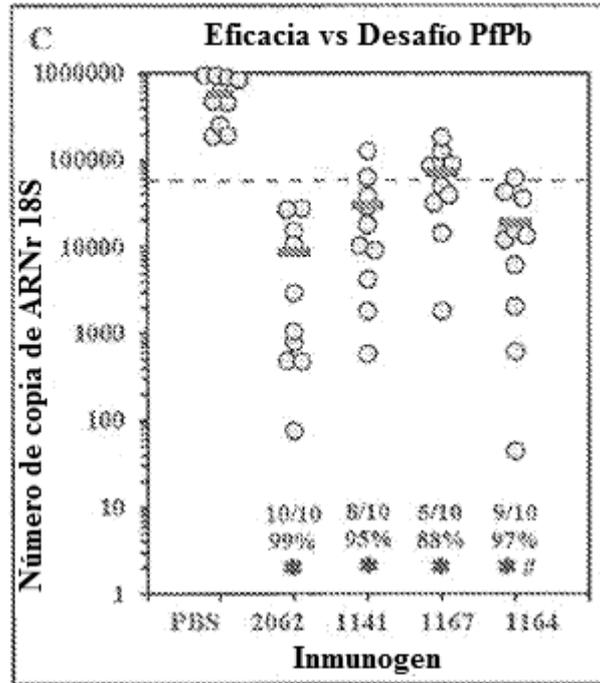


Figura 4

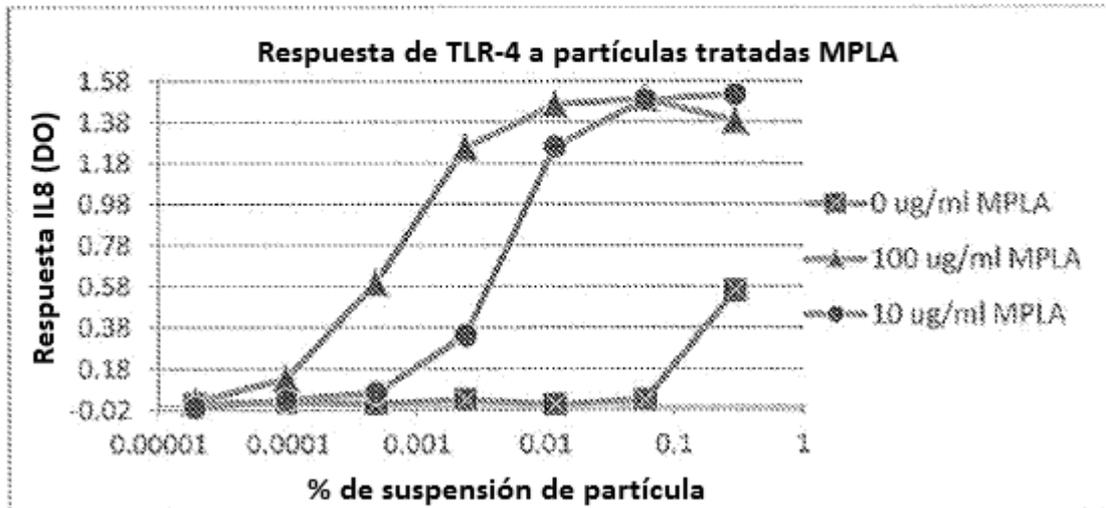


Figura 5

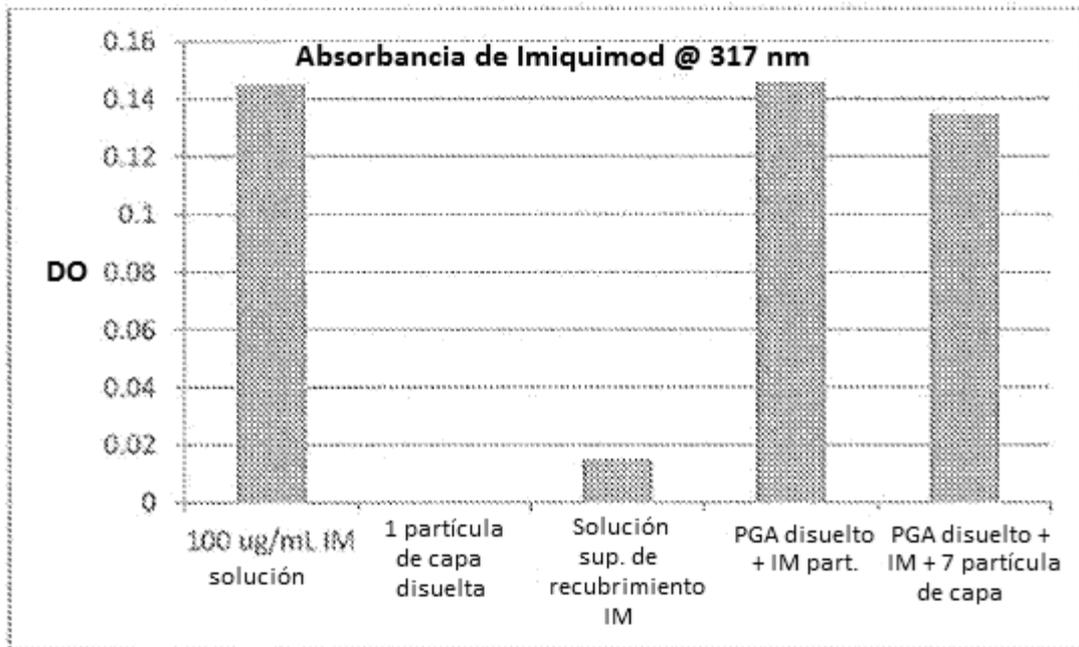


Figura 6

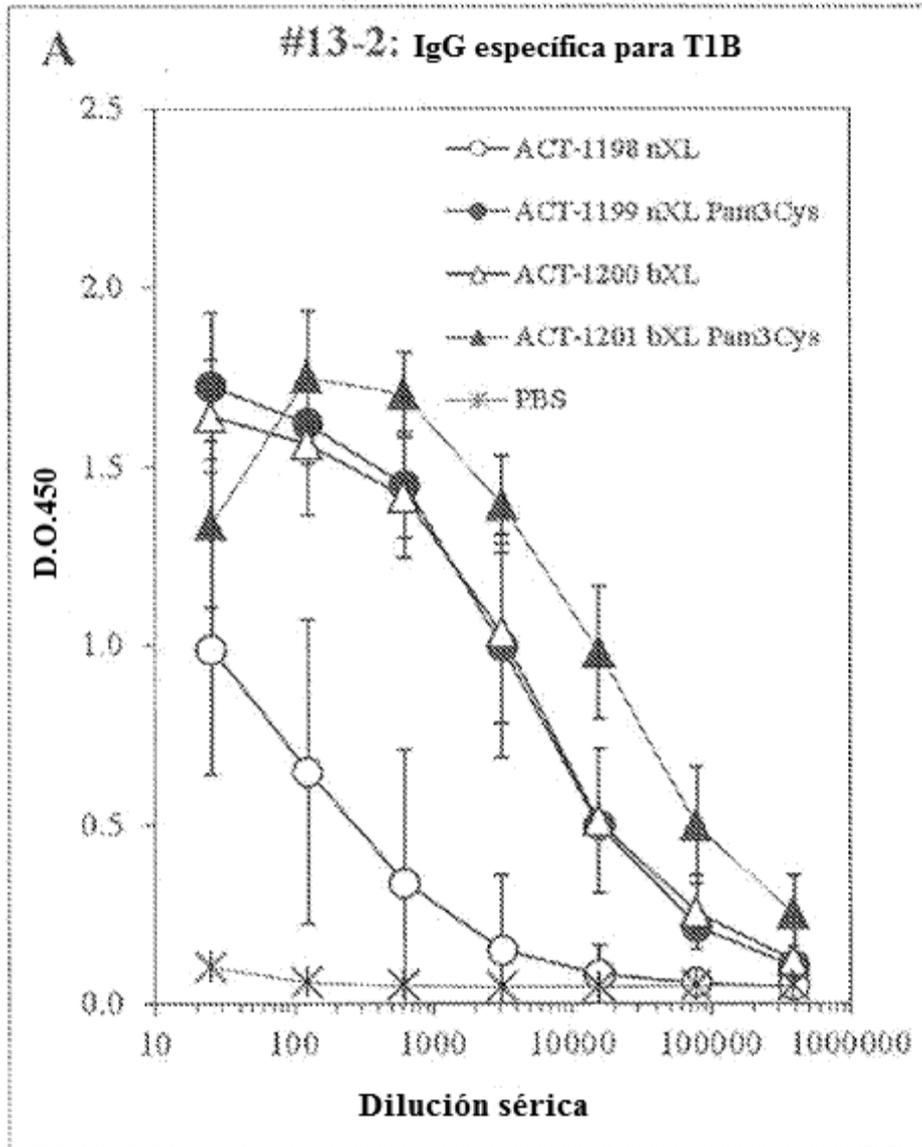


Figura 7

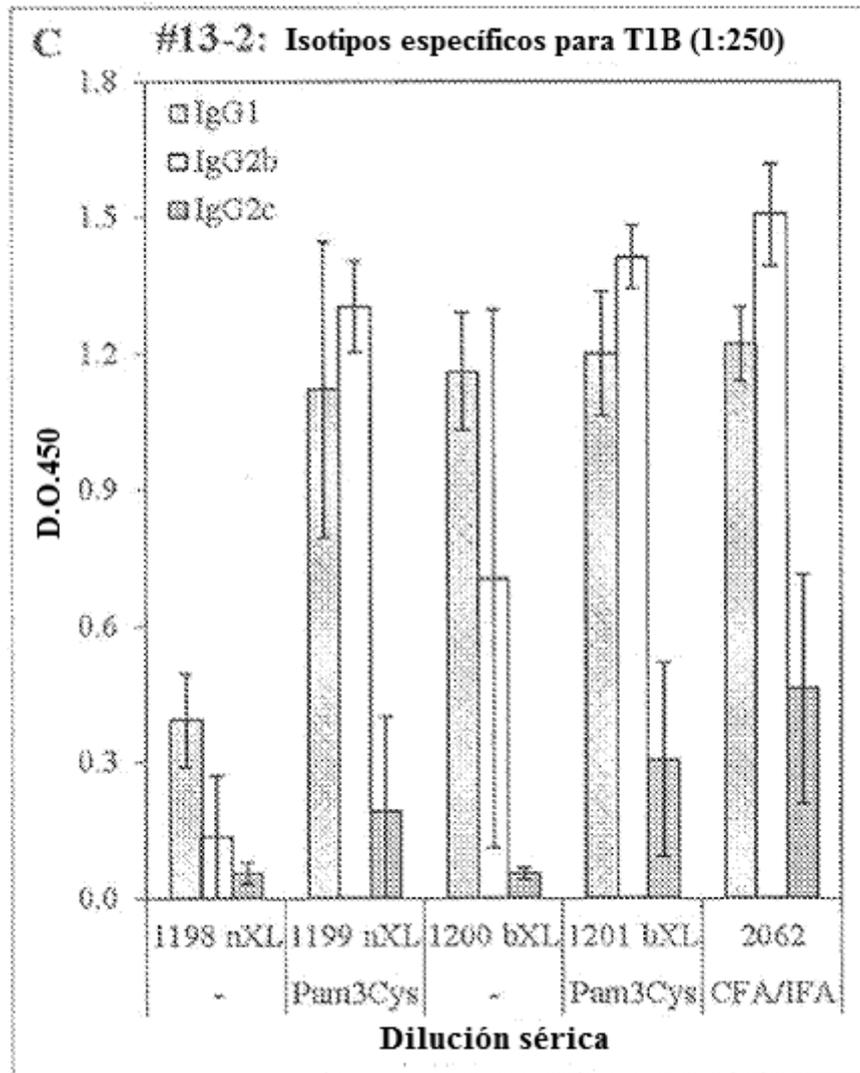


Figura 8

