

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 077**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12	(2006.01)
A61K 39/145	(2006.01)
A61K 39/385	(2006.01)
C07K 14/11	(2006.01)
C07K 14/14	(2006.01)
C07K 14/44	(2006.01)
C12N 7/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2011 PCT/EP2011/054866**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO2011120994**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2011 E 11710794 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2552476**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido que comprende al menos un motivo CXXC y antígenos heterólogos y usos de las mismas**

30 Prioridad:

29.03.2010 EP 10305317

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2017

73 Titular/es:

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS (20.0%)
3, Rue Michel Ange
75016 Paris 16, FR;
UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6) (20.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS (20.0%);
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET) (20.0%) y
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA (UCC) (20.0%)

72 Inventor/es:

KLATZMANN, DAVID;
PIAGGIO, ELIANE y
LUJAN, HUGO

74 Agente/Representante:

PAZ ESPUCHE, Alberto

Observaciones:

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

ES 2 619 077 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 farmacéuticas que comprenden un polipéptido que comprende al menos un motivo CXXC y antígenos heterólogos y usos de las mismas

CAMPO DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, y a métodos de uso de las mismas, para producir, modificar o regular una respuesta inmunitaria en un sujeto.

La presente invención se refiere, más particularmente, a composiciones farmacéuticas que usan un polipéptido que comprende al menos dos motivos CXXC, tales como proteínas de superficie variables (VSP) del parásito *Giardia* o un fragmento de las mismas (por ejemplo el dominio extracelular de una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma) para generar mediante vacunación por vía mucosa u oral una respuesta inmunitaria frente a un antígeno seleccionado heterólogo, tal como antígeno tumoral, antígeno microbiano u otro antígeno.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

Se han propuesto diversas estrategias en la técnica para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto, tales como administración directa de un antígeno, estimulación *ex vivo* y expansión de células inmunitarias (tales como linfocitos T o células dendríticas, por ejemplo), inyección de células cancerosas modificadas química o genéticamente, administración de virus inactivados y terapia génica usando ácidos nucleicos que codifican para citocinas antígenos o particulares.

Aunque estos diversos enfoques permiten la generación de una respuesta inmunitaria frente a determinados tipos de antígenos o agentes patógenos, existe todavía la necesidad de mejores métodos de obtención, regulación o estimulación de una respuesta inmunitaria. En particular, existe la necesidad de métodos simples de generación de respuestas inmunitarias eficaces, tales como respuestas inmunitarias humorales y/o celulares eficaces, frente a una variedad de antígenos, tales como antígenos tumorales, antígenos víricos u otros antígenos de agentes patógenos, más particularmente, mediante administración oral.

De hecho, la mayoría de las vacunas comerciales disponibles hoy en día se administran mediante inyección, con problemas de seguridad, aceptación del paciente y morbilidad y que hacen que la inmunización en masa sea más costosa y menos segura, particularmente en países en desarrollo pobres en recursos. Por tanto, la administración oral ofrece varias ventajas significativas con respecto a otras vías de administración y en comparación notablemente con vacunas parenterales (administración simple y seguridad mejorada). Además, a diferencia de la inmunización sistémica, la administración oral puede inducir respuestas inmunitarias mucosas.

Por tanto, las vacunas administradas por vía oral se procesan y presentan por el sistema inmunitario del tracto digestivo, a menudo denominado tejido linfático asociado al intestino (GALT). El GALT es un sistema complejo que consiste en sitios inductivos (en donde se encuentran los antígenos y se inician las respuestas) y sitios efectores (en donde se producen las respuestas inmunitarias locales) unidos por un sistema de guiado, mediante el que las células activadas por antígeno en el GALT migran a la circulación y, posteriormente, a la mucosa (Lavelle *et al.*; 2006). Como resultado, la vacunación oral puede inducir respuestas inmunitarias localmente en el intestino y en sitios mucosos distantes, así como respuestas inmunitarias humorales y celulares sistémicas. La vacunación oral genera normalmente una gran cantidad de IgA secretora (sIgA), que desempeña un papel importante en la defensa mucosa.

Sin embargo, aunque la vía oral de administración de vacunas representa el medio ideal de administración de vacunas terapéuticas y profilácticas, ofreciendo ventajas significativas con respecto a la administración sistémica, la vía oral es también la más difícil debido a las numerosas barreras planteadas por el tracto gastrointestinal. Para facilitar una inmunización eficaz con vacunas de péptidos y proteínas, los antígenos deben protegerse, la captación debe mejorarse y la respuesta inmunitaria innata debe activarse. Por tanto, se han evaluado numerosos sistemas de administración y adyuvantes para la administración de vacunas orales, incluyendo vectores vivos, partículas inertes y toxinas bacterianas. Sin embargo, los desarrollos en vacunas orales han sido hasta ahora decepcionantes ya que no se ha obtenido una inmunización oral eficaz usando proteínas o partículas de tipo virus (VLP) solas.

Stager *et al.* "Systemic and local antibody response in mice induced by a recombinant peptide fragment from *Giardia lamblia* variant surface protein (VSP) H7 produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain", INTERNATIONAL JOURNAL OF PARASITOLOGY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 27, n.º 8, 1 de agosto de 1997 (01-08-1997), páginas 965-971, dan a conocer el desarrollo de una vacuna modelo anti-*Giardia* expresando un segmento génico de la proteína H7 de superficie variante antigénica de *Giardia* (VSPH7) en una cepa de *Salmonella typhimurium* LT2M1C viva-atenuada. Stager *et al.* enseñan el uso de *Salmonella* como portador para el antígeno VSPH7 de *Giardia lamblia* e indican que este modelo es prometedor para el desarrollo de una vacuna frente a la giardiasis.

Jespersgaard *et al.* "Protective immunity against *Streptococcus mutans* infection in mice after intranasal immunization with the glucan-binding region of *S. mutans* glucosyltransferase", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 67, n.º 12, diciembre de 1999 (12-1999), páginas 6543-6549, dan a conocer la construcción y caracterización de una proteína para vacuna quimérica que combina el dominio de unión a glucano (GLU) de la enzima glucosiltransferasa que sintetiza glucano de *Streptococcus mutans* y la tiorredoxina de *Escherichia coli*. La fusión de la subunidad de tiorredoxina a GLU aumenta su solubilidad. El constructo se usa en inmunización intranasal.

Por consiguiente, existe todavía la necesidad de mejores métodos de obtención, regulación o estimulación de una respuesta inmunitaria, tal como respuestas inmunitarias humorales y/o celulares eficaces, frente a una variedad de antígenos, tales como antígenos tumorales, antígenos víricos u otros antígenos de agentes patógenos mediante administración por vía mucosa u oral.

SUMARIO DE LA INVENCION:

La presente invención proporciona ahora un método mejorado, alternativo y novedoso de este tipo de producción, regulación o estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto mediante administración por vía mucosa u oral.

La presente invención se basa, más particularmente, en un nuevo concepto de uso de un polipéptido que comprende al menos dos motivos CXXC, en el que C representa un residuo de cisteína y X cualquier residuo de aminoácido, tal como una proteína de superficie variable (VSP) del parásito *Giardia* o un fragmento de la misma (por ejemplo, el dominio extracelular de una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma) para generar mediante administración por vía mucosa u oral una respuesta inmunitaria frente a un antígeno seleccionado, en particular una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, con el fin de tratar o prevenir la enfermedad provocada por tal antígeno seleccionado en un sujeto.

La presente invención también da a conocer composiciones farmacéuticas relacionadas que comprenden partículas de vector y/o proteínas de fusión, su preparación y usos, que permiten la generación de respuestas inmunitarias mejoradas frente a antígenos mediante administración por vía mucosa u oral.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una vacuna según la reivindicación 1. En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica según la reivindicación 12.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, un trastorno o estados fisiológicos en un sujeto.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una vacuna para su uso como medicamento según la reivindicación 10.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso como medicamento según la reivindicación 13.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

Los inventores demuestran por primera vez que una proteína o un polipéptido que comprende al menos dos motivos CXXC, en el que C representa un residuo de cisteína y X cualquier residuo de aminoácido, tal como proteínas de superficie variables (VSP) de *Giardia* (por ejemplo, el dominio extracelular de una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma) podría usarse por la vía oral como portador de antígeno de vacuna candidato o para inducir inmunidad protectora. Además, los inventores demuestran que tales polipéptidos tales como el dominio extracelular de VSP, que son resistentes a proteasas, tienen pH diferentes y pueden unirse a células epiteliales del intestino, son útiles para formar partículas de tipo virus (VLP) adecuadas para administrarse por vía oral.

Definiciones:

A lo largo de toda la memoria descriptiva, se emplean varios términos y se definen en los siguientes párrafos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunogénico" designa un producto, una composición o un método que obtiene, provoca, estimula o regula una reacción o respuesta inmunitaria. La composición inmunogénica es por tanto cualquier composición que modifica la actividad de un sistema inmunitario en un sujeto o *in vitro*. Esto incluye respuestas inmunitarias protectoras, respuestas inmunitarias celulares, respuestas de anticuerpo, respuestas inmunitarias neutralizantes, modificación en los niveles de anticuerpos, modificación en los niveles de células inmunitarias, etc.

Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una molécula a la que puede unirse específicamente un anticuerpo o un receptor de células T (TCR) si se procesa y presenta mediante moléculas del CMH. El término "antígeno", tal como se usa en el presente documento, también abarca epítomos de células T. Un

- antígeno adicionalmente puede reconocerse por el sistema inmunitario y/o puede inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular conduciendo a la activación de linfocitos B y/o T. Sin embargo, esto puede requerir que, al menos en determinados casos, el antígeno contenga o esté unido a un epítopo de célula Th y se le proporcione un adyuvante o requiere que el antígeno se presente según la presente invención. Un antígeno puede tener uno o más epítopos o sitios antigénicos (epítopos B y T). El término “unido específicamente”, tal como se usa en el presente documento, pretende indicar que preferiblemente el antígeno reaccionará, normalmente de una manera altamente selectiva, con su correspondiente anticuerpo o TCR y no con la multitud de otros anticuerpos o TCR que pueden estar provocados por otros antígenos.
- 5
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “epítopo” se refiere a porciones continuas o discontinuas de un polipéptido o de una molécula no peptídica que tienen actividad inmunogénica o antigénica en un animal, preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente en un ser humano. Un epítopo es reconocido por un anticuerpo o una célula T a través de su receptor de células T en el contexto de una molécula de CMH. Un “epítopo inmunogénico” tal como se usa en el presente documento, se define como una porción de un polipéptido o de una molécula no peptídica que obtiene una respuesta de anticuerpo o induce una respuesta de células T en un animal, tal como se determina mediante cualquier método conocido en la técnica. El término “epítopo antigénico” tal como se usa en el presente documento, se define como una porción de una proteína o de una molécula no peptídica en la que un anticuerpo puede unirse inmunoespecíficamente a su antígeno tal como se determina mediante cualquier método bien conocido en la técnica. La unión inmunoespecífica excluye uniones no específicas pero no excluye necesariamente reactividad cruzada con otros antígenos. No es necesario que los epítopos antigénicos sean necesariamente inmunogénicos. Los epítopos antigénicos pueden ser también epítopos de células T, en cuyo caso puede unirse inmunoespecíficamente a los mismos un receptor de células T en el contexto de una molécula de CMH.
- 15
- 20
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “antígeno heterólogo” se refiere a un antígeno que es heterólogo con respecto al parásito *Giardia* (especialmente *Giardia lamblia*) u otro microorganismo tal como se define en el contexto de la presente invención y por tanto tal antígeno heterólogo no se deriva del parásito *Giardia* o dichos otros microorganismos. Dentro del contexto de la presente invención, el término “antígeno heterólogo” abarca por tanto una planta, un animal, un antígeno tumoral, vírico, bacteriano, parasitario (por ejemplo distinto de uno derivado de *Giardia*), un autoantígeno o una molécula química. Sin embargo, debe indicarse que dicho antígeno heterólogo puede derivarse de *Giardia* si el polipéptido se deriva de otro microorganismo tal como por ejemplo *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Entamoeba*.
- 30
- 35 Tal como se usa en el presente documento, los términos “*Giardia*” o “parásito *Giardia*” se refieren a un género de parásitos protozoarios flagelados anaerobios del filo Metamonada que colonizan y se reproducen en el intestino delgado de varios vertebrados, provocando giardiasis. En todo el mundo, la giardiasis es común entre gente con escasa higiene oral y fecal, y los principales modos de transmisión incluyen suministros de agua contaminados o actividad sexual. Los trofozoítos flagelados de *Giardia* se unen a células epiteliales del intestino delgado (es decir, la superficie de la mucosa intestinal), donde pueden provocar enfermedad sin desencadenar una respuesta inflamatoria pronunciada (Rivero *et al.*, 2010). No hay toxinas o factores de virulencia conocidos, y la expresión variable de proteínas superficiales permite la evasión de las respuestas inmunitarias del huésped y la adaptación a diferentes entornos del huésped (Rivero *et al.* 2010). Su ciclo de vida alterna entre un trofozoíto que nada activamente y un quiste resistente, infeccioso. El parásito *Giardia* infecta a seres humanos, pero es también uno de los parásitos más comunes que infecta a gatos, perros y pájaros. Los huéspedes mamíferos también incluyen vacas, castores, ciervos y ovejas. Por tanto, el término “*Giardia*” abarca diferentes especies, incluyendo *Giardia lamblia* y *Giardia muris*.
- 40
- 45
- 50 Tal como se usa en el presente documento, el término “*Giardia lamblia*” (también denominado *Giardia intestinalis* o *Giardia duodenalis*) se refiere a uno de los parásitos intestinales más comunes de seres humanos. *Giardia lamblia* es el protista parasitario más extendido en los Estados Unidos, donde su incidencia puede ser tan alta como el 0,7% (Hlavsa *et al.* 2005).
- 55 Tal como se usa en el presente documento, el término “proteína de superficie variable” o “VSP” se refiere a un polipéptido que cubre toda la superficie del parásito *Giardia* y son los principales antígenos reconocidos por el sistema inmunitario del huésped. Las VSP son proteínas ricas en cisteína con motivos CXXC frecuentes (en donde X es cualquier aminoácido) que tienen varias características particulares, incluyendo en algunas VSP la presencia de motivos CXC, un motivo de dedo de zinc específico de *Giardia*, y motivos GGCY (Nash, 2002; Adam *et al.* 2010). Más precisamente, las VSP son proteínas de membrana integrales de tipo 1 que varían en tamaño desde 20 hasta 200 kDa; poseen una región rica en cisteína en amino-terminal variable (dominio extracelular que representa la superficie de contacto huésped/parásito y confiere a la proteína resistencia a la digestión proteolítica y pH bajo), y una región carboxi-terminal conservada que incluye una región transmembrana hidrófoba y una cola citosólica corta que comprende sólo 5 aminoácidos (CRGKA), que no son “vistos” por el sistema inmunitario. Solo una VSP se expresa en cualquier momento en la superficie de cada parásito tal como se describe en Nash (1997). Dentro del contexto de la presente invención, se pretende que el término “proteína de superficie variable” incluya cualquier proteína de superficie variable del repertorio completo de VSP de *Giardia*, especialmente *Giardia lamblia*. En
- 60
- 65

realidad, los parásitos *Giardia* codifican para un repertorio de aproximadamente 200 genes que codifican para VSP tal como se describe en Morrison *et al.* (2007) y Adam *et al.* (2010) para el conjunto A, y dos informes del grupo de Svard que describen el repertorio de VSP de aislados derivados de los conjuntos B y E (Jerlström-Hultqvist *et al.* (2010) y Franzén *et al.* (2009). El dominio extracelular de VSP permite que el parásito sobreviva al entorno hostil del intestino delgado superior. Las VSP son muy resistentes a pH variables (la reactividad a un epítipo conformacional por un anticuerpo monoclonal (AcM) dirigido a una VSP particular permanece inalterada entre pH 2 y 12), y a la digestión por tripsina y varias otras proteasas. Además, las VSP permanecen unidas a la mucosa entérica después de que los trofozoítos se hayan unido a la misma (Rivero *et al.*, 2010).

Debe indicarse además que un polipéptido que comprende al menos un motivo CXXC, en el que C representa un residuo de cisteína y X cualquier residuo de aminoácido, tal como VSP de *Giardia* o proteínas de tipo VSP de otros microorganismos puede generarse también *in vitro* mediante manipulación genética y producirse en sistemas heterólogos. Por tanto, se abarcan polipéptidos producidos por células o químicamente, incluyendo aquellos con variaciones de aminoácidos que no se encuentran en los parásitos de tipo natural (por ejemplo variantes de VSP de *Giardia*). Pueden prepararse por tanto VSP mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, tal como síntesis de fase sólida, síntesis de fase líquida o ingeniería genética.

Las VSP de la invención pueden comprender opcionalmente modificaciones químicas. Las modificaciones químicas se dirijan a obtener proteínas con protección aumentada de las proteínas frente a la degradación enzimática *in vivo*, y/o capacidad aumentada para cruzar barreras de membrana, aumentando por tanto su semivida y manteniendo o mejorando su actividad biológica. Puede emplearse cualquier modificación química conocida en la técnica según la presente invención. Tales modificaciones químicas incluyen pero no se limitan a:

- modificaciones en los extremos N-terminal y/o C-terminal de las proteínas tales como por ejemplo acilación N-terminal (preferiblemente acetilación) o desaminación, o modificación del grupo carboxilo C-terminal en una amida o un grupo alcohol;

- modificaciones en el enlace amida entre dos aminoácidos: acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el átomo de nitrógeno o el carbono alfa del enlace amida que une dos aminoácidos;

- modificaciones en el carbono alfa del enlace amida que une dos aminoácidos tales como por ejemplo acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el carbono alfa del enlace amida que une dos aminoácidos;

- cambios de quiralidad tales como por ejemplo sustitución de uno o más aminoácidos que se producen de manera natural (enantiómero L) por los correspondientes enantiómeros D;

- retroinversiones en las que uno o más aminoácidos que se producen de manera natural (enantiómero L) se sustituyen por los correspondientes enantiómeros D, junto con una inversión de la cadena de aminoácido (desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal); y/o

- azapéptidos en los que uno o más carbonos alfa se sustituyen por átomos de nitrógeno.

El término "proteína" o su término usado indistintamente "polipéptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). También se abarcan modificaciones postraduccionales del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, y similares. Los términos "proteína" o "polipéptido" también incluyen variantes que deben abarcar cualquier polipéptido que comprende, o que consiste alternativa o preferiblemente en, cualquier polipéptido natural o producido por ingeniería genética que tiene más del 70%, preferiblemente más del 80%, incluso más preferiblemente más del 90%, de nuevo más preferiblemente más del 95%, y lo más preferiblemente más del 97% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia del polipéptido. Métodos preferidos de generación de una variante de un polipéptido es mediante ingeniería genética, preferiblemente mediante inserción, sustitución, delección o una combinación de las mismas. Cuando se aplica el término "variante de una proteína", según la presente invención, al antígeno, tal variante debe poder inducir la producción del anticuerpo, o la estimulación de células T, *in vivo*. Cuando se aplica el término "variante de una proteína", según la presente invención, a las VSP de *Giardia* o proteínas de tipo VSP de otros microorganismos, tal variante debe poder retener la capacidad de unirse a células, particularmente células mucosas, más particularmente células epiteliales del intestino y finalmente inducir una respuesta inmunitaria *per se*.

Tal como se usa en el presente documento, cuando se aplica el término "un fragmento de una proteína", según la presente invención, a la VSP, o su término usado indistintamente "un fragmento de un polipéptido" tal fragmento debe abarcar cualquier polipéptido que comprende, o consiste alternativa o preferiblemente en, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 aminoácidos contiguos o discontinuos de la proteína, polipéptido o antígeno, tal como se define en el presente documento, así como cualquier polipéptido que tenga más del 65%, preferiblemente más del 80%, más preferiblemente más del 90% e incluso más

preferiblemente más del 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con el mismo. Cuando se aplica el término "fragmento de una proteína", según la presente invención, al antígeno, tal fragmento debe poder inducir la producción de anticuerpo, o la estimulación de células T, *in vivo*. Por tanto, un fragmento de una proteína debe comprender al menos un epítipo inmunogénico. Cuando se aplica el término "fragmento de una proteína", según la presente invención, a la VSP de *Giardia* o proteínas de tipo VSP de otros microorganismos, tal fragmento debe poder retener la capacidad de unirse a células, particularmente células mucosas, más particularmente células epiteliales del intestino y finalmente inducir una respuesta inmunitaria *per se*.

Tal como se usa en el presente documento, el término "unido" se refiere a uniones que pueden ser covalentes, por ejemplo, por acoplamiento químico, o no covalentes, por ejemplo, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno, etc. Los enlaces covalentes pueden ser, por ejemplo, éster, éter, fosfoéster, amida, peptídico, imida, enlaces carbono-azufre, enlaces carbono-fosforo, y similares. El término también incluye incluir, o incluir parcialmente, una sustancia (por ejemplo el antígeno heterólogo). El término "unido" es más amplio que e incluye términos tales como "apareado", "fusionado", "incluido", "empaquetado", "pseudotipado", "expresado en una bicapa lipídica" y "unido".

Tal como se usa en el presente documento, el término "fusión" se refiere a la combinación de secuencias de aminoácidos de origen diferente en una cadena de polipéptido mediante combinación en marco de sus secuencias de nucleótidos codificantes. Debe indicarse que más de una secuencia de nucleótidos puede codificar para una secuencia de aminoácidos dada debido a la degeneración del código genético. El término "fusión" abarca explícitamente fusiones internas, (es decir inserción de secuencias de origen diferente dentro de una cadena de un polipéptido, además de fusión a uno de sus extremos terminales).

Tal como se usa en el presente documento, el término "conjugado" se refiere al producto de conjugación entre (a) una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma, y (b) una molécula orgánica (por ejemplo un antígeno heterólogo que consiste en un antígeno no proteico), en el que los elementos (a) y (b) se unen entre sí. Tales elementos (a) y (b) pueden unirse por ejemplo mediante un ligador.

El término "secuencia de unión" o su término usado indistintamente "ligador" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una entidad molecular que une covalentemente antígenos proteicos o no proteicos tales como una molécula de nicotina a un polipéptido así como una partícula de vector a un polipéptido. El ligador puede comprender por ejemplo un grupo tiol, un grupo alquilo, un grupo glicol o un grupo peptídico. Los ligadores incluyen moléculas de reticulación y algunos ejemplos se enumeran en la solicitud de patente internacional publicada con el n.º WO 2004/009116, que se incorpora en el documento como referencia.

Tal como se usa en el presente documento, "partícula de vector" indica cualquier partícula propensa a presentar una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma y/o el antígeno heterólogo en su superficie. Dentro del contexto de la presente invención, se pretende que el término "partícula de vector" incluya partículas de vector viral, partículas de tipo virus (VLP) y nanopartículas.

El término "partícula de vector viral" tal como se usa en el presente documento se refiere a la forma morfológica de un virus. En algunos tipos de virus comprende un genoma rodeado por cápsida proteica; otros tienen estructuras adicionales (por ejemplo, envueltas, colas, etc.).

El término "partícula de tipo virus" (VLP), tal como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura que se asemeja a una partícula viral. Una partícula de tipo virus según la invención no es replicativa ya que carece de todo o parte del genoma viral, careciendo normal y preferiblemente de todos o parte de los componentes infecciosos y replicativos del genoma viral. El término "no replicativo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a ser incapaz de replicar el genoma comprendido o no en la VLP.

Composiciones farmacéuticas de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica según la reivindicación 12, preferiblemente inmunogénica, que comprende al menos:

- un polipéptido que comprende al menos dos motivos CXXC, en el que C representa un residuo de cisteína y X cualquier residuo de aminoácido, y
- un antígeno heterólogo.

Cuando una composición farmacéutica se administra a un individuo, puede ser en una forma que contiene sales, tampones, adyuvantes, portadores u otras sustancias que son deseables para mejorar la eficacia de la composición. Se proporcionan ejemplos de materiales farmacéuticamente adecuados para su uso en la preparación de composiciones farmacéuticas en numerosas fuentes incluyendo REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Osol, A, ed., Mack Publishing Co., (1990)). "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a

entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra no deseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un sólido, semisólido o carga líquida no tóxico, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo.

Además, las composiciones farmacéuticas pueden comprender adyuvantes o agentes inmunogénicos o biológicamente activos adicionales. Sin embargo, en una realización preferida, las composiciones farmacéuticas carecen de adyuvante, ya que una característica ventajosa de la invención es la alta inmunogenicidad de la composición, incluso en ausencia de adyuvantes. La ausencia de un adyuvante, además, minimiza la aparición de respuestas de células T inflamatorias no deseadas que representan un problema de seguridad en la vacunación.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan preferiblemente para una administración por vía mucosa u oral. Las dosis usadas para la administración por vía mucosa u oral pueden adaptarse en función de diversos parámetros, y en particular en función del modo de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento.

La composición farmacéutica puede administrarse a cualquier mucosa adecuada, y la administración incluye administración oral (a través de la mucosa del sistema digestivo), nasal, vaginal, sublingual, ocular, rectal, urinal, intramamaria, pulmonar, ótica (es decir a través del oído) y bucal, preferiblemente administración bucal o sublingual (administración bucofaríngea).

Tras la formulación, las composiciones farmacéuticas se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de, por ejemplo comprimidos u otros sólidos para la administración por vía mucosa u oral; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma usada actualmente. Por consiguiente, la composición farmacéutica puede estar en forma de una pulverización, un aerosol, una mezcla, una suspensión, una dispersión, una emulsión, un gel, una pasta, un jarabe, una crema, una pomada, implantes (oído, ojo, piel, nariz, rectal, y vaginal), preparaciones intramamarias, vagitorios, supositorios o uteritorios). En determinadas realizaciones, se contempla el uso de liposomas. La formación y el uso de liposomas los conocen los expertos en la técnica.

Tal como se mencionó anteriormente, en una realización preferida, la composición farmacéutica es adecuada para administración oral.

Más particularmente, la composición farmacéutica se formula de manera que el antígeno heterólogo y el polipéptido sean resistentes a la degradación enzimática y química del tracto gastrointestinal superior, cuando sea necesario. Además, debe indicarse que el polipéptido debe poder unirse a células, más particularmente células epiteliales del intestino. Por tanto, en una realización, el polipéptido puede unirse a células epiteliales del intestino y la composición se formula de manera que el antígeno heterólogo y el polipéptido sean resistentes a la degradación enzimática y química del tracto gastrointestinal superior, cuando sea necesario.

En una realización, el polipéptido consiste en un polipéptido que comprende al menos dos motivos CXXC separados por al menos 2 aminoácidos.

Por consiguiente, los dos motivos CXXC se separan por una secuencia amino que comprende desde 3 hasta 20 aminoácidos, preferiblemente desde 5 hasta 8 aminoácidos.

Debe indicarse que los aminoácidos que separan los al menos dos motivos CXXC pueden ser cualquier residuo de aminoácido.

En otra realización, el polipéptido comprende desde 2 hasta 10 motivos CXXC, desde 2 hasta 20 motivos CXXC, desde 2 hasta 30 motivos CXXC, desde 2 hasta 40 motivos CXXC, desde 2 hasta 50 motivos CXXC, desde 2 hasta 60 motivos CXXC, desde 2 hasta 70 motivos CXXC, desde 2 hasta 80 motivos CXXC, desde 2 hasta 90 motivos CXXC o desde 2 hasta 100 motivos CXXC.

Por tanto, el polipéptido puede comprender por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ó 70 motivos CXXC.

En una realización particular, el polipéptido tal como se definió anteriormente es una proteína de superficie variable (VSP), o un fragmento de la misma.

Por consiguiente, el microorganismo se selecciona preferiblemente como *Giardia*.

En una realización preferida, el polipéptido es el dominio extracelular de una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma (ya que dicho dominio extracelular es la región rica en cisteína amino-terminal que comprende múltiples motivos CXXC de la proteína VSP de *Giardia*).

5 De hecho, el dominio extracelular de una VSP de *Giardia* es el dominio resistente al pH, la temperatura y la digestión proteolítica.

Por consiguiente, en otra realización preferida, el polipéptido según la invención comprende sólo el dominio extracelular de una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma. Se eliminan por tanto la región transmembrana y la cola citoplásmica de una VSP de *Giardia*.

Debe indicarse que puede eliminarse también el péptido señal.

Proteínas de superficie variables (VSP)

15 Por consiguiente, la proteína de superficie variable (VSP) o un fragmento de la misma puede elegirse entre el repertorio completo de VSP, que se codifican en el nivel de ADN en el genoma del parásito. Este repertorio está compuesto por aproximadamente 200 genes que codifican para VSP homólogos (VSP), que varía en diferentes aislados de *Giardia*. Debe indicarse además que también pueden usarse variantes de VSP en la composición según la invención.

20 Tal como se mencionó anteriormente, las VSP de *Giardia* y más particularmente el dominio extracelular de las VSP de *Giardia* comprende múltiples motivos CXXC, preferiblemente múltiples motivos CXXC separados por varios aminoácidos, desde 3 hasta 20 aminoácidos y más particularmente desde 5 hasta 8 aminoácidos (tal como se observa mediante alineamientos de secuencias múltiples).

En una realización particular, el parásito *Giardia* es *Giardia lamblia*.

30 En una realización preferida, la VSP de *Giardia* se selecciona del grupo que consiste en VSP9B10, VSP1267, VSPA6, VSP1, VSP2, VSP3, VSP4, VSP5, VSP6, VSP7, VSP8, VSPAS1, VSPAS2, VSPAS3, VSPAS4, VSPAS5, VSPAS6, VSPAS7, VSPAS8, VSPAS9, VSPAS10, VSPAS11, VSPAS12 y VSPH7 de *Giardia lamblia*.

Dominio de tipo VSP

35 No según la presente invención, el dominio de tipo VSP o un fragmento del mismo puede elegirse entre polipéptidos derivados de microorganismos distintos de *Giardia* que comparten homología de secuencia y propiedades bioquímicas con *Giardia* y especialmente polipéptidos que contienen múltiples motivos CXXC, preferiblemente múltiples motivos CXXC separados por de 5 a 8 aminoácidos. De hecho, la alineación del dominio extracelular de la secuencia VSP1267 (consulta) con otras secuencias de moléculas de tipo VSP (resultados de la arquitectura de dominios tras BLASTP eliminando *Giardia* del análisis) han conducido a observar la presencia de múltiples motivos CXXC, especialmente separados por de 5 a 8 aminoácidos, en proteínas que pertenecen a las especies *Paramecium*, *Tetrahymena* y *Entamoeba*. Por tanto, fragmentos representativos de secuencias primarias de cinasas superficiales de *Entamoeba* sp., y proteínas superficiales de *Paramecium* sp. y *Tetrahymena* sp. predicen un dominio conservado que contiene motivos CXXC en una arquitectura de tipo VSP (en comparación con *Giardia* VSP 40 1267, 9B10 y H7) como responsables de la resistencia al pH, la temperatura y la digestión proteolítica.

En una realización, el microorganismo *Tetrahymena* es *Tetrahymena thermophila*.

50 En otra realización, el microorganismo *Entamoeba* es *Entamoeba histolytica*.

En otra realización, el microorganismo *Paramecium* es *Paramecium tetraurelia*.

Antígeno heterólogo

55 El antígeno heterólogo puede consistir en un antígeno que se produce de manera natural, o una porción del mismo, en el que la porción del antígeno que se produce de manera natural comprende o consiste alternativamente en al menos un epítopo inmunogénico. Antígeno que se produce de manera natural se refiere a un antígeno que existe en la naturaleza, preferiblemente existe en un organismo, tal como una planta, un animal, un parásito, una bacteria o un virus.

60 En realizaciones preferidas, el antígeno heterólogo se selecciona por tanto del grupo que consiste en un antígeno vegetal, animal, parasitario, bacteriano, viral, autoantígeno, tumoral, o una molécula química.

65 Por tanto, en una realización preferida de la presente invención, el antígeno heterólogo es antígeno proteico no propio (o foráneo), un fragmento o una variante del mismo.

Los antígenos proteicos no propios a modo de ejemplo que se contemplan incluyen un antígeno proteico bacteriano, un antígeno proteico viral, un antígeno proteico parasitario, un antígeno proteico tumoral, un antígeno proteico micoplasmático y un antígeno proteico alérgeno.

5 Debe indicarse además que el antígeno heterólogo puede estar constituido por la propia partícula de vector, cuando dicha partícula (por ejemplo una partícula de tipo virus (VLP) tal como se describe a continuación) se deriva de un virus o comprende partes de un virus frente al que se busca inmunización. Por ejemplo, cuando la partícula se deriva de un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), dicha partícula puede constituir el antígeno heterólogo.

10 En otra realización preferida de la presente invención, el antígeno heterólogo es un antígeno proteico propio, un fragmento o una variante del mismo.

De hecho, enfermedades, particularmente enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias crónicas pueden estar provocadas por la sobreproducción o el mal funcionamiento de un antígeno proteico propio.

15 Antígenos proteicos propios a modo de ejemplo que se contemplan incluyen citocinas, interleucinas, hormonas, factores de crecimiento y receptores.

En todavía otra realización preferida, el antígeno heterólogo es un antígeno no proteico.

20 Antígenos no proteicos a modo de ejemplo que se contemplan incluyen un antígeno de polisacárido, un antígeno lipídico, un antígeno de ácido nucleico, un antígeno de lipopolisacárido y una molécula química tal como un fármaco.

25 Fármacos típicos, incluyendo tanto fármacos de abuso como fármacos terapéuticos, alcaloides tales como nicotina, esteroides, toxinas de hidratos de carbono, compuestos aromáticos, incluyendo muchos contaminantes, y otros compuestos frente a los que puede generarse una respuesta inmunitaria.

Los antígenos heterólogos a modo de ejemplo (antígenos proteicos o no proteicos) incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la solicitud de patente internacional n.º WO 2006/02674.

30 Según la presente invención, el polipéptido se une al antígeno heterólogo. El polipéptido se fusiona con el antígeno heterólogo.

35 En todavía otra realización, el polipéptido se une a una partícula de vector que contiene el antígeno heterólogo. Por consiguiente, la partícula de vector puede ser una partícula viral, una partícula de tipo virus (VLP) o una nanopartícula.

En una realización particular, la partícula de vector es una VLP que presenta en su superficie el polipéptido de la invención.

40 En otra realización particular, el antígeno heterólogo está contenido dentro o sobre la superficie de la VLP.

Polipéptidos según la invención unidos al antígeno heterólogo.

45 Otro aspecto de la invención se refiere al polipéptido que comprende al menos dos motivos CXXC según la invención tal como VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma unido al antígeno heterólogo.

Polipéptidos según la invención - proteínas de fusión a antígeno heterólogo

50 Cuando el antígeno heterólogo es antígeno proteico propio o no propio, los polipéptidos según la invención tal como se definieron anteriormente tal como VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma pueden fusionarse con el antígeno heterólogo.

55 Por tanto, un aspecto de la invención se refiere por tanto a la proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende al menos dos motivos CXXC, en el que C representa un residuo de cisteína y X cualquier residuo de aminoácido, y que retiene la capacidad de unirse a células epiteliales del intestino, y un antígeno heterólogo.

Según la invención, el polipéptido es una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma.

60 En una realización particular, el polipéptido es el dominio extracelular de una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma.

Las proteínas de fusión de la presente invención pueden prepararse según técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo mediante el uso de tecnologías de ácido nucleico recombinantes).

Debe indicarse que la presente invención también se refiere a los polipéptidos según la invención tales como el dominio extracelular de VSP de *Giardia* o fragmentos del mismo fusionados con antígenos proteicos heterólogos tal como se definieron anteriormente así como a los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican.

5 Polipéptidos según la invención – conjugados de antígeno heterólogo

Cuando el antígeno heterólogo es un antígeno no proteico, los polipéptidos según la invención tal como se definieron anteriormente tales como VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma pueden unirse covalentemente al antígeno no proteico mediante una secuencia de unión.

10 Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere por tanto a conjugados que comprenden un polipéptido que contiene al menos dos motivos CXXC, en el que C representa un residuo de cisteína y X cualquier residuo de aminoácido, y que retiene la capacidad de unirse a células epiteliales del intestino, y un antígeno heterólogo. Según la invención, el polipéptido es una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma.

15 En una realización particular, el polipéptido es el dominio extracelular de una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma.

20 Los conjugados de la presente invención pueden prepararse según técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo mediante tecnologías para acoplar moléculas orgánicas a aminoácidos) y por ejemplo tal como se describe en la solicitud de patente internacional publicada con el n.º WO 2004/009116, que se incorpora en el documento como referencia.

25 Debe indicarse que la presente invención también se refiere a los polipéptidos según la invención tales como el dominio extracelular de VSP de *Giardia* o fragmentos del mismo conjugados con antígenos no proteicos heterólogos tal como se definieron anteriormente.

Polipéptidos según la invención unidos a una partícula de vector

30 En todavía otro aspecto, los polipéptidos según la invención tal como se definieron anteriormente tales como VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma se une a una partícula de vector.

Según la invención, el polipéptido es una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma.

35 En una realización particular, el polipéptido es el dominio extracelular de una VSP de *Giardia* o un fragmento del mismo.

En otra realización, el antígeno heterólogo se une a una partícula de vector.

40 En todavía otra realización, los polipéptidos según la invención tal como se definieron anteriormente tales como VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma y el antígeno heterólogo se unen ambos a la partícula de vector.

Por consiguiente, una proteína de fusión o un conjugado tal como se describió anteriormente puede unirse a la partícula de vector.

45 Dentro del contexto de la presente invención, la partícula de vector puede ser una partícula de vector viral, una partícula de tipo virus (VLP) o una nanopartícula.

En una realización particular, la partícula de vector es una partícula de tipo virus (VLP).

50 Cuando están usándose partículas de tipo virus, pueden prepararse según técnicas conocidas en la técnica y por ejemplo tal como se describe en la solicitud de patente internacional publicada con el n.º WO 02/34893, que se incorpora en el documento como referencia.

55 En una realización preferida, la VLP presenta en su superficie el polipéptido según la invención tal como una VSP de un parásito *Giardia* o un fragmento de la misma.

60 Por tanto, el polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma puede exponerse en la superficie de la VLP. En este sentido, el polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma puede exponerse mediante unión a diversas estructuras, tales como una proteína de la envuelta o un fragmento de la misma, un ligador sintético, o mediante reacción enzimática o química, incluyendo anticuerpo.

En una realización particular, la VLP comprende una envuelta modificada que puede ser una envuelta sintética (quimérica) que comprende al menos una porción del dominio transmembrana de una envuelta retroviral fusionada al polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma.

5 Por consiguiente, en una realización preferida, la VLP presenta una proteína de la envuelta de un virus, tal como una proteína de la envuelta de un virus de estomatitis vesicular (VSV) o un fragmento de la misma (por ejemplo la región transmembrana (TM) de la glicoproteína G de VSV) fusionada con el polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma expuesta en la superficie de la VLP, por ejemplo mediante fusión química o enzimática con la proteína de la envuelta de VSV o un fragmento de la misma.

10 En otra realización preferida, la VLP presenta (i) una proteína de la envuelta de un virus, tal como una proteína de la envuelta de un virus de estomatitis vesicular (VSV) o un fragmento de la misma (por ejemplo la región transmembrana (TM) de la glicoproteína G de VSV) fusionada con el polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma y (ii) el antígeno heterólogo.

15 En otra realización particular, la envuelta sintética puede funcionalizarse, permitiendo de ese modo la unión a la envuelta sintética, mediante interacción covalente o no covalente, de cualquier molécula seleccionada de interés. La envuelta funcionalizada puede comprender un ligador en la que el ligador permite la unión (específica) de cualquier molécula seleccionada de interés. Como ejemplo, la envuelta puede comprender un grupo avidina o biotina, que permite la unión específica a la misma de una molécula. La molécula unida puede ser el polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma así como el antígeno heterólogo (es decir antígeno proteico y no proteico).

20 En una realización particular, el antígeno heterólogo está contenido dentro de la VLP.

25 En una realización preferida, la partícula de tipo virus (VLP) comprende una proteína Gag de retrovirus o lentivirus (tal como el virus de la leucemia murina (VLM) o proteínas Gag de VIH, o fragmentos de las mismas), incluso más preferiblemente una proteína Gag de retrovirus modificada. En un ejemplo específico, la proteína Gag es una proteína de fusión que comprende el antígeno heterólogo (es decir hemaglutinina (HA) de influenza) o un fragmento de la misma (por ejemplo el péptido SFE que consisten en el péptido HA 111-119) que conduce al hecho de que el antígeno heterólogo está contenido dentro de la VLP.

30 Por consiguiente, el polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma pueden formar una superficie protectora (tal como se produce de manera natural en los trofozoítos de parásitos) que permite el suministro correcto del antígeno heterólogo a la mucosa (por ejemplo mucosa intestinal), sin padecer degradación en el aparato digestivo y al mismo tiempo el antígeno heterólogo puede ser adyuvado por las propias VSP, para el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora apropiada.

35 Debe indicarse que la presente invención también se refiere a las partículas de tipo virus (VLP) descritas anteriormente según la invención.

En otra realización, la partícula de vector es una nanopartícula.

40 Dentro del contexto de la invención, las nanopartículas son de pequeño tamaño, lo suficientemente pequeñas como para captarse por células para permitir que el antígeno se presente en la superficie de la célula. En realizaciones preferidas, las nanopartículas tienen un núcleo con un diámetro medio de entre 0,5 y 10 nm, más preferiblemente de entre 1 y 2,5 nm.

45 El núcleo de la nanopartícula puede ser un núcleo metálico. Preferiblemente, el núcleo metálico comprende Au, Ag o Cu, por ejemplo una aleación seleccionada de Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd, Au/Ag/Cu/Pd, Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd o Au/Fe/Cu/Gd.

50 Preferiblemente, las nanopartículas de la invención son solubles en la mayoría de disolventes orgánicos y especialmente en agua.

55 Cuando están usándose nanopartículas, pueden prepararse según técnicas conocidas en la técnica y por ejemplo tal como se describe en la solicitud de patente internacional publicada con el nº WO 2007/122388, que se incorpora en el documento como referencia.

60 En una realización preferida, la nanopartícula presenta en su superficie el polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma.

En otra realización preferida, el polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma y el antígeno heterólogo se unen ambos a la superficie de la nanopartícula.

Por consiguiente, una proteína de fusión o un conjugado tal como se describió anteriormente pueden unirse a la nanopartícula.

Usos profilácticos y terapéuticos de las composiciones farmacéuticas de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, un trastorno o estados fisiológicos en un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un cánido y un primate. Preferiblemente un sujeto según la invención es un ser humano.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o estado al que se aplica tal término, o uno o más síntomas de tal trastorno o estado.

Dentro del significado de la invención, el término "prevenir" o "prevención" con respecto a un acontecimiento pretende significar la disminución de un riesgo de producirse dicho acontecimiento.

Por consiguiente, una enfermedad, un trastorno o estados fisiológicos considerados en la invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en cánceres, enfermedades inmunológicas, enfermedades autoinmunitarias, rechazos de aloinjertos, enfermedades virales, tales como gripe o SIDA, enfermedades parasitarias tales como malaria o tripanosomiasis, infecciones bacterianas, tales como tuberculosis, alergias.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica de la invención para su uso como vacuna.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica de la invención, a un polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma unido a un antígeno heterólogo de la invención (incluyendo proteínas de fusión y conjugados), un polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma unido a una partícula de vector de la invención para la obtención de una respuesta inmunitaria y/o la potenciación de una respuesta inmunitaria.

La invención también se refiere a un método de tratamiento o prevención de una enfermedad, un trastorno o estados fisiológicos en un sujeto, en el que dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la invención.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se administra por vía oral.

En otra realización, la composición farmacéutica se administra por vía mucosa.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende como una cantidad mínima de agente activo que es necesaria para conferir beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" para un mamífero es una cantidad tal que induce, mejora o provoca de otra manera una mejora en los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad o estados fisiológicos asociados con o resistencia a sucumbir a un trastorno.

La invención también se refiere a un método de inmunización de un sujeto, en el que dicho método comprende administrar a dicho sujeto la composición farmacéutica de la invención.

La invención se refiere además al uso de un polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o un fragmento de la misma como portador para la presentación de un antígeno heterólogo y la vacunación, particularmente vacunación por vía mucosa u oral.

Tal como se mencionó anteriormente, el polipéptido según la invención tal como una VSP de *Giardia* o fragmentos de la misma favorecen un correcto suministro del antígeno heterólogo a la mucosa sin padecer degradación extensa en el aparato digestivo.

En una realización, el polipéptido puede unirse a células epiteliales del intestino y/o es resistente a degradación química y/o enzimática del tracto gastrointestinal superior.

Según la invención, el polipéptido es una proteína de superficie variable (VSP), de *Giardia* o un fragmento de la misma.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en ningún caso como limitativos del alcance de la presente invención.

FIGURAS:

Figura 1: Se cultivaron esplenocitos marcados con CFSE de ratones SFE-TCR (10^6 /pocillo) con DC purificados con CD11c (razón 5T:1DC) durante 72 h en medio solo, péptido SFE recombinante o VLPVSP-HA (control positivo) a las concentraciones indicadas. Los histogramas muestran la proliferación de células T mediante dilución con CFSE de células T específicas para SFE (separadas usando un anticuerpo anti-CD4+ y el anticuerpo anti-clonotípico 6.5 que reconoce específicamente las células T transgénicas). Los números indican el porcentaje de células divididas.

Figura 2: *Ensayo ELISPOT (inmunización oral con la proteína de fusión HA-VSP)*. Se determinó la producción de IFN- γ específica para HA mediante un ensayo convencional ELISPOT (Mabtech, Sophia Antipolis, Francia). Se estimularon esplenocitos (5×10^5 células/pocillo) durante la noche a 37°C en el 5% de CO₂ con 1 μ g/ml de proteína HA. Se usaron PBS o concanavalina A (5 μ l/ml; ConA; Sigma-Aldrich) como controles negativo y positivo, respectivamente. Después del revelado, se contaron los puntos usando el lector de ELISPOT de AID (ELR03, AID AutoimmunDiagnostika, Strassberg, Alemania) y se restaron los puntos no específicos detectados en los controles negativos. Los símbolos representan ratones individuales y las líneas horizontales representan la media geométrica de cada grupo. *p < 0,05, **p < 0,01.

Figura 3: *Respuesta inmunitaria humoral en ratones vacunados por vía oral con la proteína de fusión VSP-HA*. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con HA H5N1 recombinante. Se añadieron diluciones en serie de sueros y se incubaron durante 2 h a TA, se revelaron durante 1 h a TA con anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón (H+L) marcado con biotina (Biot. Human adsorbed. Southern Biotech n.º de catálogo 1010-08), y durante 1 h a TA con un polímero de peroxidasa-estreptavidina ultrasensible (Sigma-Aldrich). Se midió la actividad peroxidasa usando sustrato TMB (Sigma-Aldrich) y se leyeron las densidades ópticas a 450 nm (DO450) después de bloquear la reacción añadiendo HCl. La cantidad de anti HA se calculó basándose en un anticuerpo monoclonal convencional anti-H5N1 HA (de ratón anti-influenza A, hemaglutinina aviar H5N1 (HA) n.º de catálogo 17649-55B. USBiological).

Figura 4: *Ensayo ELISPOT (inmunización oral con VLP pseudotipadas con HA y VSP)*. Se determinó la producción de IFN- γ específico de HA (A) e IL-4- (B) mediante un ensayo convencional ELISPOT (Mabtech, Sophia Antipolis, Francia). Se estimularon los esplenocitos (5×10^5 células/pocillo) durante la noche a 37°C en el 5% de CO₂ con 20 ng de partículas basadas en Gag de VIH pseudotipadas con HA y NA†. Se usaron medio solo o concanavalina A (2 μ l/ml; ConA; Sigma-Aldrich) como controles negativo y positivo, respectivamente. Después del revelado, se contaron los puntos usando el lector de ELISPOT de AID (ELR03, AID AutoimmunDiagnostika, Strassberg, Alemania) y se restaron los puntos no específicos detectados en los controles negativos. Los símbolos representan ratones individuales y las líneas horizontales representan la media geométrica de cada grupo. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

†: Se generaron partículas de lentivirus basadas en Gag de VIH por transfección de células 293T con vectores de expresión que codifican para los componentes virales (pCMV9 (Gag) + HA (pXD14) + NA (pXD15)). Se usó un ensayo ELISA específico de p24 de VIH (kit RETRO-TEK# HIV-1 p24 Antigen ELISA; ZeptoMetrixCorp., Nueva York, EE.UU.) para determinar las concentraciones de p24 en las muestras de vector de lentivirus, según las instrucciones del fabricante.

Figura 5: *Respuesta inmunitaria humoral en ratones vacunados por vía oral con la VLP-VSP HA/NA*. Respuestas de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HI). Se diluyeron en serie muestras de sueros y se incubaron 1 h a 37°C con 4 unidades de HA de partículas basadas en Gag de VLM pseudotipadas con H5N1 en 25 μ l de PBS. Luego se añadieron 50 μ l de una suspensión al 0,5% de eritrocitos de pollo a cada pocillo. Los títulos de anticuerpo HI se expresan como el recíproco de la dilución más alta de muestras que inhiben la aglutinación. Los símbolos representan ratones individuales y las líneas horizontales representan la media geométrica de cada grupo.

EJEMPLOS:

Para obtener una prueba de principio y, simultáneamente, desarrollar un posible candidato a vacuna, se usó hemaglutinina del virus de la gripe (HA) como antígeno de vacuna modelo.

Por tanto, para determinar si podría obtenerse una respuesta inmunitaria protectora y completa (T y B) mediante suministro oral de antígenos de HA portados por VSP, se construyeron varios vectores que permitirían la expresión concomitante de las VSP y los antígenos de HA. Se usó la proteína HA del virus influenza A H5N1/Hong Kong como antígeno para inducir respuestas inmunitarias específicas de células B y células T.

Ejemplo 1:

Materiales y métodos

Generación de tres constructos de VSP/HA diferentes para usarse como vacunas orales:

Para determinar si podría obtenerse una respuesta inmunitaria protectora y completa (T y B) mediante suministro oral de antígenos hemaglutinina (HA) de influenza portados por VSP de *Giardia*, se preparan varios constructos con el fin de permitir la expresión concomitante de las VSP y los antígenos de HA. Se usaron la proteína HA y su péptido SFE inmunodominante como antígeno heterólogo para inducir respuestas inmunitarias específicas de células B y células T, respectivamente.

Estos constructos de VSP/HA incluyen proteínas de fusión y partículas de tipo virus (VLP) en las que se unen VSP y antígenos de HA.

Más precisamente, se generan por tanto tres constructos de VSP/HA diferentes, concretamente:

1- VSP fusionadas al péptido SFE para monitorizar respuestas inmunitarias específicas de células T.

2- VSP fusionadas a la porción extracelular de HA (Δ HA) para monitorizar respuestas inmunitarias específicas de células B y células T.

3- Una partícula de tipo virus (VLP) que presenta proteínas VSP y HA (forma de longitud completa) en su superficie y/o el péptido SFE dentro de la partícula como una proteína de fusión gag. Las VLP se forman mediante proteínas Gag de VLM fusionadas con el péptido SFE. Para presentar la proteína VSP en la superficie de las VLP, las VSP se fusionan con la región transmembrana (TM) de VSV-G.

Producción de las proteínas de fusión de VSP y caracterización bioquímica:

Control: Δ HA sola y polipéptido de la invención: VSP Ex fusionada a la porción extracelular de HA (Δ HA).

Más particularmente, se derivaron las secuencias de ADNc que codifican para la Δ HA de influenza A H5N1 (Hong Kong). Se contrató a la empresa Genscript para la producción de la proteína. Se optimizaron los codones de la secuencia de ADN de la proteína recombinante y se transformó en bacterias usando los vectores de expresión de la empresa. Se obtuvo HA recombinante en el sistema de expresión bacteriana usando una cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Para la purificación de la proteína HA se usó una columna Q en condiciones desnaturalizantes y se replegó la proteína resultante mediante diálisis frente a tris-HCl 50 mM, el 5% de glicerol, pH 8,0.

Para la producción de la VSP fusionada a la parte extracelular de la proteína HA, se usó HA en su forma soluble –se delecionó la región TM- (Δ HA). Se analizaron las secuencias de proteínas usando la plataforma de predicción de topología en línea Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>).

La VSP de longitud completa contiene una región extracelular rica en cisteína que contiene numerosos motivos CXXC. Se eliminaron el péptido señal, la región transmembrana y los 5 residuos citoplásmicos (VSP Ex). Se usó VSP 1267 en estos experimentos.

Se optimizaron los codones de la secuencia de la proteína de fusión para clonarla en el sistema de baculovirus. Se expresó la proteína y se purificó mediante purificación por afinidad de una etapa usando la etiqueta His presente en la porción carboxilo terminal de la proteína.

Producción de las partículas de retrovirus (VLP) pseudotipadas con VSP y HA en la superficie:

VLP preparadas a partir de una Gag y pseudotipadas con HA y NA (neuraminidasa):

Para el vector de HA, se clonó la secuencia de HA H5N1 (Hong Kong) incluyendo su propio dominio TM (vector pXD14). La HA de tipo natural se pseudotipa de manera natural y muy eficazmente en partículas virales o pseudovirales. Para la expresión de NA se usó el vector pXD15.

VLP preparadas a partir de una Gag y pseudotipadas con VSP y HA y NA:

Para pseudotipar secuencias de VSP en las VLP, se fusionó el dominio extracelular de las VSP al dominio transmembrana (TM) de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), que se sabe que se exporta eficazmente a la membrana plasmática en células de mamíferos, colocalizada con proteínas Gag, y se pseudotipa en partículas virales o pseudovirales recién formadas (vector pCP1267).

Nota: para algunos experimentos se usó una proteína de fusión Gag-Gp33-41 en vez de GAG, para medir la respuesta de CD8. Para presentar el péptido Gp33-41 dentro de la partícula, se fusionó Gp33-41 al extremo carboxilo terminal de Gag de VLM (vector pEB1).

Producción de ADN: Una vez validados todos los constructos, se amplificaron y purificaron los plásmidos. La producción de plásmidos se realizó usando kits de preparación libres de endotoxinas (Nucleobond® PC 2000 EF; Macherey-Nagel, Hoerd, Francia).

5 Producción de VLP: Para generar partículas de retrovirus recombinantes, se transfectaron células 293T con los vectores de expresión generados (pEB1, pCP1267, pXD15 y pXD14). Se concentraron los sobrenadantes que contienen partículas y se purificaron mediante ultracentrifugación, con o sin una etapa de purificación adicional mediante FPLC.

10 - Cada lote de VLP se sometió a un análisis de control de calidad para validar la presencia de Gag de VLM, HA o VSP por diferentes técnicas:

- Se demostró la funcionalidad del constructo VSP-TM por su expresión apropiada en la superficie de células transfectadas por el vector pCP1267.

15 La eficacia de la producción de VLP y la incorporación de VSP en o sobre las VLP se evaluó mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western en el sobrenadante ultracentrifugado.

Resultados:

20 Se evaluó el correcto pseudotipado de HA en las VLP mediante un ensayo de hemaglutinación. Se incubaron glóbulos rojos (RBC) de pollo en presencia de diluciones en serie de diferentes VLP para evaluar la aglutinación en presencia de una proteína HA con buena conformación. Se usó VLP-HAH5N1/NA como control positivo y VLP-Gag-GFP como control negativo. La incubación de RBC con PBS sirve para evaluar el tiempo de sedimentación.
25 Mediante esta prueba se mostró que el VLP-VSP-HA/NA desarrollado durante este estudio podía promover la aglutinación de RBC de pollo.

Ejemplo 2:

30 Materiales y métodos:

Validación *in vitro* de los tres constructos:

35 2.1- A nivel bioquímico:

Se realiza inmunoprecipitación específica de VSP con el fin de validar los constructos VSP-ΔHA y VLP. Se analizan los inmunoprecipitados mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se realiza la detección de HA y la detección de proteínas HA/Gag con el fin de validar los constructos respectivamente.

40 2.2- A nivel inmunológico:

Para determinar si los antígenos de HA pueden ser reconocidos por células T específicas de HA, se realizan pruebas de proliferación *in vitro* con células T CD4+ específicas de SFE (obtenidas de los ratones transgénicos para SFE tal como se describe en Kirberg *et al.* 1994), en presencia de DC sensibilizadas con cada uno de los tres constructos o cargadas con proteínas recombinantes purificadas.
45

Resultados:

50 Se confirmó que el antígeno HA presente en las VLP se procesó correctamente y activó células T específicas de HA mediante una prueba de proliferación *in vitro* usando células T CD4+ específicas de SFE marcadas con CFSE transgénicas para un TCR que reconoce específicamente el péptido SFE110-119 de HA (obtenido de los ratones transgénicos para SFE (Kirberg J., 1994). Tal como se observa en la figura 1, las células transgénicas se dividen activamente en presencia de células dendríticas (DC) pulsadas con el VLP-VSP-HA, indicando que la proteína HA presente en la VLP se ha procesado y presentado correctamente de un modo restringido por el CMH de clase II.

55 Ejemplo 3:

Caracterización de la respuesta inmunitaria anti-HA y anti-VSP en ratones inmunizados por vía oral mediante los constructos de VSP/HA:

60 Se analizaron las respuestas inmunitarias locales y sistémicas en ratones en diferentes momentos después de la vacunación por vía oral.

Modelo:

Se inmunizan por vía oral ratones (H-2^d) con VSP-ΔHA, o HA-VLP (VSP-). Como control, se inmunizan por vía oral ratones con ΔHA o HA-VLP (VSP-) y se inmunizan por vía manera subcutánea con HA-VLP en Al(OH)₃ [control positivo].

5 Análisis:

- Respuestas de células T sistémicas: Se analiza la frecuencia de células T específicas de HA mediante ELISPOT de IFN-γ detrás la reestimulación específica de HA de las células del bazo.

10 - Respuestas de células B sistémicas: Se estudia la respuesta anticuerpos específicos de HA en suero mediante ELISA o ensayos de inhibición de la hemaglutinación.

Inmunización oral con la proteína de fusión VSP-HA:

15 Protocolo de inmunización:

Ratones hembra Balb/c (H-2^d), de 7 semanas de edad recibieron tres administraciones orales sucesivas de 35 μg de la proteína ΔHA recombinante o la proteína ΔHAVSP recombinante suspendida en PBS-Tween 20 estéril, al 0,01% con 3 días de intervalo. Como control, los ratones recibieron sólo vehículo (control negativo), o se inmunizaron una vez por vía subcutánea con 35 ug de ΔHA en alumbre (control positivo).

Se analizó la respuesta de células T anti-HA en un grupo de ratones sacrificados el día 17 (10 días después de la última dosis oral). Se estudió la respuesta de células B anti-HA en otro grupo de ratones el día 21 (14 días después de la última inmunización).

25 Resultados:

Análisis de la respuesta de células T:

30 Tal como se observa en la figura 2, la inmunización con la proteína de fusión VSP-HA indujo satisfactoriamente una respuesta de células T IFN-γ específica de HA en 2 de 2 ratones inmunizados, al contrario que la inmunización oral con la proteína HA sola, que no indujo respuesta significativa en 3 de 3 ratones vacunados.

35 Estos resultados establecen que la fusión del antígeno de HA a la proteína VSP dota a la proteína de fusión de la capacidad única de generar una respuesta sistémica de células T específica de antígeno de HA cuando se administra por la vía oral.

Análisis de la respuesta de células B:

40 Se analizó la generación de Ac específicos anti-HA mediante ELISA. La administración oral de la proteína HA no pudo inducir Ac anti-HA, mientras que la proteína de fusión VSP-HA indujo altos títulos de Ac anti-HA en uno de los ratones inmunizados por vía oral, indicando que en presencia de la VSP, puede generarse una respuesta de células B sistémica frente a HA (figura 3).

45 Inmunización oral con las VLP pseudotipadas con VSP y HA en la superficie:

Protocolo de inmunización:

50 Ratones hembra Balb/c (H-2^d), de 7 semanas de edad recibieron tres administraciones orales sucesivas de 35 μg de VLP-HA/NA, VLP-VSP-HA/NA suspendidos en PBS-Tween 20 estéril, al 0,01% con 3 días de intervalo. Como control, los ratones recibieron vehículo sólo (control negativo), o se inmunizaron una vez por vía subcutánea con 35 ug de VLP-VSP-HA/NA en alumbre (control positivo).

55 Se sacrificaron los ratones el día 17 (10 días después de la última dosis oral) y se analizó la respuesta de células T y B frente a HA.

Resultados:

Análisis de la respuesta de células T:

60 Tal como se observa en la figura 4, la inmunización con la proteína de fusión VLP-VSP-HA/NA indujo satisfactoriamente una respuesta de células T IFN-γ específica de HA en 3 de 3 ratones inmunizados, al contrario que la inmunización oral con VLP-HA/NA, que no indujo respuesta significativa en 3 de 3 ratones vacunados. No se detectó producción significativa de IL-4 específica de HA, sugiriendo que la respuesta inmunitaria generada por la proteína de fusión es del tipo Th1. Estos resultados establecen que protegiendo la VSP-HA con la proteína VSP dota

65

a la partícula de la capacidad única de generar una respuesta de células T sistémica específica de antígeno de HA cuando se administra por la vía oral.

Análisis de la respuesta de células B:

Para el análisis de la respuesta de células B sistémica, se cuantificó la respuesta de anticuerpos específicos de HA en suero usando un ensayo de inhibición de la hemaglutinación tal como se muestra en la figura 5. Puede observarse que sólo VLP pseudotipadas con HA y VSP pueden generar anticuerpos específicos anti-HA, indicando que la presencia de VSP en la VLP era necesaria para la generación de una respuesta de células B sistémica anti-HA.

Conclusión:

Se han producido las vacunas orales compuestas por proteínas quiméricas VSP-HA o VLP que expresan HA cubiertas con VSP y HA y los controles correspondientes. Se ha validado bioquímicamente que las proteínas VSP y HA mantienen su conformación correcta en los constructos correspondientes. Se ha ampliado a escala la producción para inmunizar animales por vía oral. En estos experimentos se ha observado que al contrario que en la administración oral de la proteína HA sola, que no induce una respuesta de células T o B específica, la administración oral de HA transportada por VSP, ya sea como proteína de fusión o en una formulación de VLP, genera una respuesta humoral y celular específica de HA.

Este trabajo demuestra la validez de la estrategia.

El desarrollo de esta plataforma universal para el suministro oral de vacunas debe tener una amplia aplicación para diferentes enfermedades infecciosas. Existe un gran interés en la vía de administración oral, en particular para vacunas profilácticas para vacunación en masa.

Se desprende de los experimentos que VSP de *Giardia* y más generalmente polipéptidos que comprenden al menos dos motivos CXXC según la presente invención parece que representan un excelente portador para transportar un antígeno candidato a través del tubo digestivo al intestino, donde pueden estar durante un tiempo que permite el desarrollo de una respuesta inmunitaria. Y lo que no es menos importante, las VSP pueden también actuar como adyuvantes mucosos, tal como se sugiere por su capacidad de inducir una respuesta inmunitaria (respuesta de anticuerpos) por sí mismos.

De hecho, como prueba de principio se ha mostrado que el dominio extracelular de las VSP del parásito intestinal *Giardia* como portador para transportar antígenos candidatos para vacunas orales tiene la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria eficaz frente a la HA de gripe mediante vacunación oral.

BIBLIOGRAFÍA

A lo largo de toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Adam RD, Nigam A, Seshadri V, Martens CA, Farneth GA, Morrison HG, Nash TE, Porcella SF, Patel R; The *Giardia lamblia* vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution; BMC Genomics. 9 de julio de 2010; 11:424.

Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, Palm D, Andersson JO, Andersson B, Svärd SG; Draft genome sequencing of giardia intestinalis assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species?; PLoS Pathog. Agosto de 2009; 5(8):e1000560.

Hlavsa MC, Watson JC, Beach MJ; Giardiasis surveillance—Estados Unidos, 1998-2002; MMWR Surveill Summ. 28 de enero de 2005; 54(1):9-16.

Jerlström-Hultqvist J, Franzén O, Ankarklev J, Xu F, Noh»nková E, Andersson JO, Svärd SG, Andersson B; Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate; BMC Genomics. 7 de octubre de 2010; 11:543.

Kirberg J, Baron A, Jakob S, Rolink A, Karjalainen K, von Boehmer H; Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor; J Exp Med. 1 de julio de 1994; 180(1):25-34.

Lavelle EC, O'Hagan DT; Delivery systems and adjuvants for oral vaccines; Expert Opin. Drug Deliv. 3(6), 747-762 (2006).

- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML; Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*; Science. 28 de septiembre de 2007; 317(5846):1921-6.
- 5
- Nash T.E; Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 352, 1369-1375 (1997).
- 10
- Nash T.E; Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*; Mol Microbiol. Agosto de 2002; 45(3):585-90.
- Rivero FD, Saura A, Prucca CG, Carranza PG, Torri A, Lujan HD; Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine; Nat Med. Mayo de 2010; 16(5):551-7.

REIVINDICACIONES

1. Vacuna frente a un antígeno que comprende :
 - 5 - un antígeno unido a un polipéptido heterólogo para el antígeno,
en la que polipéptido es una proteína de superficie variable (VSP) de *Giardia* o un fragmento de la misma que comprende al menos dos motivos CXXC, en el que C representa un residuo de cisteína y X cualquier residuo de aminoácido, que puede unirse a células epiteliales del intestino.
 - 10 2. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el polipéptido es resistente a la degradación química y/o enzimática del tracto gastrointestinal superior.
 - 15 3. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el polipéptido es el dominio extracelular de VSP.
 4. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el polipéptido se fusiona con dicho antígeno.
 5. Vacuna según la reivindicación 1, en la que el polipéptido se une a una partícula de vector que contiene dicho antígeno.
 - 20 6. Vacuna según la reivindicación 5, en la que la partícula de vector es una partícula viral, una partícula de tipo virus (VLP) o una nanopartícula.
 - 25 7. Vacuna según la reivindicación 6, en la que la partícula de vector es una VLP que presenta en su superficie el polipéptido.
 8. Vacuna según la reivindicación 7, en la que el antígeno está contenido dentro o en la superficie de la VLP.
 9. Vacuna según la reivindicación 5, en la que la partícula de vector es una nanopartícula que presenta en su superficie el polipéptido y el antígeno heterólogo.
 - 30 10. Vacuna según la reivindicación 1, para su uso como medicamento.
 11. Vacuna para su uso según la reivindicación 10, mediante administración oral.
 - 35 12. Composición farmacéutica que comprende al menos la vacuna según la reivindicación 1.
 13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, para su uso como medicamento.
 - 40 14. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, mediante administración oral.

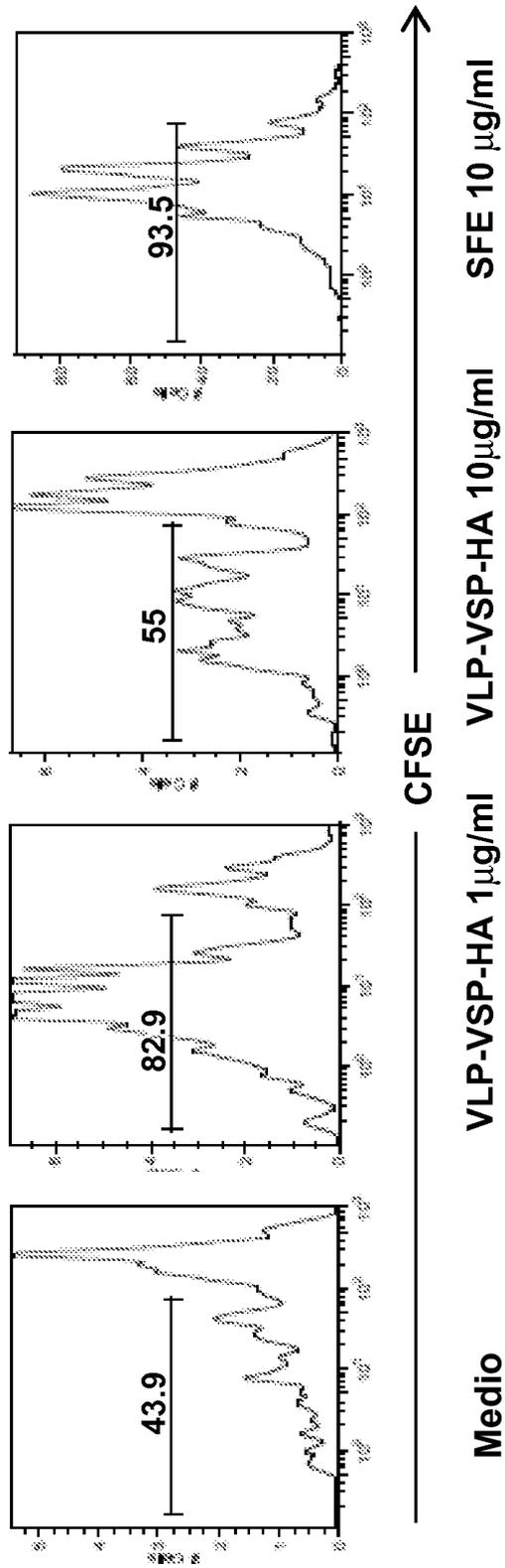


Figura 1

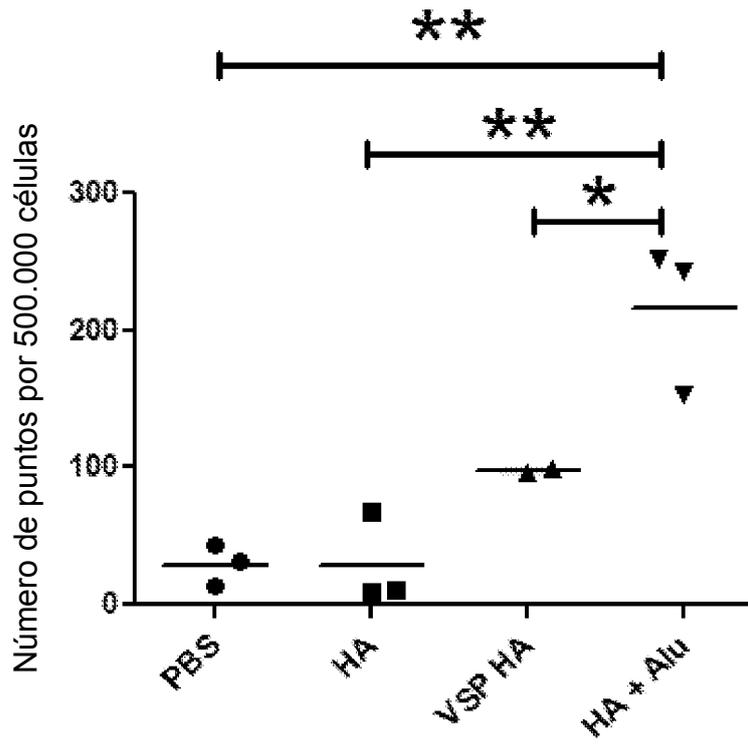


Figura 2

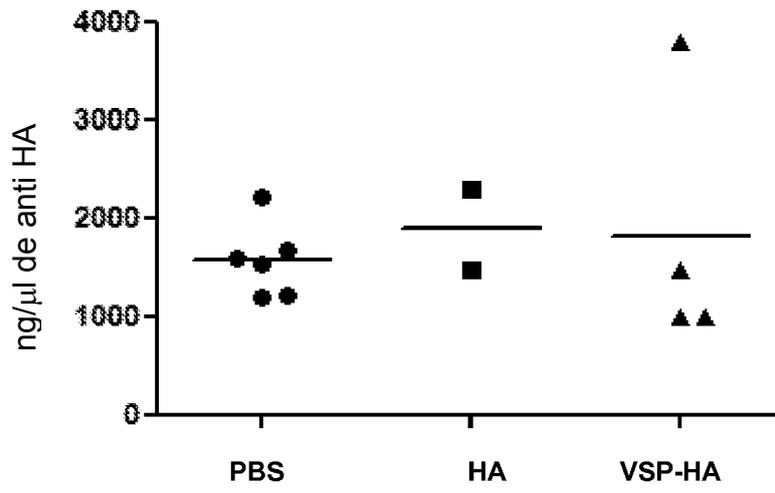


Figura 3

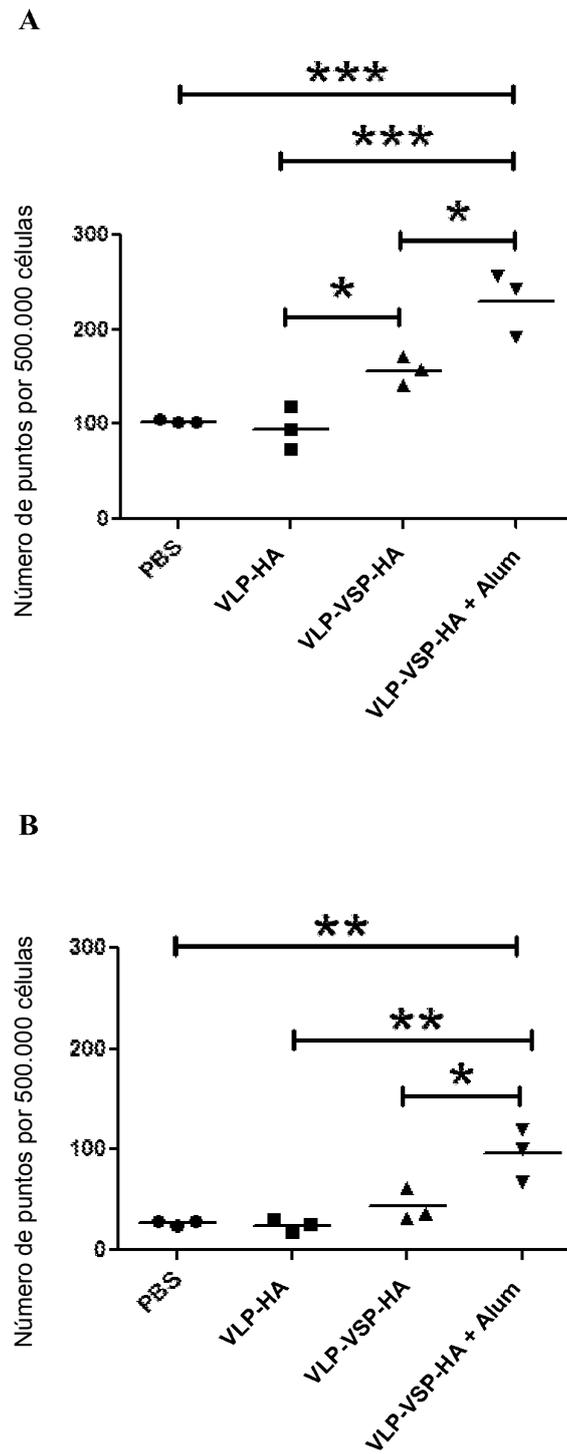


Figura 4

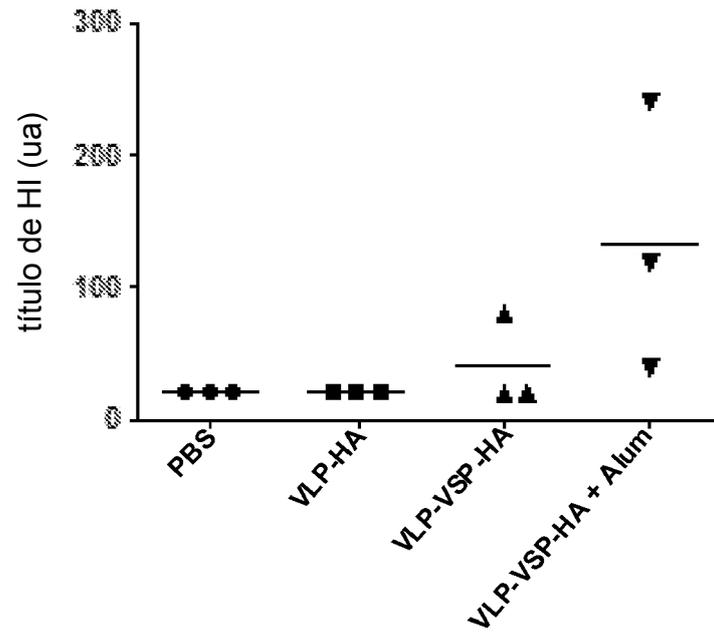


Figura 5