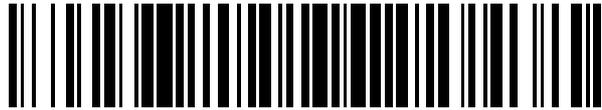


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 905**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/69**

(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2005 PCT/GB2005/003791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2006 WO06037979**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2005 E 05788525 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 1793863**

54 Título: **Nanopartículas que comprenden antígenos y adyuvantes capaces de estimular linfocitos T cooperadores**

30 Prioridad:

**01.10.2004 US 615182 P  
21.06.2005 US 692232 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.07.2017**

73 Titular/es:

**MIDATECH LTD. (100.0%)  
65 Innovation Drive, Milton Park, Abingdon  
Oxfordshire OX14 4RQ, GB**

72 Inventor/es:

**HIMMLER, GOTTFRIED;  
MUDDE, G., C.;  
KIRCHEIS, RALF;  
RADEMACHER, T.MIDATECH LIMITED;  
PENADES ULLATE, SOLEDAD;  
MARTIN LOMAS, MANUEL;  
DE PAZ CARRERA, JOSE LUIS;  
OJEDA MARTINEZ DE CASTILLA, RAFAEL y  
BARRIENTES, AFRICA GARCIA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones :**

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

**ES 2 625 905 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Nanopartículas que comprenden antígenos y adyuvantes capaces de estimular linfocitos T cooperadores

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nanopartículas, y más en particular a nanopartículas que comprenden adyuvantes y antígenos, tales como antígenos tumorales y patógenos, y a su uso en una gama de aplicaciones.

10 **Antecedentes de la invención**

El uso de antígenos de hidrato de carbono y peptídicos en vacunas está obstaculizado en gran medida por su falta de inmunogenicidad cuando se inyectan directamente en un paciente. Dichos antígenos, cuando se inyectan solos, por lo general son ignorados por las células presentadoras de antígenos (CPA), se eliminan rápidamente y no inducen una respuesta inmunitaria.

En la mayoría de los casos, también es necesario administrar el antígeno en combinación con un adyuvante. El adyuvante puede ser un sistema de entrega simple tal como liposomas, que ralentizan el aclaramiento del antígeno y hacen que sea más probable que sea alcanzado y recogido por las CPA. Sin embargo, esto en sí mismo no es muy eficaz y por lo general es necesario combinarlo con agentes que estimulen el sistema inmunitario, tales como productos bacterianos que estimulen la formación de citocinas. También pueden coadministrarse citocinas por sí mismas. Muchos de estos productos son demasiado tóxicos o demasiado experimentales para ser utilizados en seres humanos y los adyuvantes más eficaces no están aprobados para el uso humano. La mayoría de los adyuvantes disponibles para su uso en seres humanos son de eficacia limitada. Encontrar adyuvantes eficaces adecuados para el uso humano es un desafío continuo.

Los antígenos de hidrato de carbono tienen una inmunogenicidad particularmente débil, ya que solamente pueden estimular respuestas de células B y no de linfocitos T. Por lo general esto se aborda mediante la conjugación de los hidratos de carbono con una proteína transportadora. Sin embargo, con el fin de provocar una respuesta inmunitaria también es necesario el uso de un adyuvante.

Los antígenos de hidrato de carbono son dianas potenciales para la inmunoterapia antineoplásica ya que están expuestos en la superficie de las células tumorales pero ocultos en las células normales. Muchas bacterias y otros patógenos también se distinguen por antígenos de hidrato de carbono que serían una buena diana para vacunas, si los hidratos de carbono no fueran tan poco inmunógenos. La mejora de la inmunogenicidad de los antígenos de hidrato de carbono tendría, por tanto, aplicaciones en una amplia diversidad de campos terapéuticos.

Las células cancerosas casi siempre están glucosiladas de una manera aberrante, una característica que las distingue de las células normales. (*Glycoconjugate J.* (1997), 14:569; *Adv. Cancer Res.* (1989), 52:257; *Cancer Res.* (1996), 56:5309). En la mayoría de los casos, la glucosilación aberrante se presenta en la superficie de las células en forma de glucoproteínas y glucolípidos. Por tanto, estas estructuras de hidrato de carbono alteradas pueden denominarse antígenos asociados a tumores (AAT), que con frecuencia no se producen en las células normales. En muchos casos, las células no muestran una glucosilación homogénea, es decir existen diferentes glucoformas de cadenas de glucano complejas en una superficie celular (*Annu. Rev. Biochem.* (1988), 57:785).

En el curso del descubrimiento y la posterior caracterización de los más variados antígenos asociados a tumores, la investigación ha demostrado que tienen funciones importantes para las células cancerosas. Por ejemplo, los antígenos asociados a tumores permiten que las células degeneradas demuestren propiedades características del fenotipo maligno, tales como un aumento de la capacidad de adhesión, que desempeñan un papel importante en el establecimiento de las metástasis. Sin embargo, dichos antígenos también pueden, en ciertas etapas, expresarse en células normales en las que son responsables de las funciones normales de estas células. Por tanto, los antígenos asociados a tumores son estructuras que son presentadas predominantemente por las células tumorales, en general, sobre o en la membrana celular, y que les permiten diferenciarse del tejido no maligno. Los antígenos asociados a tumores pueden ser, por ejemplo, polipéptidos, en particular proteínas glucosiladas o patrones de glucosilación de polipéptidos. Otras estructuras que pueden representar un antígeno asociado a tumor incluyen los glucolípidos, por ejemplo, los gangliósidos, tales como GM2. Dichos antígenos asociados a tumores pueden representarse por cambios en la composición de los lípidos de la membrana celular que pueden ser característicos de las células cancerosas.

Los antígenos asociados a tumores incluyen los siguientes ejemplos.

N-CAM (molécula de adhesión celular neuronal, del inglés *Neuronal Cell Adhesion Molecule*), que se expresa con frecuencia en tumores de origen neuronal y que efectúa la adhesión homófila (*J. Cell Biol.* 118 (1992), 937).

El antígeno de hidrato de carbono Lewis Y, que se produce en la mayoría de los tumores de origen epitelial, pero que también desempeña un papel importante durante el desarrollo fetal de los tejidos epiteliales. Se ha demostrado

que la expresión de este antígeno en el cáncer de pulmón está fuertemente asociada a un pronóstico desfavorable ya que las células de cáncer positivas para Lewis Y, obviamente, tienen un potencial metastásico más alto (*N. Engl. J. Med.* 327 (1992), 14).

5 CEA (antígeno carcinoembrionario, del inglés *Carcino Embryonic Antigen*), que con frecuencia se produce en tumores epiteliales del tracto gastrointestinal y que se ha identificado como una molécula de autoadhesión (*Cell* 57 (1989), 327).

10 Ep-CAM (molécula de adhesión de células epiteliales, del inglés *Epithelial Cell Adhesion Molecule*), que se expresa en casi todos los tumores de origen epitelial, pero que también se produce en un gran número de epitelios normales. Se ha caracterizado como una molécula de autoadhesión y, por tanto, puede clasificarse como un antígeno de adhesión panepitelial (*J. Cell Biol.* 125 (1994), 437).

15 Son ejemplos adicionales de antígenos asociados a tumores el hidrato de carbono Sialil Tn, los antígenos Lewis (Lewis-x, Lewis-b, estructuras de Lewis y), hidrato de carbono Globo H, gangliósidos tales como GD2/GD3/GM2, antígeno prostático específico (PSA, del inglés *Prostate Specific Antigen*), CA 125, CA 19-9, CA 15-3, TAG-72, receptor de EGF, receptor Her2/Neu, p97, CD20 y CD21. Hay disponibles anticuerpos monoclonales dirigidos contra todos estos antígenos. Se describen ejemplos de antígenos asociados a tumores en DeVita et al. (Editores, *"Biological Therapy of Cancer"*, 2<sup>o</sup> Edición, Capítulo 3: *Biology of Tumor Antigens*, Lippincott Company, ISBN 0-397-51416-6 (1995), (*Elektrophoresis* (1999), 20:362; *Curr. Pharmaceutical Design* (2000), 6:485, *Neoplasma* (1996), 43:285)).

20 Existen diversos métodos de tratamiento del cáncer, sin embargo, todavía ha de mejorarse la tasa de éxito de las pautas de tratamiento actuales. Aparte de la cirugía y la quimioterapia, también se conoce el tratamiento inmunoterápico.

25 En la inmunoterapia pasiva, los anticuerpos monoclonales (MAb, del inglés *Monoclonal Antibody*) se administran por vía sistémica a un paciente en una cantidad adecuada de unirse directamente a una diana. El objetivo del tratamiento es formar un complejo inmunitario y, a través de una serie de reacciones inmunitarias, se destruye la célula u organismo afectado por la diana. El efecto terapéutico depende de la concentración de los MAb en la circulación y de su semivida biológica, que suele ser bastante corta. Por tanto, es necesario repetir la administración dentro de un plazo de tiempo adecuado. Si se usan MAb xenógenos, tales como anticuerpos murinos, se esperan reacciones adversas, que conduzcan posiblemente a un choque anafiláctico. Debido a este inconveniente, dichas inmunoterapias se emplean durante un tiempo limitado solamente.

35 Las pautas de inmunización activa activan el sistema inmunitario de los pacientes de una manera diferente. Después de la administración de un antígeno que se parece a una diana específica, la respuesta inmunitaria humoral y la específica de linfocitos T del paciente inducen mecanismos de defensa para combatir la diana *in vivo*. Se conocen bien en la técnica antígenos de vacuna de diversos tipos y frente a una amplia diversidad de diferentes enfermedades. Por ejemplo, la vacunación contra la hepatitis B usando vacunas que contienen antígenos de superficie de la hepatitis B es bien conocida. Se ha demostrado que los intervalos de dosis altas de antígenos utilizados para la vacunación, así como la vacunación con dosis bajas, pueden proporcionar tasas suficientes de seroconversión (Parish D.C. et al., 1991, *Southern Medical Journal*, 84, 426-430 Goudeau A. et al., 1984, *The Lancet*, 10, 1091-1092).

40 También se conocen proteínas de fusión de manano-mucina y pueden usarse para la generación de linfocitos T citotóxicos. Se ha demostrado que dependiendo de la dosificación de la proteína de fusión administrada a ratones, puede inducirse ya sea casi solamente inmunidad celular (dosis bajas) o solamente inmunidad humoral (dosis altas) (Pietersz G.A. et al., 1998, *Cancer Immunol. Immunother.*, 45, 321-326).

45 Para la inmunización activa, los antígenos por lo general se presentan en una formulación inmunógena para proporcionar una vacuna. Los antígenos que imitan las dianas tienen similitudes en cualquiera de las secuencias primaria y secundaria de las dianas o fragmentos de las mismas. Los antígenos mimotopos o mimotópicos, sin embargo, tienen similitudes en la estructura terciaria de la diana.

50 Aunque se han desarrollado muchos productos para el tratamiento del cáncer todavía existe una gran demanda para proporcionar sustancias que tengan características mejoradas en comparación con las sustancias ya conocidas. En particular, en el campo de la vacunación, existe una necesidad de productos que sean altamente inmunógenos, fácilmente reproducibles y altamente eficaces, pero que no provoquen efectos secundarios graves.

55 Barrientos et al., 2003, *Chemistry*, Vol. 9, N.º 9, páginas 1909-1921, describe gluconanopartículas de oro como ligandos polivalentes sintéticos que imitan superficies similares al glucocáliz como herramientas para estudios glucobiológicos.

60 Rojo et al., 2004, *Chembiochem.*, Vol. 5, N.º 3, páginas 291-297, describe gluconanopartículas de oro como nuevas herramientas en la terapia antiadhesiva.

El documento WO 98/43677 describe un conjugado de hidrato de carbono péptido y su uso para inducir una respuesta inmunitaria.

5 Jesús de la Fuente et al., 2004, *Glycoconjugate Journal*, vol. 21., N.º 3-4, páginas 149-163, describe gluconanopartículas de oro que imitan la agrupación de glucoesfingolípidos (GSL, del inglés *glycosphingolipid*) en la membrana celular.

10 Ada G., 2001, *New England Journal of Medicine*, vol. 345, N.º 14, páginas 1042-1053, describe vacunas y la vacunación.

Edelman R., 2000, *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 42, páginas 1-27, describe métodos de preparación y protocolos de investigación relacionados con adyuvantes de vacunas.

15 El documento WO 2005/002643 A2 describe métodos y productos para la entrega de moléculas biológicas a las células usando nanoestructuras de componentes múltiples. En particular, la nanoestructura puede incluir antígenos y ciertos adyuvantes para su uso en aplicaciones de vacunación.

20 El documento WO 02/32404 (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) desvela nanopartículas formadas a partir de átomos metálicos o semiconductores en los que los ligandos que comprenden hidratos de carbono están unidos covalentemente al núcleo de las nanopartículas. Estas nanopartículas se usan para modular interacciones mediadas por hidratos de carbono y son solubles y atóxicas. La solicitud PCT que reivindica la prioridad del documento GB-A-0313259.4 (Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Midatech Limited) desvela nanopartículas magnéticas que tienen núcleos que comprenden átomos metálicos pasivos y magnéticos, estando el núcleo unido covalentemente a ligandos. La solicitud GB 0411537.4 (Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Midatech Limited) desvela nanopartículas que incluyen nanopartículas magnéticas que están conjugadas a ligandos de ARN, en particular ligandos de ARNip.

### Sumario de la invención

30 En términos generales, la presente invención se refiere a nanopartículas que comprenden adyuvantes y antígenos como se definen en las reivindicaciones.

35 En un primer aspecto la presente invención proporciona una nanopartícula que comprende un núcleo que incluye átomos metálicos y/o semiconductores, en la que el núcleo está unido covalentemente a una pluralidad de ligandos y los ligandos comprenden al menos un antígeno, y al menos un adyuvante peptídico que activa linfocitos T cooperadores, y en la que el núcleo de la nanopartícula tiene un diámetro medio de entre 0,5 y 10 nm.

40 En algunos casos la nanopartícula comprende adicionalmente al menos un ligando que comprende un grupo monosacárido.

45 En algunos casos el adyuvante peptídico comprende un sitio de escisión de proteasa. En particular, el adyuvante peptídico puede comprender la secuencia de aminoácidos FKLQTMVKLFNRKNNVA.

En algunos casos el antígeno es un antígeno específico de tumor. En particular, el antígeno puede ser un antígeno de hidrato de carbono. En ciertos casos el antígeno está sialilado. Por ejemplo, el antígeno puede ser sialil Tn, sialil Lewis a, sialil Lewis x o sialil Lewis y.

50 En algunos casos el antígeno es un antígeno específico de patógeno. Por ejemplo, el patógeno puede ser una bacteria, un virus o un parásito.

55 En algunos casos al menos uno de los ligandos está unido a la nanopartícula a través de un grupo enlazador. En particular, el grupo enlazador puede comprender un grupo tiol, un grupo alquilo, un grupo glicol o un grupo peptídico. Por ejemplo, el grupo enlazador puede comprender alquilo C2-C15 y/o glicol C2-C15. En particular, el grupo enlazador puede ser alquilo C2-C15 o hexaetilenglicol-alquilo C11.

60 En algunos casos la nanopartícula comprende un marcador. En particular, el marcador puede ser un grupo fluorescente, un radionúclido, un marcador magnético, un colorante, un átomo activo en RMN o un átomo que es susceptible de detección usando resonancia de plasmón superficial. En ciertos casos, el marcador magnético es un grupo paramagnético que comprende  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  o lantánidos<sup>+3</sup>. En ciertos casos, el átomo activo en RMN es  $Man^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  o lantánidos<sup>+3</sup>.

65 En algunos casos la nanopartícula es hidrosoluble.

En algunos casos el núcleo de la nanopartícula puede tener un diámetro medio de entre 1 y 2,5 nm.

En algunos casos la nanopartícula que incluye sus ligandos tiene un diámetro medio de entre 10 y 30 nm.

- 5 En algunos casos el núcleo de la nanopartícula es un núcleo metálico. En particular, el núcleo metálico puede comprender Au, Ag o Cu. En ciertos casos el núcleo metálico es una aleación seleccionada entre Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd, Au/Ag/Cu/Pd, Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd o Au/Fe/Cu/Gd. En ciertos casos el núcleo de la nanopartícula es magnético. En ciertos casos la nanopartícula comprende átomos de metal pasivos y átomos de metal magnéticos en el núcleo en una relación entre aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 2:5. Por ejemplo, el metal pasivo puede ser oro, platino, plata o cobre, y el metal magnético puede ser hierro o cobalto.

En algunos casos el núcleo de la nanopartícula comprende átomos semiconductores. En ciertos casos los átomos semiconductores son capaces de actuar como un punto cuántico.

- 15 En algunos casos los ligandos comprenden adicionalmente un péptido, un dominio proteínico, un segmento de ácido nucleico, un glucolípido o una glucoproteína. En particular, el segmento de ácido nucleico puede comprender ADN o ARN. En un segundo aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende una población de una o más de las nanopartículas del primer aspecto de la invención.

- 20 En algunos casos la composición comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto la presente invención proporciona un método de preparación de nanopartículas del primer aspecto de la invención mediante la conjugación de dicho al menos un antígeno y el dicho al menos un adyuvante peptídico que activa los linfocitos T cooperadores con el núcleo de la nanopartícula, comprendiendo el método:

- 25 derivatizar el antígeno con un enlazador;  
 derivatizar el adyuvante peptídico con un enlazador; y  
 hacer reaccionar el antígeno y el adyuvante peptídico derivatizados con enlazador con reactivos para producir el núcleo de la nanopartícula de manera que durante el autoensamblaje de las nanopartículas, los núcleos de nanopartículas se unan al antígeno y el adyuvante peptídico a través del enlazador.

En algunos casos el grupo enlazador comprende un grupo tiol, un grupo alquilo, un grupo glicol o un grupo peptídico. En casos particulares el grupo enlazador comprende alquilo C2-C15 y/o glicol C2-C15. Por ejemplo, el grupo enlazador puede ser alquilo C2-C15 o hexaetilenglicol-alquilo C11.

- 35 En algunos casos la mezcla de reacción comprende el antígeno derivatizado, el adyuvante derivatizado, una sal de los átomos metálicos y/o semiconductores y un agente reductor para producir las nanopartículas.

- 40 En un cuarto aspecto la presente invención proporciona nanopartículas obtenibles mediante el método del tercer aspecto de la invención.

En un quinto aspecto la presente invención proporciona nanopartículas del primer aspecto de la invención, o una composición del segundo aspecto de la invención, para su uso en terapia preventiva o paliativa.

- 45 En un sexto aspecto la presente invención proporciona nanopartículas del primer aspecto de la invención, o una composición del segundo aspecto de la invención, para su uso como vacuna.

En un séptimo aspecto la presente invención proporciona el uso de nanopartículas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. En algunos casos el cáncer es el cáncer de colon, páncreas, intestino, pulmón, hígado, ovario o vejiga. En ciertos casos las nanopartículas comprenden una señal de translocación de membrana de modo que sean capaces de penetrar a través de la membrana celular.

- 50 En un octavo aspecto la presente invención proporciona el uso de nanopartículas como se define en la reivindicación 9 o la reivindicación 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad infecciosa. En ciertos casos la enfermedad infecciosa es la malaria o la tuberculosis. En ciertos casos las nanopartículas comprenden una señal de translocación de membrana de manera que sean capaces de penetrar a través de la membrana celular.

- 60 Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora a modo de ejemplo y no de limitación con referencia a las figuras adjuntas.

#### Breve descripción de las figuras

- 65 La **Figura 1** muestra la estructura de los ligandos Glc (A), Stn (B) y Le<sup>y</sup> (C).

La **Figura 2** muestra la estructura del ligando peptídico de T cooperador BC11.

La **Figura 3** muestra la estructura del ligando peptídico de T cooperador BMIX.

5 La **Figura 4A** muestra los espectros de RMN de la mezcla de partida (superior) y las nanopartículas resultantes (inferior) para la nanopartícula I de BC11.

La **Figura 4B** muestra los espectros de RMN de la mezcla de partida (superior) y las nanopartículas resultantes (inferior) para la nanopartícula II de BC11.

10 La **Figura 5A** muestra una micrografía electrónica de transmisión (izquierda) y un histograma de distribución de tamaño (derecha) para la nanopartícula I de BC11.

15 La **Figura 5B** muestra una micrografía electrónica de transmisión (izquierda) y un histograma de distribución de tamaño (derecha) para la nanopartícula II de BC11.

La **Figura 6** muestra representaciones esquemáticas supuestas de la nanopartícula I de BC11.

20 La **Figura 7** muestra títulos séricos de IgG frente a HSA-Le<sup>y</sup> de ratones inoculados con BC11 I (círculos y cuadrados) o BC11 II (triángulos). Se muestra el suero de control de ratones no inoculados como un solo cuadrado relleno. Las flechas indican el momento de las inoculaciones.

25 La **Figura 8** muestra títulos séricos de IgG frente a HSA-Le<sup>y</sup> de ratones inoculados con BC11 III (triángulos) o BC11 IV (cuadrados y círculos). Se muestra el suero de control de ratones no inoculados como un solo cuadrado abierto. Las flechas indican el momento de las inoculaciones.

La **Figura 9** muestra los títulos séricos de IgG de ratones inoculados con BC11 II con primovacunación con toxina tetánica. Las flechas indican el momento de las inoculaciones.

### 30 Descripción detallada

#### Nanopartículas

35 Las nanopartículas son partículas pequeñas, por ejemplo, agrupaciones de átomos metálicos o semiconductores, que pueden usarse como un sustrato para la inmovilización de ligandos.

40 Las nanopartículas de la invención son solubles en la mayoría de disolventes orgánicos y especialmente en agua. Esto puede usarse en su purificación y significa de forma importante que pueden usarse en solución para presentar el ligando inmovilizado sobre la superficie de la partícula. El hecho de que las nanopartículas sean solubles tiene la ventaja de presentar los ligandos en una conformación natural. Para las aplicaciones terapéuticas, las nanopartículas son atóxicas, solubles y estables en condiciones fisiológicas.

45 Las nanopartículas tienen núcleos que tienen diámetros medios de entre 0,5 y 10 nm, más preferentemente de entre 0,5 y 5 nm, más preferentemente de entre 0,5 y 3 nm e incluso más preferentemente de entre 0,5 y 2,5 nm. Cuando se consideran los ligandos además de los núcleos, el diámetro medio global de las partículas preferentemente es de entre 5,0 y 100 nm, más preferentemente de entre 5 y 50 nm y mucho más preferentemente de entre 10 y 30 nm. El diámetro medio puede medirse usando técnicas bien conocidas en la técnica tales como microscopía electrónica de transmisión.

50 El material del núcleo puede ser un metal o un semiconductor y puede estar formado por más de un tipo de átomo. Preferentemente, el material del núcleo es un metal seleccionado entre Au, Fe o Cu. Los núcleos de nanopartículas también pueden formarse a partir de aleaciones incluyendo Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd y Au/Fe/Cu/Gd y pueden usarse en la presente invención. Son materiales de núcleo preferidos Au y Fe, siendo el material más preferido el Au. Los núcleos de las nanopartículas comprenden preferentemente entre 55 aproximadamente 100 y 500 átomos (por ejemplo, átomos de oro) para proporcionar diámetros del núcleo en el intervalo de nanómetros. Otros materiales de núcleo particularmente útiles están dopados con uno o más átomos que son activos en RMN, permitiendo que las nanopartículas se detecten usando RMN, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los ejemplos de átomos activos en RMN incluyen Mn<sup>+2</sup>, Gd<sup>+3</sup>, Eu<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, V<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup> y lantánidos<sup>+3</sup>, o los puntos cuánticos descritos en otra parte en de la presente solicitud.

60 Pueden detectarse núcleos de nanopartículas que comprenden átomos semiconductores ya que los cristales semiconductores de escala nanométrica son capaces de actuar como puntos cuánticos, es decir, pueden absorber luz excitando de este modo electrones en los materiales a niveles de energía más altos, liberando posteriormente fotones de luz a frecuencias características del material. Un ejemplo de un material de núcleo semiconductor es el seleniuro de cadmio, el sulfuro de cadmio, el telurio de cadmio. También se incluyen los compuestos de cinc tales como el sulfuro de cinc.

- En algunas realizaciones, el núcleo de las nanopartículas puede ser magnético y comprender átomos metálicos magnéticos, opcionalmente en combinación con átomos metálicos pasivos. A modo de ejemplo, el metal pasivo puede ser oro, platino, plata o cobre y el metal magnético puede ser hierro o gadolinio. En realizaciones preferidas, el metal pasivo es oro y el metal magnético es hierro. En este caso, de manera práctica la relación de átomos metálicos pasivos a átomos metálicos magnéticos en el núcleo es de entre aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 2:5. Más preferentemente, la relación es de entre aproximadamente 5:0,1 y aproximadamente 5:1. Como se usa en el presente documento, la expresión "metales pasivos" se refiere a metales que no muestran propiedades magnéticas y son químicamente estables a la oxidación. Los metales pasivos pueden ser diamagnéticos o superparamagnéticos. Preferentemente, dichas nanopartículas son superparamagnéticas.
- Los ejemplos de nanopartículas que tienen núcleos que comprenden un metal paramagnético, incluyen los que comprenden  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  y lantánidos<sup>+3</sup>.  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  y lantánidos<sup>-+3</sup>.
- Pueden formarse otras nanopartículas magnéticas a partir de materiales tales como MnFe (ferrita espinela) o CoFe (ferrita de cobalto) que pueden conformarse en nanopartículas (fluido magnético, con o sin la adición de un material de núcleo adicional como se ha definido anteriormente. Se proporcionan ejemplos de la química de unión por autoensamblaje para la producción de dichas nanopartículas en *Biotechnol. Prog.*, 19:1095-100 (2003), *J. Am. Chem. Soc.* 125:9828-33 (2003), *J. Colloid Interface Sci.* 255:293-8 (2002).
- En algunas realizaciones, la nanopartícula de la presente invención o su ligando comprende un marcador detectable. El marcador puede ser un elemento del núcleo de la nanopartícula o el ligando. El marcador puede ser detectable debido a una propiedad intrínseca de ese elemento de la nanopartícula o por estar unido, conjugado o asociado a un resto adicional que sea detectable. Los ejemplos preferidos de marcadores incluyen un marcador que es un grupo fluorescente, un radionúclido, un marcador magnético o un colorante. Los grupos fluorescentes incluyen fluoresceína, rodamina o tetrametil rodamina, Rojo de Texas, Cy3, Cy5, etc. y pueden detectarse por la excitación del marcador fluorescente y la detección de la luz emitida usando espectroscopía de dispersión Raman (Y.C. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin, *Science* 2002, 297:1536-1539).
- En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden comprender un radionúclido para su uso en la detección de la nanopartícula usando la radiactividad emitida por el radionúclido, por ejemplo, mediante el uso de PET, SPECT o para terapia, es decir, para destruir células diana. Los ejemplos de radionúclidos utilizados habitualmente en la técnica que se podría adaptar fácilmente para su uso en la presente invención incluyen  $^{99m}Tc$ , que existe en diversos estados de oxidación aunque el más estable es  $TcO_4^-$ ;  $^{32}P$  o  $^{33}P$ ;  $^{57}Co$ ;  $^{59}Fe$ ;  $^{67}Cu$  que se utiliza con frecuencia en forma de sales de  $Cu^{2+}$ ;  $^{67}Ga$  que se utiliza habitualmente en forma de sal de  $Ga^{3+}$ , por ejemplo, citrato de galio;  $^{68}Ge$ ;  $^{82}Sr$ ;  $^{99}Mo$ ;  $^{103}Pd$ ;  $^{111}In$  que en general se usa en forma de sales de  $In^{3+}$ ,  $^{125}I$  o  $^{131}I$  que en general se usa en forma de yoduro de sodio;  $^{137}Cs$ ;  $^{113}Gd$ ;  $^{153}Sm$ ;  $^{158}Au$ ;  $^{186}Re$ ;  $^{201}Tl$  utilizado en general en forma de una sal de  $Tl^+$  tal como cloruro de talio;  $^{39}Y^{3+}$ ,  $^{71}Lu^{3+}$ , y  $^{24}Cr^{2+}$ . El uso general de radionúclidos como marcadores e indicadores es bien conocido en la técnica y podría ser adaptado fácilmente por el experto en la materia para su uso en los aspectos de la presente invención. Los radionúclidos pueden emplearse más fácilmente mediante el dopado de los núcleos de las nanopartículas o pueden incluirse como marcadores presentes como parte de ligandos inmovilizados sobre las nanopartículas.
- Adicionalmente o como alternativa, las nanopartículas de la presente invención, o los resultados de sus interacciones con otras especies, pueden detectarse usando varias técnicas bien conocidas en la técnica usando un marcador asociado a la nanopartícula como se ha indicado anteriormente o mediante el empleo de una propiedad de los mismos. Estos métodos de detección de nanopartículas pueden ir desde la detección de la agregación que se produce cuando las nanopartículas se unen a otras especies, por ejemplo, mediante simple inspección visual o mediante el uso de dispersión de luz (transmitancia de una solución que contiene las nanopartículas), hasta el uso de técnicas sofisticadas tales como la microscopía electrónica de transmisión (MET) o la microscopía de fuerza atómica (MFA) para visualizar las nanopartículas. Un método de detección adicional de partículas metálicas es emplear resonancia de plasmón que es la excitación de electrones en la superficie de un metal, por lo general provocada por radiación óptica. El fenómeno de la resonancia de plasmón superficial (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*) existe en la interfase de un metal (tal como Ag o Au) y un material dieléctrico tal como aire o agua. Se producen cambios en la SPR cuando los analitos se unen al ligando inmovilizado sobre la superficie de una nanopartícula cambiando el índice de refracción de la interfaz. Una ventaja adicional de la SPR es que puede usarse para controlar las interacciones en tiempo real. Como se ha mencionado anteriormente, si las nanopartículas incluyen o están dopadas con átomos que son activos en RMN, entonces puede usarse esta técnica para detectar las partículas, tanto *in vitro* como *in vivo*, usando técnicas bien conocidas en la técnica. También pueden detectarse nanopartículas usando un sistema basado en la amplificación de la señal cuantitativa usando la reducción de plata (I) promovida por nanopartículas. Puede usarse espectroscopía de fluorescencia si las nanopartículas incluyen ligandos como sondas fluorescentes. Además, el marcado isotópico de los hidratos de carbono puede usarse para facilitar su detección.
- Los ligandos pueden incluir un componente de hidrato de carbono inerte (por ejemplo, glucosa) que permita controlar a voluntad la densidad de antígenos y vehículo en la construcción final.

Antígeno

Un antígeno es una molécula que es reconocida específicamente por las células del sistema inmunitario adaptativo, es decir, linfocitos T o células B o ambos.

5 Los antígenos incluyen proteínas, hidratos de carbono, ácido nucleico o incluso moléculas pequeñas tales como toxinas. En realizaciones preferidas de la presente invención, el antígeno es un antígeno específico de tumor, en particular un antígeno específico de tumor peptídico o de hidrato de carbono. En otras realizaciones preferidas, el antígeno es un antígeno que se encuentra en un agente patógeno, tal como un virus, bacteria o parásito.

10 Los ejemplos de antígenos específicos de tumor de hidrato de carbono incluyen estructuras de Lewis sialiladas y sin sialilar transportadas por las cadenas de hidrato de carbono de glucoproteínas y glucolípidos en la superficie de las células tumorales. Estos antígenos con frecuencia se sobreexpresan en tumores y parecen estar implicados en la adhesión de células tumorales al endotelio. Por ejemplo, sialil Lewis<sup>a</sup> es responsable de la adhesión en células de cáncer de colon, de páncreas y gástrico humanos, mientras que sialil Lewis<sup>x</sup> es responsable de la unión de células de cáncer de pulmón, hígado y ovario. EL sialil Le<sup>A</sup> se sobreexpresa en el cáncer colorrectal, hepático y gástrico (para revisión véase Ugorski y Laskowska (2002), *Acta Biochimica Polonica*, 49, 303-311).

Adyuvante

20 Un adyuvante es un agente que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno. Los adyuvantes pueden potenciar la respuesta de anticuerpos mediante la estimulación de células de la respuesta inmunitaria adaptativa y/o pueden actuar reforzando de forma no específica la actividad del sistema inmunitario innato. En general, los antígenos que potencian la respuesta de anticuerpos lo hacen ya sea concentrando antígeno en sitios apropiados donde estén más expuestos a los linfocitos o mediante la estimulación de la producción de citocinas. De acuerdo con la presente invención, el adyuvante es un adyuvante peptídico que activa linfocitos T cooperadores.

30 Cuando se usan como una plataforma de entrega de vacuna, las nanopartículas por sí mismas pueden actuar como adyuvantes proporcionando el antígeno en forma de partículas de manera que sea ingerido más fácilmente por células presentadoras de antígeno, tales como macrófagos. Sin embargo, este efecto puede potenciarse en gran medida mediante el uso de otros agentes conjugados con las nanopartículas que potencien otros aspectos del sistema inmunitario.

35 Los adyuvantes que aumentan la actividad del sistema inmunitario innato incluyen restos de hidrato de carbono tales como xilosa, fucosa, manosa y N-acetil glucosamina. Éstos funcionan de varias maneras. Pueden unirse a moléculas secretadas que circulan en la sangre y la linfa, que desencadenan la disociación de los componentes del complemento conduciendo a la fijación del complemento. También pueden unirse a receptores de superficie en células fagocíticas tales como macrófagos, tales como CD2-6 (MMR), que estimulan la fagocitosis y la endocitosis

40 Dichos adyuvantes también pueden desempeñar un papel en la estimulación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Pueden unirse a receptores de la superficie celular que inician una señal que conduce a la liberación de moléculas efectoras (citocinas). Por ejemplo, la unión de hidrato de carbono a receptores de tipo Toll en la superficie de células dendríticas provoca que secreten citocinas, incluyendo la interleucina 6 (IL-6), que interfiere con la capacidad de los linfocitos T reguladores de suprimir las respuestas de los linfocitos T efectoras a antígeno.

Las células B también tienen receptores de tipo Toll. Cuando el receptor está unido, potencia la respuesta de la célula B al antígeno.

50 Otros adyuvantes estimulan directamente las células de la respuesta inmunitaria adaptativa. Por ejemplo, pueden usarse péptidos que estimulan respuestas de linfocitos T cooperadores (HTL, del inglés *helper T lymphocyte*), para amplificar la respuesta CTL al péptido antigénico. Dichos péptidos pueden ser, por ejemplo, antígenos altamente inmunógenos de toxoide tetánico que producen una respuesta HTL no específica. Los HTL activados potencian las funciones de proliferación, de supervivencia y efectoras de los CTL.

55 Dichos péptidos tienen una utilidad particular en la potenciación de la respuesta inmunitaria a los antígenos de hidrato de carbono. Aunque los antígenos de hidrato de carbono pueden ser unidos e internalizados por las células B específicas de hidrato de carbono, no pueden activar los HTL que solo se activan mediante péptidos. Sin embargo, las nanopartículas de la invención pueden provocar respuestas tanto de células B como de HTL a medida que se conjugan tanto con el antígeno de hidrato de carbono como con un péptido activador de HTL. Esto proporciona una respuesta inmunitaria muy mejorada.

Administración y tratamiento

65 Las composiciones de nanopartículas de la invención pueden ser para la administración a los pacientes por cualquier número de vías diferentes, incluyendo las vías enterales o parenterales. La administración parenteral

incluye la administración por las siguientes vías: intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal y tópica (incluyendo la dérmica, ocular, rectal, nasal, por inhalación y aerosol) y vías sistémicas rectales.

5 La administración puede realizarse, por ejemplo, mediante inyección o de forma balística usando una pistola de entrega para acelerar su paso transdérmico a través de la capa externa de la epidermis. Las nanopartículas pueden ser recogidas, por ejemplo, por células dendríticas, que maduran a medida que migran a través del sistema linfático, dando como resultado la modulación de la respuesta inmunitaria y la vacunación contra el antígeno. Las nanopartículas también pueden administrarse en aerosoles. Esto se hace posible por el tamaño pequeño de las nanopartículas.

10 El tamaño excepcionalmente pequeño de las nanopartículas de la presente invención es una gran ventaja para la entrega a células y tejidos, ya que pueden ser recogidas por las células incluso cuando están unidas a moléculas de dirección o terapéuticas.

15 Las nanopartículas de la invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas que pueden estar en las formas de composiciones sólidas o líquidas. Dichas composiciones comprenderán generalmente un vehículo de algún tipo, por ejemplo un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante o un diluyente inerte, o un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Dichas composiciones y preparaciones generalmente contienen al menos el 0,1 % en peso del compuesto.

20 Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de la afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Los expertos relevantes en la materia son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, soluciones de los compuestos o un derivado de las mismas, por ejemplo en solución salina fisiológica, una dispersión preparada con glicerol, polietilenglicol líquido o aceites.

25 Además de uno o más de los compuestos, opcionalmente en combinación con otro principio activo, las composiciones pueden comprender uno o más de un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador, agente isotonzante, conservante o antioxidante farmacéuticamente aceptable u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales deben ser atóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, por vía oral o parenteral.

30 Las composiciones farmacéuticas líquidas normalmente se formulan para que tengan un pH de entre aproximadamente 3,0 y 9,0, más preferentemente de entre aproximadamente 4,5 y 8,5 e incluso más preferentemente de entre aproximadamente 5,0 y 8,0. El pH de una composición puede mantenerse mediante el uso de un tampón tal como acetato, citrato, fosfato, succinato, Tris o histidina, empleados normalmente en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 50 mM. El pH de las composiciones puede ajustarse de otro modo usando ácidos o bases fisiológicamente aceptables.

35 Generalmente, se incluyen conservantes en las composiciones farmacéuticas para retardar el crecimiento microbiano, extendiendo la vida útil de las composiciones y permitiendo el envasado de múltiples usos. Los ejemplos de conservantes incluyen fenol, metacresol, alcohol bencílico, ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Normalmente se emplean conservantes en el intervalo de aproximadamente el 0,1 al 1,0 % (p/v).

40 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se proporcionan a un individuo en una cantidad profilácticamente eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz (como sea el caso, aunque la profilaxis puede considerarse terapia), siendo esto suficiente para mostrar un beneficio al individuo. Normalmente, esto será para provocar una actividad terapéuticamente útil proporcionando un beneficio al individuo. La cantidad real de los compuestos administrados y la velocidad y el curso de tiempo de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de la afección que se trate. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones acerca de la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros doctores en medicina y, normalmente, tiene en cuenta el trastorno que se trata, la condición del paciente individual, el sitio de entrega, el método de administración y otros factores conocidos para los médicos. Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en *Handbook of Pharmaceutical Additives*, 2ª edición (editores M. Ash e I. Ash.), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE.UU.); *Remington Pharmaceutical Sciences*, 20ª edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins; y *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2ª edición, 1994. A modo de ejemplo, las composiciones se administran preferentemente a los pacientes en dosis de entre aproximadamente 0,01 y 100 mg de compuesto activo por kg de peso corporal y, más preferentemente, de entre aproximadamente 0,5 y 10 mg/kg de peso corporal.

65 Se entenderá que cuando interesa el tratamiento de tumores, el tratamiento incluye cualquier medida tomada por el médico para aliviar el efecto del tumor sobre un paciente. Por tanto, aunque la remisión completa del tumor es un

objetivo deseable, el tratamiento eficaz también incluirá cualesquiera medidas capaces de conseguir la remisión parcial del tumor, así como una ralentización de la tasa de crecimiento de un tumor incluyendo las metástasis. Dichas medidas pueden ser eficaces en la prolongación y/o la potenciación de la calidad de vida y el alivio de los síntomas de la enfermedad.

5

### Inmunoterapia

Las composiciones de la invención pueden ser para su uso en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades como el cáncer y, más en particular, para la inmunoterapia.

10

En la presente invención, el término "vacunación" significa una inmunización activa, es decir una inducción de una respuesta inmunitaria específica debida a la administración, por ejemplo, a través de las vías subcutánea, intradérmica, intramuscular, oral o nasal, de pequeñas cantidades de un antígeno que es reconocido por el individuo vacunado como extraño y, por tanto, es inmunógeno en una formulación adecuada. El antígeno se usa, por tanto, como un "accionador" para el sistema inmunológico con el fin de construir una respuesta inmunitaria específica contra el antígeno.

15

De acuerdo con la presente invención, las nanopartículas para su uso en la vacunación pueden ser terapéuticas o profilácticas, como es el caso con todas las vacunas antimicrobianas. A modo de ejemplo, puede ser posible conseguir una protección profiláctica contra la aparición de una enfermedad cancerosa mediante la vacunación de las personas que no padecen cáncer. Son ejemplos de individuos a los que se podría aplicar una vacuna profiláctica de este tipo las personas que tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad cancerosa, aunque la presente solicitud no se limita a dichos individuos. Los pacientes que están en riesgo de padecer cáncer ya pueden haber desarrollado tumores, ya sea como tumores primarios o metástasis, o pueden mostrar predisposición para el cáncer.

20

25

Para la inmunización activa de pacientes con cáncer, las estructuras inmunógenas normalmente se formulan como vacunas. Preferentemente, dichas preparaciones farmacéuticas contienen un vehículo farmacéuticamente aceptable, que, a modo de ejemplo, puede comprender adicionalmente sustancias auxiliares, tampones, sales y/o agentes conservantes. Las preparaciones farmacéuticas pueden utilizarse, por ejemplo, para la profilaxis y la terapia de afecciones asociadas al cáncer, tales como la formación de metástasis, en pacientes con cáncer. De este modo, las células presentadoras de antígenos se modulan específicamente in vivo o también ex vivo de manera que se genere la respuesta inmunitaria contra los AAT.

30

Para la inmunización activa con los antígenos específicos o la combinación antigénica por lo general se usa una formulación de vacuna, que contiene el inmunógeno - ya sea un AAT natural o su epítipo, mimético o mimético de neoepítipo, o un anticuerpo inmunogénico - sobre todo a bajas concentraciones, por ejemplo, en una cantidad inmunogénica que varía de 0,01 µg a 10 mg, sin embargo, el intervalo de dosis pueden aumentarse hasta un intervalo de 100 a 500 mg. Dependiendo de la inmunogenia del antígeno de vacunación que, por ejemplo, se determina por las secuencias de una especie foránea o por derivatización, o por ejemplo, también dependiendo de las sustancias auxiliares o adyuvantes, respectivamente, que se usen, la dosis inmunogénica adecuada puede elegirse en el intervalo de 0,01 µg a 1 mg, preferentemente de 100 µg a 500 µg. Una vacuna de depósito que se ha de entregar al organismo durante un período prolongado de tiempo también puede, sin embargo, contener cantidades mucho más grandes de antígeno de vacunación, por ejemplo, de al menos 1 mg a más de 100 mg.

35

40

La concentración dependerá de la cantidad de vacuna líquida o suspendida administrada. Una vacuna por lo general se proporciona en jeringas o ampollas listas para usar que tienen un volumen que varía de 0,01 a 1 ml, preferentemente de 0,1 a 0,75 ml.

45

El antígeno de vacunación de un componente del kit se presenta preferentemente en un vehículo farmacéuticamente aceptable que sea adecuado para la administración subcutánea, intramuscular y también intradérmica o transdérmica. Un modo adicional de administración funciona a través de la vía mucosa, por ejemplo, la vacunación por administración nasal o peroral. Si se emplean sustancias sólidas como agente auxiliar para la formulación de vacuna se administrará, por ejemplo, un adsorbato o una mezcla en suspensión, respectivamente, del antígeno de vacuna con el agente auxiliar. En realizaciones especiales, la vacuna se presenta como una solución o una vacuna líquida en un disolvente acuoso.

50

55

Preferentemente, las unidades de vacunación de una vacuna de tumor ya se proporcionan en una jeringa o ampolla lista para usar adecuada. Una formulación estable de la vacuna puede ponerse en el mercado ventajosamente en una forma lista para usar. Aunque no se requiere necesariamente un contenido de agentes conservantes, tales como timerosal u otros agentes conservantes con una tolerabilidad mejorada, aún así puede proporcionarse en la formulación para una mayor estabilidad a temperaturas de almacenamiento desde temperaturas de refrigeración hasta temperatura ambiente. La vacuna de acuerdo con la invención también puede, sin embargo, proporcionarse en forma congelada o liofilizada y puede descongelarse o reconstituirse, respectivamente, a demanda.

60

Ha demostrado ser adecuada para aumentar la inmunogenia de un anticuerpo utilizado de acuerdo con la invención mediante el empleo de adyuvantes. Para este fin, se usan sustancias sólidas o adyuvantes de vacunas líquidos, por

65

ejemplo, hidróxido de aluminio (Alu-Gel) o fosfato de aluminio, factores de crecimiento, linfocinas, citocinas, tales como IL-2, IL-12, GM-CSF, interferón gamma o factores del complemento, tales como C3d, preparaciones de liposomas adicionales o también formulaciones con antígenos adicionales contra los cuales el sistema inmunitario ya ha generado una fuerte respuesta inmunitaria, tales como el toxoide tetánico, toxinas bacterianas, tales como exotoxinas de *Pseudomonas* y derivados de lípido A y lipopolisacárido.

En el caso de que un péptido toxoide esté unido covalentemente a la estructura del núcleo, la necesidad de adyuvantes podría reducirse o suprimirse.

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1

La preparación y caracterización de nanopartículas cargadas con antígenos de hidrato de carbono, un vehículo T cooperador y glucosa unidas a la superficie de oro se describe a continuación.

Se usaron los ligandos Glc, STn y Le<sup>y</sup> (figura 1). Se eligió un espaciador alifático CA<sub>2</sub> para unir el resto de glucosa a la superficie de oro, mientras que se usó un enlazador alifático C<sub>5</sub> para la unión de ambos antígenos.

El ligando peptídico de T cooperador BC11 (Figura 2) se preparó mediante la unión de un epítipo peptídico de linfocito T promiscuo (FKLQTMVKLFNRIKNNVA) de toxoide tetánico a través del grupo amino terminal a un espaciador alifático C<sub>11</sub>. El ligando peptídico de T cooperador BMIX (figura 3) se preparó mediante la unión del mismo epítipo peptídico de linfocito T de toxoide tetánico a través del grupo amino terminal a un enlazador mixto compuesto por hexaetilenglicol y un espaciador alifático C<sub>11</sub>.

Para la preparación de las gluconanopartículas, se disolvieron Glc, STn, Le<sup>y</sup> y BC11 o BMIX en metanol deuterado en las proporciones deseadas y los espectros de RMN <sup>1</sup>H de estas soluciones se registraron a 500 MHz. Los espectros de estas mezclas permitieron identificar señales que pertenecían de manera inequívoca a los componentes individuales y confirmar que la intensidad de estas señales correspondía a las esperadas de acuerdo con la relación de los diferentes ligandos en la solución original (Figura 4). Después de diluir con metanol las mezclas se trataron como se describe a continuación para proporcionar las correspondientes gluconanopartículas que se purificaron repetidamente por filtración centrífuga. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H de estas construcciones en agua deuterada (Figura 4) indicaron que la relación de ligando original se mantuvo en las GNP obtenidas en las condiciones experimentales utilizadas establecidas previamente. Además, los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los sobrenadantes confirmaron la relación de ligando propuesta.

Siguiendo el procedimiento anterior, se prepararon las siguientes gluconanopartículas: BC11 I (Glc:STn:BC11 28:1:1), BC11 II (Glc:STn:BC11 20:9:1), BC11 III (Glc:STn:Ley:BC11 18:10:1:1), BC11 IV (Glc:STn:Ley:BC11 18:1:10:1), BMIX I (Glc:STn:BMIX 28:1:1), BMIX II (Glc:STn:BMIX 20:9:1), BMIX III (Glc:STn:Ley:BMIX 18:10:1:1), BMIX IV (Glc:STn:Le<sup>y</sup>:BMIX 18:1:10:1), BMIX V (Glc:Le<sup>y</sup>:BMIX 28:1:1) y BMIX VI (Glc:Ley:BMIX 20:9:1).

Los diámetros medios de estas construcciones, determinados usando microscopía electrónica de transmisión (MET) (Figura 5) fueron de 2,25 nm, 1,45 nm, 2,05 nm y 1,81 nm para BC11 I, BC11 II, BC11 III y BC11 IV, respectivamente y 1,80 nm, 1,55 nm, 2,19 nm, 1,77 nm, 1,64 nm y 1,79 nm para BMIX I, BMIX II, BMIX III, BMIX IV, BMIX V y BMIX VI respectivamente. A partir de estos diámetros medios, se estimaron el número de átomos de oro en la agrupación, las cadenas unidas a oro y el peso molecular aproximado de las GNP.<sup>[3]</sup> Estos valores se proporcionan a continuación.

Se han preparado y caracterizado (datos no mostrados) varias gluconanopartículas adicionales (1-4). La composición de estas construcciones es como se indica a continuación:

1 (STn, 100 %), 2 (Le<sup>y</sup>, 100 %), 3 (Glc:STn:enlazador HS(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>COOH 20:1:1), 4 (Glc:STn:enlazador HS(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>COOH 28:1:1).

### 55 Sección experimental

Se adquirieron HAuCl<sub>4</sub> y NaBH<sub>4</sub> de Aldrich Chemical Company. Para todos los experimentos y soluciones, se usó agua Nanopure (18,1 mΩ).

60 *Preparación de nanopartículas de péptido BC11-Au-hidratos de carbono antigénicos.*

#### a) BC11 I (Glc:STn:BC11 28:1:1).

Se disolvió péptido BC11 (3,1 mg, 1,31 μmol) en CF<sub>3</sub>COOD (100 μl) y la solución se concentró en un chorro de argón hasta que se observó la formación de un aceite. Después se añadieron Glc (8,8 mg, 36,7 μmol) y STn (0,8 mg, 1,31 μmol) y la mezcla se disolvió en CD<sub>3</sub>OD (500 μl). El espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostró una relación 28:1:1

entre las señales de Glc, STn y BC11.

La solución se diluyó con MeOH (2,8 ml) y el valor de pH se ajustó a 1 mediante la adición de ácido trifluoroacético. Se añadió una solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  (286  $\mu\text{l}$ , 0,025 M). Después, se añadió solución acuosa 1 N de  $\text{NaBH}_4$  (157  $\mu\text{l}$ ) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión de color negro formada se agitó durante 2 h adicionales y la capa metanólica se separó por decantación. El sólido de color negro se disolvió en agua (700  $\mu\text{l}$ ) y se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 14000 rpm). El proceso se repitió dos veces, hasta que las nanopartículas estuvieron libres de sales y materiales de partida. El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 500  $\mu\text{l}$  de agua y se liofilizó para proporcionar 1,2 mg de nanopartículas BC11 I. MET: diámetro medio de 2,25 nm, 309 átomos de oro, 92 cadenas, PM = 90586.

**b) BC11 II (Glc:STn:BC11 20:9:1).**

Se disolvió péptido BC11 (4,0 mg, 1,7  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CF}_3\text{COOD}$  (100  $\mu\text{l}$ ) y la solución se concentró en un chorro de argón hasta que se observó la formación de un aceite. Después se añadieron Glc (8,1 mg, 33,9  $\mu\text{mol}$ ) y STn (9,3 mg, 15,2  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla se disolvió en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500  $\mu\text{l}$ ). El espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  mostró una relación 20:9:1 entre las señales de Glc, STn y BC11.

La solución se diluyó con MeOH (3,7 ml) y el valor de pH se ajustó a 1 mediante la adición de ácido trifluoroacético. Se añadió una solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  (368  $\mu\text{l}$ , 0,025 M). Después, se añadió solución acuosa 1 N de  $\text{NaBH}_4$  (202  $\mu\text{l}$ ) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión de color negro formada se agitó durante 2 h adicionales y la capa metanólica se separó por decantación<sup>[4]</sup>. El sólido de color negro se disolvió en agua (500  $\mu\text{l}$ ) y se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 14000 rpm). El proceso se repitió dos veces, hasta que las nanopartículas estuvieron libres de sales y materiales de partida. El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 500  $\mu\text{l}$  de agua y se liofilizó para proporcionar 1,8 mg de nanopartículas BC11 II. MET: diámetro medio de 1,45 nm, 116 átomos de oro, 53 cadenas, PM = 45358.

**c) BC11 III (Glc:STn:Le<sup>Y</sup>:BC1 18:10:1:1).**

Se disolvió péptido BC11 (2,8 mg, 1,2  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CF}_3\text{COOD}$  (100  $\mu\text{l}$ ) y la solución se concentró en un chorro de argón hasta que se observó la formación de un aceite. Después se añadieron Glc (5,1 mg, 21,3  $\mu\text{mol}$ ), Le<sup>Y</sup> (0,9 mg, 1,2  $\mu\text{mol}$ ) y STn (7,3 mg, 11,8  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla se disolvió en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500  $\mu\text{l}$ ). El espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  mostró una relación 18:10:1:1 entre las señales de Glc, STn, Le<sup>Y</sup> y BC11.

La solución se diluyó con MeOH (2,4 ml) y el valor de pH se ajustó a 1 mediante la adición de ácido trifluoroacético. Se añadió una solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  (256  $\mu\text{l}$ , 0,025 M). Después, se añadió solución acuosa 1 N de  $\text{NaBH}_4$  (142  $\mu\text{l}$ ) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión de color negro formada se agitó durante 2 h adicionales y la capa metanólica se separó por decantación<sup>[4]</sup>. El sólido de color negro se disolvió en agua (500  $\mu\text{l}$ ) y se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 14000 rpm). El proceso se repitió dos veces, hasta que las nanopartículas estuvieron libres de sales y materiales de partida. El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 500  $\mu\text{l}$  de agua y se liofilizó para proporcionar 0,5 mg de nanopartículas BC11 III. MET: diámetro medio de 2,05 nm, 225 átomos de oro, 71 cadenas, PM = 76661.

**d) BC11 IV (Glc:STn:Ley:BC11 18:1:10:1).**

Se disolvió péptido BC11 (2,7 mg, 1,1  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CF}_3\text{COOD}$  (100  $\mu\text{l}$ ) y la solución se concentró en un chorro de argón hasta que se observó la formación de un aceite. Después se añadieron Glc (4,9 mg, 20,6  $\mu\text{mol}$ ), Le<sup>Y</sup> (8,8 mg, 11,4  $\mu\text{mol}$ ) y STn (0,7 mg, 1,1  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla se disolvió en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500  $\mu\text{l}$ ). El espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  mostró una relación 18:1:10:1 entre las señales de Glc, STn, Le<sup>Y</sup> y BC11.

La solución se diluyó con MeOH (2,3 ml) y el valor de pH se ajustó a 1 mediante la adición de ácido trifluoroacético. Una solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  (248  $\mu\text{l}$ , 0,025 M) se añadió. Después, se añadió solución acuosa 1 N de  $\text{NaBH}_4$  (137  $\mu\text{l}$ ) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión de color negro formada se agitó durante 2 h adicionales y la capa metanólica se separó por decantación<sup>[4]</sup>. El sólido de color negro se disolvió en agua (500  $\mu\text{l}$ ) y se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 14000 rpm). El proceso se repitió dos veces, hasta que las nanopartículas estuvieron libres de sales y materiales de partida. El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 500  $\mu\text{l}$  de agua y se liofilizó para proporcionar 1,2 mg de nanopartículas BC11 IV. MET: diámetro medio de 1,81 nm, 201 átomos de oro, 71 cadenas, PM = 75409.

60 *Preparación de nanopartículas de péptido BMIX-Au-hidratos de carbono antigénicos.*

**a) BMIX I (Glc:STn:BMIX 28:1:1).**

Se disolvió péptido BMIX (3,1 mg, 1,31  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CF}_3\text{COOD}$  (100  $\mu\text{l}$ ) y la solución se concentró en un chorro de argón hasta que se observó la formación de un aceite. Después se añadieron Glc (8,8 mg, 36,7  $\mu\text{mol}$ ) y STn (0,8 mg, 1,31  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla se disolvió en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500  $\mu\text{l}$ ). El espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  mostró una relación 28:1:1

entre las señales de Glc, STn y BMIX.

La solución se diluyó con MeOH (2,7 ml, volumen total: 3,2 ml) y el valor de pH se ajustó a 1 mediante la adición de ácido trifluoroacético. Se añadió una solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  (314  $\mu\text{l}$ , 0,025 M). Después, se añadió solución acuosa 1 N de  $\text{NaBH}_4$  (157  $\mu\text{l}$ ) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión de color negro formada se agitó durante 2 h adicionales y la capa metanólica se separó por decantación<sup>[2]</sup>. El sólido de color negro se disolvió en agua (700  $\mu\text{l}$ ) y se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 14000 rpm). El proceso se repitió dos veces, hasta que las nanopartículas estuvieron libres de sales y materiales de partida. El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 500  $\mu\text{l}$  de agua y se liofilizó para proporcionar 1,0 mg de nanopartículas BMIX I.

MET: diámetro medio de 1,80 nm, 201 átomos de oro, 71 cadenas, PM = 63300.

#### **b) BMIX II (Glc:STn:BMIX 20:9:1).**

Se disolvió péptido BMIX (3,5 mg, 1,31  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CF}_3\text{COOD}$  (100  $\mu\text{l}$ ) y la solución se concentró en un chorro de argón hasta que se observó la formación de un aceite. Después se añadieron Glc (6,3 mg, 26,2  $\mu\text{mol}$ ) y STn (7,2 mg, 11,7  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla se disolvió en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500  $\mu\text{l}$ ).

El espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  mostró una relación 20:9:1 entre las señales de Glc, STn y BMIX.

La solución se diluyó con MeOH (2,7 ml, volumen total: 3,2 ml) y el valor de pH se ajustó a 1 mediante la adición de ácido trifluoroacético. Se añadió una solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  (314  $\mu\text{l}$ , 0,025 M). Después, se añadió solución acuosa 1 N de  $\text{NaBH}_4$  (157  $\mu\text{l}$ ) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión de color negro formada se agitó durante 2 h adicionales. Es ésta, fue imposible separar la capa metanólica por decantación. Después, el volumen se redujo a 1 ml, se añadió agua (700  $\mu\text{l}$ ) y se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 14000 rpm). El proceso se repitió dos veces, hasta que las nanopartículas estuvieron libres de sales y materiales de partida. El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 500  $\mu\text{l}$  de agua y se liofilizó para proporcionar 2,5 mg de nanopartículas BMIX II.

MET: diámetro medio de 1,55 nm, 140 átomos de oro, 53 cadenas, PM = 50567.

#### **c) BMIX III (Glc:STn:Le<sup>y</sup>:BC1 18:10:1:1).**

Se disolvió péptido BMIX (3,9 mg, 1,46  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CF}_3\text{COOD}$  (100  $\mu\text{l}$ ) y la solución se concentró en un chorro de argón hasta que se observó la formación de un aceite. Después se añadieron Glc (6,3 mg, 26,2  $\mu\text{mol}$ ), Le<sup>y</sup> (1,1 mg, 1,46  $\mu\text{mol}$ ) y STn (9,0 mg, 14,6  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla se disolvió en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500  $\mu\text{l}$ ). El espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  mostró una relación 18:10:1:1 entre las señales de Glc, STn, Le<sup>y</sup> y BMIX.

La solución se diluyó con MeOH (3,2 ml, volumen total: 3,7 ml). Se añadió una solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  (350  $\mu\text{l}$ , 0,025 M). Después, se añadió solución acuosa 1 N de  $\text{NaBH}_4$  (193  $\mu\text{l}$ ) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión de color negro formada se agitó durante 2 h adicionales y la capa metanólica se separó por decantación<sup>[2]</sup>. El sólido de color negro se disolvió en agua (500  $\mu\text{l}$ ) y se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 14000 rpm). El proceso se repitió dos veces, hasta que las nanopartículas estuvieron libres de sales y materiales de partida. El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 500  $\mu\text{l}$  de agua y se liofilizó para proporcionar 2,8 mg de nanopartículas BMIX III. MET: diámetro medio de 2,19 nm, 309 átomos de oro, 92 cadenas, PM = 103569.

#### **d) BMIX IV (Glc:STn:Le<sup>y</sup>:BMIX 18:1:10:1).**

Se disolvió péptido BMIX (3,7 mg, 1,38  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CF}_3\text{COOD}$  (100  $\mu\text{l}$ ) y la solución se concentró en un chorro de argón hasta que se observó la formación de un aceite. Después se añadieron Glc (6,0 mg, 24,8  $\mu\text{mol}$ ), Le<sup>y</sup> (10,7 mg, 13,8  $\mu\text{mol}$ ) y STn (0,85 mg, 1,38  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla se disolvió en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500  $\mu\text{l}$ ). El espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  mostró una relación 18:1:10:1 entre las señales de Glc, STn, Le<sup>y</sup> y BMIX.

La solución se diluyó con MeOH (3,0 ml, volumen total: 3,5 ml) y el valor de pH se ajustó a 1 mediante la adición de ácido trifluoroacético. Se añadió una solución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  (330  $\mu\text{l}$ , 0,025 M). Después, se añadió solución acuosa 1 N de  $\text{NaBH}_4$  (182  $\mu\text{l}$ ) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión de color negro formada se agitó durante 2 h adicionales y la capa metanólica se separó por decantación<sup>[2]</sup>. El sólido de color negro se disolvió en agua (500  $\mu\text{l}$ ) y se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 14000 rpm). El proceso se repitió dos veces, hasta que las nanopartículas estuvieron libres de sales y materiales de partida. El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 500  $\mu\text{l}$  de agua y se liofilizó para proporcionar 1,8 mg de nanopartículas BMIX IV.

MET: diámetro medio de 1,77 nm, 201 átomos de oro, 71 cadenas, PM = 75934.

#### **e) BMIX V (Glc:Le<sup>y</sup>:BMIX 28:1:1).**

Se disolvió péptido BMIX (3,7 mg, 1,4  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CF}_3\text{COOD}$  (100  $\mu\text{l}$ ) y la solución se concentró en un chorro de argón hasta que se observó la formación de un aceite. Después se añadieron Glc (9,4 mg, 39,1  $\mu\text{mol}$ ) y Le<sup>y</sup> (1,1 mg, 1,4  $\mu\text{mol}$ ) y la mezcla se disolvió en  $\text{CD}_3\text{OD}$  (500  $\mu\text{l}$ ). El espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  mostró una relación 28:1:1 entre las señales de Glc, Le<sup>y</sup> y BMIX.

La solución se diluyó con MeOH (3,0 ml, volumen total: 3,5 ml) y el valor de pH se ajustó a 1 mediante la adición de ácido trifluoroacético. Se añadió una solución acuosa de HAuCl<sub>4</sub> (331 µl, 0,025 M). Después, se añadió solución acuosa 1 N de NaBH<sub>4</sub> (182 µl) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión de color negro formada se agitó durante 2 h adicionales y la capa metanólica se separó por decantación<sup>[2]</sup>. El sólido de color negro se disolvió en agua (700 µl) y se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 14000 rpm). El proceso se repitió dos veces, hasta que las nanopartículas estuvieron libres de sales y materiales de partida. El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 500 µl de agua y se liofilizó para proporcionar 0,7 mg de nanopartículas BMIX V. MET: diámetro medio de 1,64 nm, 140 átomos de oro, 53 cadenas, PM = 45568.

#### 10 f) BMIX VI (Glc:Le<sup>y</sup>:BMIX 20:9:1).

Se disolvió péptido BMIX (3,5 mg, 1,31 µmol) en CF<sub>3</sub>COOD (100 µl) y la solución se concentró en un chorro de argón hasta que se observó la formación de un aceite. Después se añadieron Glc (6,3 mg, 26,2 µmol) y Le<sup>y</sup> (9,2 mg, 11,8 µmol) y la mezcla se disolvió en CD<sub>3</sub>OD (500 µl). El espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostró una relación 20:9:1 entre las señales de Glc, Le<sup>y</sup> y BMIX.

La solución se diluyó con MeOH (2,7 ml, volumen total: 3,2 ml) y el valor de pH se ajustó a 1 mediante la adición de ácido trifluoroacético. Se añadió una solución acuosa de HAuCl<sub>4</sub> (314 µl, 0,025 M). Después, se añadió solución acuosa 1 N de NaBH<sub>4</sub> (157 µl) en varias porciones con agitación rápida. La suspensión de color negro formada se agitó durante 2 h adicionales. En ésta, fue imposible separar la capa metanólica por decantación. Después, el volumen se redujo a 1 ml, se añadió agua (700 µl) y se purificó por filtración centrífuga (AMICON PM 10000, 30 min, 14000 rpm). El residuo en el filtro AMICON se disolvió en 500 µl de agua y se liofilizó para proporcionar 1,8 mg de nanopartículas BMIX VI. MET: diámetro medio de 1,79 nm, 201 átomos de oro, 71 cadenas, PM = 73864.

#### *Uso de nanopartículas conjugadas con antígeno para inducir una respuesta inmunitaria*

Se usaron nanopartículas BC11 I, II, III y IV para inocular ratones y se controló la reacción inmunitaria al antígeno conjugado. Se inyectaron 30 µg nanopartículas en 200 µl de adyuvante (Sigma M-6536-MPL+TDM). Se proporcionaron cuatro inyecciones de 2 x 100 µl los días 0, 28, 40 y 157. Las tres primeras se proporcionaron por vía subcutánea y la inyección final por vía intraperitoneal. Se extrajeron muestras de sangre el día 39, 48 y 67 y se determinó el título de IgG contra HSA-Le<sup>y</sup> (Figuras 7 y 8). Existe una gran diferencia entre el resultado visto con BC11 I/II y BC11 III/IV. El aumento en el título contra Le<sup>y</sup> en BC11 I/II es un efecto inespecífico debido al uso del adyuvante. Tras la inmunización repetida los títulos no aumentan, pero comienzan a disminuir. Por el contrario, con BC11 III/IV, los títulos aumentan con la inmunización de refuerzo demostrando un efecto de inmunización real.

Se usó BC11 II para la inoculación de la primovacunación con toxoide tetánico. El día 0, los animales fueron inyectados por vía subcutánea con 2,35 UI de toxoide tetánico de Aventis Pasteur MSD-DIFTAVAX (2 viales completados hasta un total de 3,4 ml con solución salina al 0,9 % y 100 µl administrados). El día 14 se inyectaron 50 µg de nanopartículas en 2 x 100 µl por vía subcutánea en adyuvante (Sigma M-6536) y el día 34 se inyectaron 50 µg de nanopartículas en 2 x 100 µl por vía intraperitoneal en adyuvante. Se extrajeron muestras de sangre el día 33 y 44. Los resultados para 5 ratones se muestran en la Figura 9 (diferentes animales están representados por diferentes señales). La primera flecha indica la primovacunación con toxoide tetánico, la segunda flecha la inyección subcutánea con nanopartículas y la tercera flecha la inyección intraperitoneal con nanopartículas.

#### Ejemplo 2

#### Nanopartículas de oro como estructuras inmunógenas

Se fabrican formulaciones de nanopartículas de oro de acuerdo con las técnicas que se describen en el documento WO 02/32404. Se prepararán diferentes construcciones de nanopartículas de oro con una relación de alfa-sialil-Tn:Lewis y = 30:3 y 3:30 con diversas densidades de la secuencia peptídica FKLQTMVKLFNRIKNNVA. El espacio de apoyo puede bloquearse usando Glc-C2. Como alternativa, el enlazador también puede tener la secuencia FKFQILYNSIMG.

La relación de Sialil-Tn o Lewis y o una combinación de ambos enlazadores también puede aumentarse usando la técnica de acuerdo con el documento WO 02/32404. Por ejemplo, pueden unirse fácilmente hasta varios cientos de grupos hidrato de carbono a la molécula núcleo. Las proporciones de diferentes ligandos pueden variarse fácilmente. Como alternativa, también puede haber un solo hidrato de carbono de Sialil Tn o Lewis y unido covalentemente a la molécula núcleo.

#### *Anticuerpos como estructuras inmunógenas*

El acoplamiento de un hidrato de carbono de SialilTn a HE2 SialilTn-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COO-pNp se acopló a HE2. Con el fin de aumentar el número de ligandos de hidrato de carbono de SialilTn, pueden usarse enlazadores

ramificados bien conocidos en la técnica para acoplar los ligandos de hidrato de carbono en el anticuerpo. El producto final se analizó por SEC, LDS-PAGE, Transferencia Western y diferentes ensayos ELISA.

Sección experimental

5 *Materiales y métodos*

HE2 Panorex, 10 mg/ml, SialilTn-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COO-pNp Lote 170901, 2 x 5 mg, Fa. Lectinity DMF (N,N-dimetilformamida (anhidra, Merck)

10 Tampón de acoplamiento: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M + NaCl 0,15 M (pH = 8)  
Tampón de formulación: NaCl al 0,86 % + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM (pH = 6,0).

*Procedimiento*

- 15 1. Se dializaron 100 mg de HE2 (V = 10 ml; Conc: 10 mg/ml) frente a 2x 700 ml usando Tampón de Acoplamiento usando un módulo de diálisis Slide-a-Lyzer a 4 °C durante 20 horas, hasta un volumen de ~10 ml, concentración de acuerdo con SEC ~10 mg/ml.  
2. Se disolvieron 2x 5 mg de SialilTn-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COO-pNp con 2x 100 µl de DMF (100 µl/vial).  
20 3. La solución de SialilTn (en DMF) se añadió a ~10 ml (~100 mg) de HE2 enfriado con hielo (en tampón de acoplamiento).  
4. Ambos viales de SialilTn se aclararon con 100 µl de DMF (transferir del Vial 1 al Vial 2), que también se añadió a la mezcla de reacción.  
5. La mezcla de reacción se hizo girar durante la noche (28 h) a +4 °C. La cinética de la reacción se observó mediante SEC (véase 5.3.1 y 6.3.1).  
25 6. La solución final de HE2-SialilTn (10 ml, ~10 mg/ml) se dializó frente a 2 x 800 ml de Tampón de Formulación usando un módulo de diálisis Slide-a-Lyzer a 4 °C durante 20 horas.

Análisis

30 *Cromatografía de exclusión molecular*

Se cuantificaron concentraciones de HE2-SialilTn mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC, del inglés *Size Exclusion Chromatography*) en una columna ZORBAX GF-250 en un sistema Dionex. El sistema de HPLC se sometió a ensayo con el patrón de filtración en gel (Fa. BioRad). Se usó HE2 como patrón de referencia para la  
35 cuantificación de HE2-SialilTn. La disminución en el tiempo de retención (se correlaciona con el aumento en el peso molecular) se correlaciona con la eficacia de la reacción de acoplamiento de SialilTn a HE2. Los datos recibidos muestran que la eficacia de acoplamiento aumenta con el tiempo de reacción alcanzando la saturación en 23-27 horas.

40 *LDS-PAGE (PAGE con Dodecilsulfato de litio)*

LDS-PAGE con Bis-Tris-Gel (4-12 %) Tinción SilverXpress™: véase el manual de instrucciones "NuPAGE Bis-Tris-Gel", página 13. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Calle	Muestra	Conc.	Volúmenes [µl]	Preparación
1	Patrón de PM 12 Mark	-	10	Ninguna
2	HE2 dializado en tampón de Acoplamiento	20 µg/ml	10	Véase SOP
3	HE2 dializado en tampón de Acoplamiento	10 µg/ml	10	Véase SOP
4	HE2 dializado en tampón de Acoplamiento	50 µg/ml	10	Véase SOP
5	HE2 dializado en tampón de Acoplamiento	2,5 µg/ml	10	Véase SOP
6	HE2SiaTn dializado en tampón de Formulación	20 µg/ml	10	Véase SOP
7	HE2SiaTn dializado en tampón de Formulación	10 µg/ml	10	Véase SOP
8	HE2SiaTn dializado en tampón de Formulación	5 µg/ml	10	Véase SOP
9	HE2SiaTn dializado en tampón de Formulación	2,5 µg/ml	10	Véase SOP
10	Patrón de PM 12 Mark	-	10	Ninguna

45 *Transferencia Western*

*Transferencia Western con IgG2a de conejo x ratón*

- 50 1. LDS-Gel con Bis-Tris-Gel (4-12 %)  
2. Instrucciones de Transferencia Western, véase el manual de instrucciones NuPAGE Bis-Tris-Gel páginas 14-20 (con membrana de transferencia de PVDF Immobilon 0,45 µm, Fa. Millipore)

3. Desarrollo de la membrana:

*Material:*

- 5 Conjugado: IgG2a de conejo x ratón - HRP, n.º 61-0220, Fa. Zymed  
 Solución de tinción 1: 15 mg HRP - Reactivo de Color (Fa. BioRAD) en 5 ml de MetOH.  
 Solución de tinción 2: 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % en 25 ml de PBS def. 1x

*Procedimiento:*

- 10 Bloquear la membrana con leche en polvo desnatada al 3 % en PBS durante 1 hora a TA.  
 Lavar la membrana con PBS.  
 Incubar con conjugado (diluido 1:1000 en PBS) durante 1 hora a TA.  
 Lavar la membrana con PBS.  
 15 Desarrollar con soluciones de tinción 1+2 y detener con agua.

Transferencia Western con CD175s anti SialilTn (tipo IgG)/IgG1 de rata x ratón - HRP.

*Procedimiento:*

- 20 1. Gel de LDS-PAGE con Bis-Tris-Gel (4-12 %).  
 2. Transferencia de Western: Instrucciones véase el manual de instrucciones "NuPAGE Bis-Tris-Gel", página 14-20 (usando membrana de transferencia de PVDF Immobilon 0,45 µm, Fa. Millipore)  
 3. Desarrollo de la membrana:

*Material:*

- 25 Ab secundario: CD175s anti-SialilTn (de tipo IgG), 90 µg/ml, Fa. DAKO, Código n.º M0899, Lote 089(601).  
 Conjugado: IgG1 de rata x ratón - HRP, Fa. Becton Dickinson, Mat. n.º 559626, lote: 37205.  
 30 Leche en polvo desnatada al 3 % en PBS def. 1x.  
 Solución de tinción 1: 15 mg de HRP - Reactivo de Color (Fa. BioRAD) en 5 ml de MetOH.  
 Solución de tinción 2: 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % en 25 ml de PBS.

*Procedimiento:*

- 35 Bloquear la membrana con leche en polvo desnatada al 3 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente (TA).  
 Lavar la membrana con PBS.  
 Incubar con Ab secundario, (concentración 10 µg/ml) V = 5 ml, durante 1 hora a TA.  
 Lavar la membrana con PBS.  
 40 Incubar con conjugado (diluido 1:1000 en PBS) durante 1 hora a TA.  
 Lavar la membrana con PBS.  
 Desarrollar con soluciones de tinción 1+2 y detener con agua.

- 45 El aumento en el peso molecular de la cadena pesada del anticuerpo HE2 después del acoplamiento con SialilTn se confirmó mediante Transferencia Western y tinción con un anticuerpo IgG2a de conejo anti ratón - HRP.

Se realizó un ELISA convencional con el fin de mostrar cuánta de la actividad de unión anti-idiotípica (de HE2) se conserva en el producto de acoplamiento

- 50 El IGN111 inmovilizado atrapa el HE2 anti-idiotípico que se detecta mediante IgG2a anti-ratón - HRP. Se demostró que el HE2 es aproximadamente 2-3 veces más reactivo que el HE2-SialilTn, lo que indica que solo se produce una pérdida muy moderada de la unión después del acoplamiento.

- 55 Se realizó un ELISA convencional adicional para detectar SialilTn mediante anti-SialilTn-anticuerpo de ratón. En el mismo el material de partida HE2 y el producto de acoplamiento HE2-SialilTn se inmovilizan. Para la detección, se usan anti-SialilTn (IgG de ratón)/IgG1 de rata anti ratón - HRP para la detección de SialilTn.

- Los resultados muestran que el producto de reacción HE2-SialilTn en realidad lleva SialilTn a diferencia del HE2 antes del acoplamiento.

60 Conclusiones

- 65 Se ha acoplado SialilTn satisfactoriamente al anticuerpo HE2. La reacción de acoplamiento tiene una cinética de tiempo más bien prolongada, alcanzando la saturación aproximadamente después de 24 horas. Se ha acoplado SialilTn principalmente a la cadena pesada del anticuerpo HE2, mientras que la cadena ligera solo se ha acoplado parcialmente con SialilTn. El producto de acoplamiento HE2-SialilTn conserva la mayor parte de la especificidad

idiotípica de HE2 y la parte SialilTn de esta neoglicoproteína es reconocida por anticuerpos específicos de SialilTn. Los niveles de endotoxina están por debajo del límite de detección.

**Referencias**

- 5 [1] J. M. de la Fuente, A. G. Barrientos, T. C. Rojas, J. Cañada, A. Fernández, S. Penadés, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 2257.
- [2] A. G. Barrientos, J. M. de la Fuente, T. C. Rojas, A. Fernández, S. Penadés, *Chem. Eur. J.*, 2003, 9, 1909.
- 10 [3] M. J. Hostetler, J. E. Wingate, C. Z. Zhong, J. E. Harris, R. W. Vachet, M. R. Clark, J. D. Londono, S. J. Green, J. J. Stokes, G. D. Wignall, G. L. Clish, M. D. Porter, N. D. Evans, R. W. Murray, *Langmuir*, 1998, 14, 17.
- [4] Esta capa metanólica se concentró a presión reducida. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H del residuo mostró la misma relación inicial, aproximadamente, entre las señales de **Glc**, **STn**, **Le<sup>y</sup>** y **BC11**.

**REIVINDICACIONES**

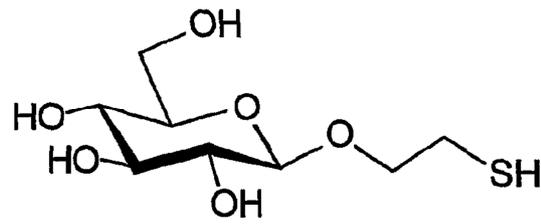
1. Una nanopartícula que comprende un núcleo que incluye átomos metálicos y/o semiconductores, en la que el núcleo está covalentemente unido a una pluralidad de ligandos y los ligandos comprenden
- 5 al menos un antígeno, y  
al menos un adyuvante peptídico que activa linfocitos T cooperadores,
- y en donde el núcleo de la nanopartícula tiene un diámetro medio de entre 0,5 y 10 nm.
- 10 2. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde la nanopartícula comprende adicionalmente al menos un ligando que comprende un grupo monosacárido.
3. La nanopartícula de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el adyuvante peptídico comprende un sitio de escisión de proteasa.
- 15 4. La nanopartícula de la reivindicación 3, en la que el péptido comprende la secuencia de aminoácidos FKLQTMVKLFNRIKNNVA.
- 20 5. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el antígeno es un antígeno específico de tumor.
6. La nanopartícula de la reivindicación 5, en la que el antígeno es un antígeno de hidrato de carbono.
- 25 7. La nanopartícula de la reivindicación 6, en la que el antígeno está sialilado.
8. La nanopartícula de la reivindicación 7, en la que el antígeno es sialil Tn, sialil Lewis a, sialil Lewis x o sialil Lewis y.
- 30 9. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el antígeno es un antígeno específico de patógeno.
10. La nanopartícula de la reivindicación 9, en la que el patógeno es una bacteria, un virus o un parásito.
- 35 11. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos uno de los ligandos está unido a la nanopartícula a través de un grupo enlazador.
12. La nanopartícula de la reivindicación 11, en la que el grupo enlazador comprende un grupo tiol, un grupo alquilo, un grupo glicol o un grupo peptídico.
- 40 13. La nanopartícula de la reivindicación 12, en la que el grupo enlazador comprende alquilo C2-C15 y/o glicol C2-C15.
14. La nanopartícula de la reivindicación 13, en la que el grupo enlazador es alquilo C2-C15 o hexaetilenglicol-alquilo C11.
- 45 15. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la nanopartícula comprende un marcador.
- 50 16. La nanopartícula de la reivindicación 15, en la que el marcador es un grupo fluorescente, un radionúclido, un marcador magnético, un colorante, un átomo activo en RMN o un átomo que es susceptible de detección usando resonancia de plasmón superficial.
17. La nanopartícula de la reivindicación 16, en la que el marcador magnético es un grupo paramagnético que comprende  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  o lantánidos<sup>+3</sup>.
- 55 18. La nanopartícula de la reivindicación 16, en la que el átomo activo en RMN es  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  o lantánidos<sup>+3</sup>.
- 60 19. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la nanopartícula es hidrosoluble.
20. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el núcleo de la nanopartícula tiene un diámetro medio de entre 1 y 2,5 nm.
- 65 21. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la nanopartícula incluyendo sus ligandos tiene un diámetro medio de entre 10 y 30 nm.

22. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el núcleo es un núcleo metálico.
23. La nanopartícula de la reivindicación 22, en la que el núcleo metálico comprende Au, Ag o Cu.
- 5 24. La nanopartícula de la reivindicación 22 o la reivindicación 23, en la que el núcleo metálico es una aleación seleccionada entre Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd, Au/Ag/Cu/Pd, Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd o Au/Fe/Cu/Gd.
- 10 25. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde el núcleo de la nanopartícula es magnético.
26. La nanopartícula de la reivindicación 25, en donde la nanopartícula comprende átomos metálicos pasivos y átomos metálicos magnéticos en el núcleo en una relación de entre 5:0,1 y 2:5.
- 15 27. La nanopartícula de la reivindicación 26, en la que el metal pasivo es oro, platino, plata o cobre y el metal magnético es hierro o cobalto.
28. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que el núcleo comprende átomos semiconductores.
- 20 29. La nanopartícula de la reivindicación 28, en la que los átomos semiconductores son capaces de actuar como un punto cuántico.
30. La nanopartícula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los ligandos comprenden además un péptido, un dominio de proteína, un segmento de ácido nucleico, un glucolípido o una glucoproteína.
- 25 31. La nanopartícula de la reivindicación 30, en la que dicho segmento de ácido nucleico comprende ADN o ARN.
32. Una composición que comprende una población de una o más de las nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 30 33. Una composición de acuerdo con la reivindicación 32 que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 34. Un método de preparación de nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 mediante la conjugación del dicho al menos un antígeno y el dicho al menos un adyuvante peptídico que activa linfocitos T cooperadores con el núcleo de la nanopartícula, comprendiendo el método:
- 40 derivatizar el antígeno con un enlazador;  
 derivatizar el adyuvante peptídico con un enlazador; y  
 hacer reaccionar el antígeno y el adyuvante peptídico derivatizados con enlazador con reactivos para producir el núcleo de la nanopartícula de manera que durante el autoensamblaje de las nanopartículas, los núcleos de nanopartículas se unan al antígeno y el adyuvante peptídico a través del enlazador.
- 45 35. El método de la reivindicación 34, en el que el grupo enlazador comprende un grupo tiol, un grupo alquilo, un grupo glicol o un grupo peptídico.
36. El método de la reivindicación 34, en el que el grupo enlazador comprende alquilo C2-C15 y/o glicol C2-C15.
- 50 37. El método de la reivindicación 34, en el que el grupo enlazador es alquilo C2-C15 o hexaetilenglicol-alquilo C11.
38. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, en el que la mezcla de reacción comprende el antígeno derivatizado, el adyuvante derivatizado, una sal de los átomos metálicos y/o semiconductores y un agente reductor para producir las nanopartículas.
- 55 39. Nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, o una composición de la reivindicación 32 o la reivindicación 33, para su uso en terapia preventiva o paliativa.
- 60 40. Nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, o una composición de la reivindicación 32 o la reivindicación 33, para su uso como una vacuna.
41. Las nanopartículas de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 65 42. Las nanopartículas para el uso de la reivindicación 41, en donde el cáncer es cáncer de colon, páncreas, intestino, pulmón, hígado, ovario o vejiga.

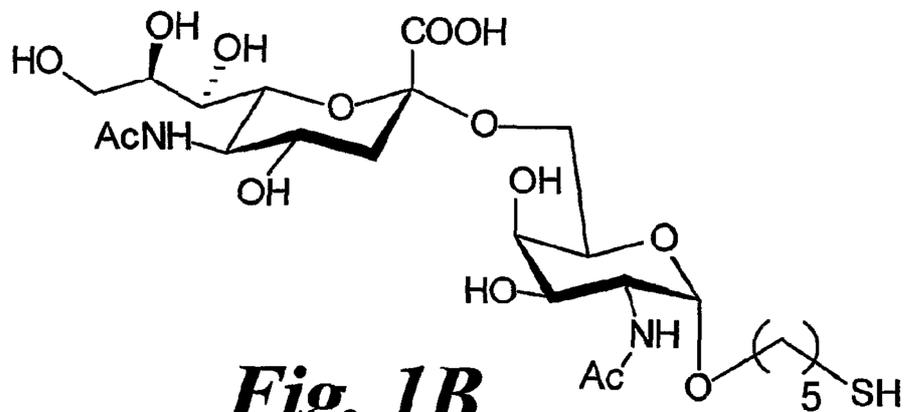
43. Las nanopartículas de la reivindicación 9 o la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

44. Las nanopartículas para el uso de la reivindicación 43, en donde la enfermedad es la malaria o la tuberculosis.

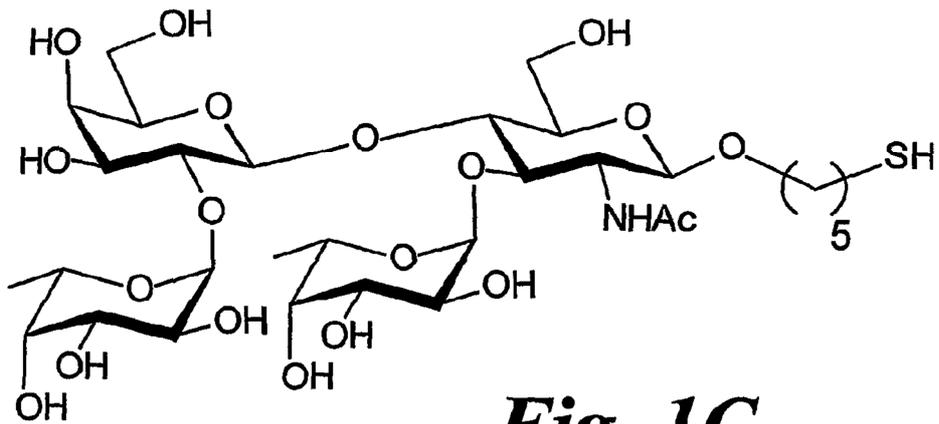
5 45. Las nanopartículas para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 44, en donde las nanopartículas comprenden una señal de translocación de membrana de manera que sean capaces de penetrar a través de la membrana celular.



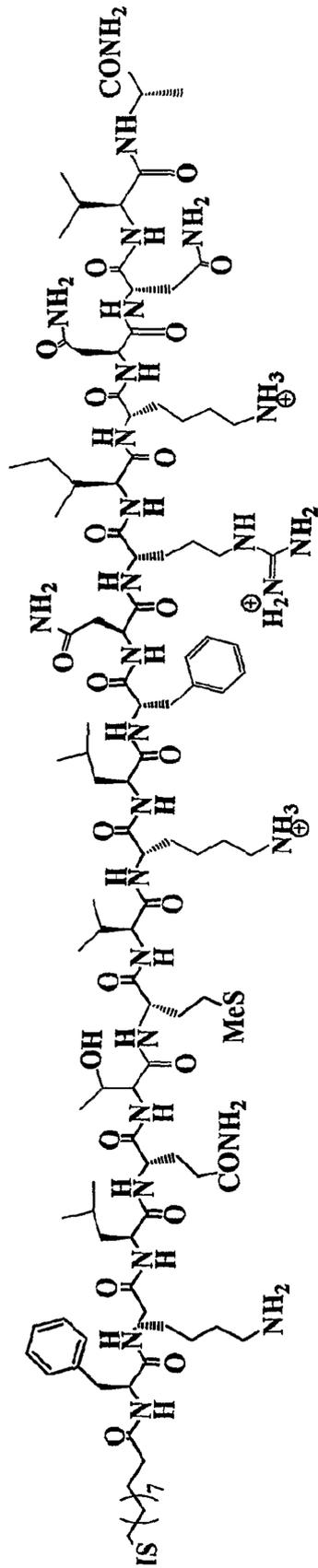
**Fig. 1A**



**Fig. 1B**



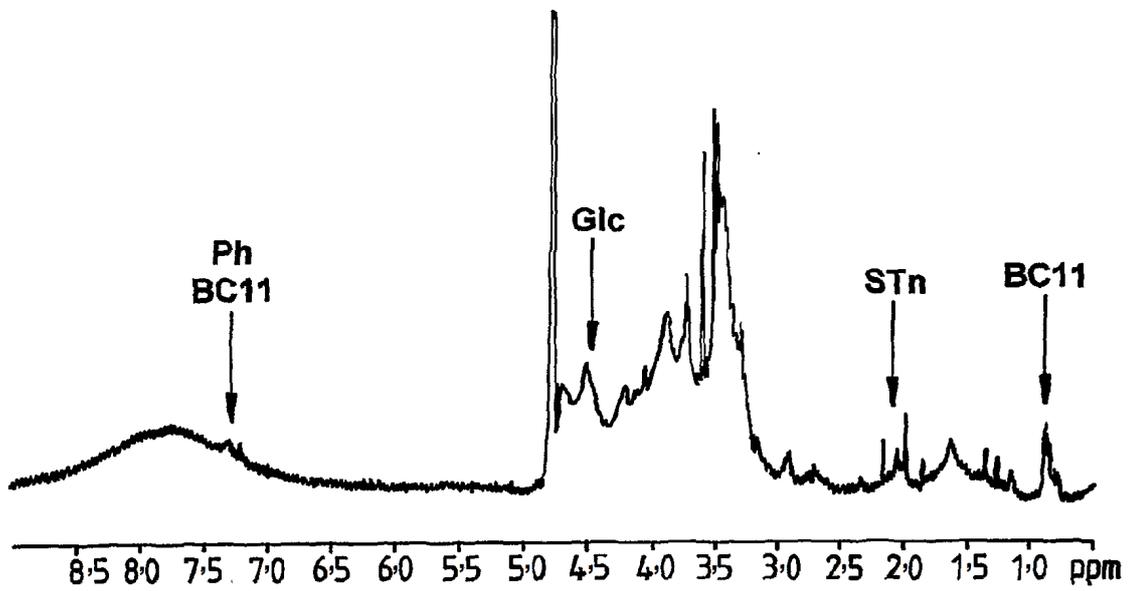
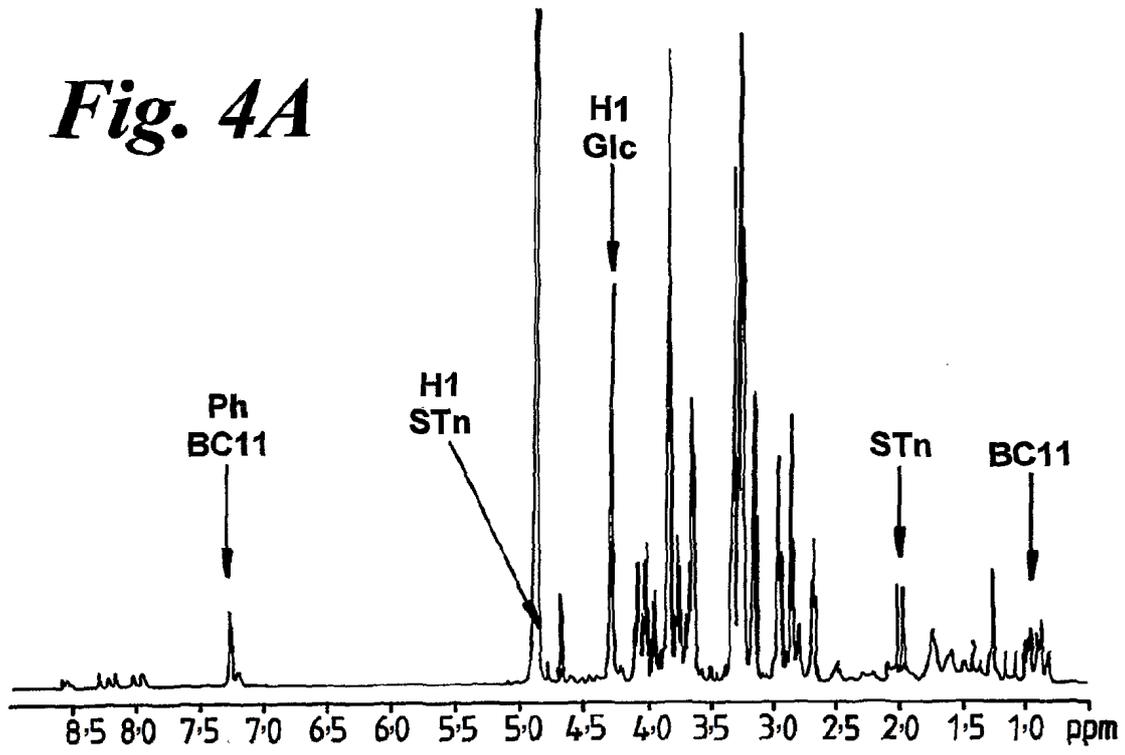
**Fig. 1C**



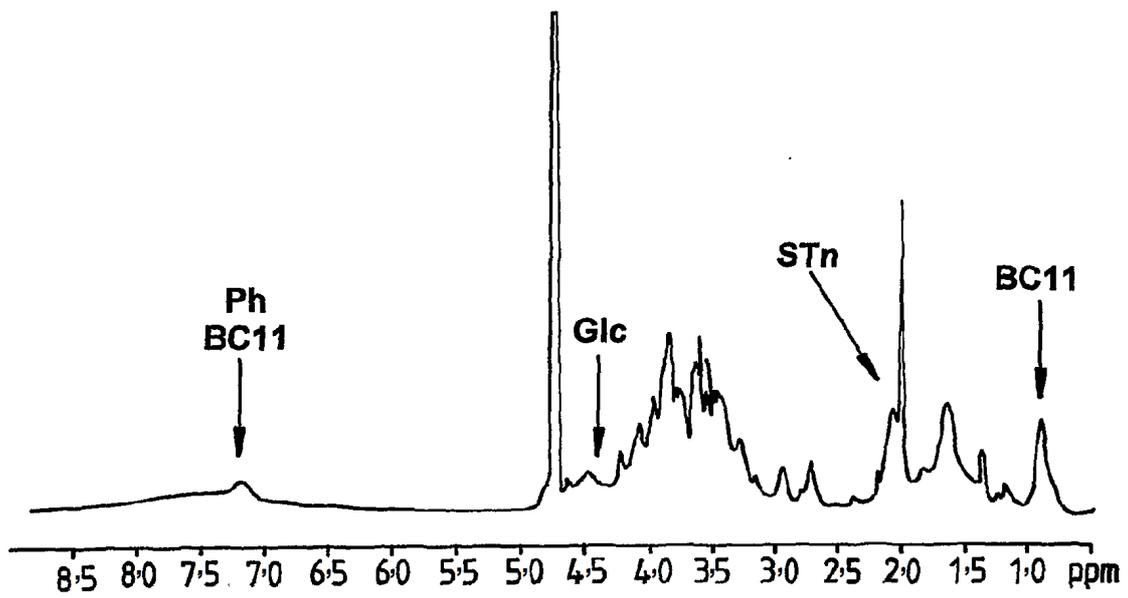
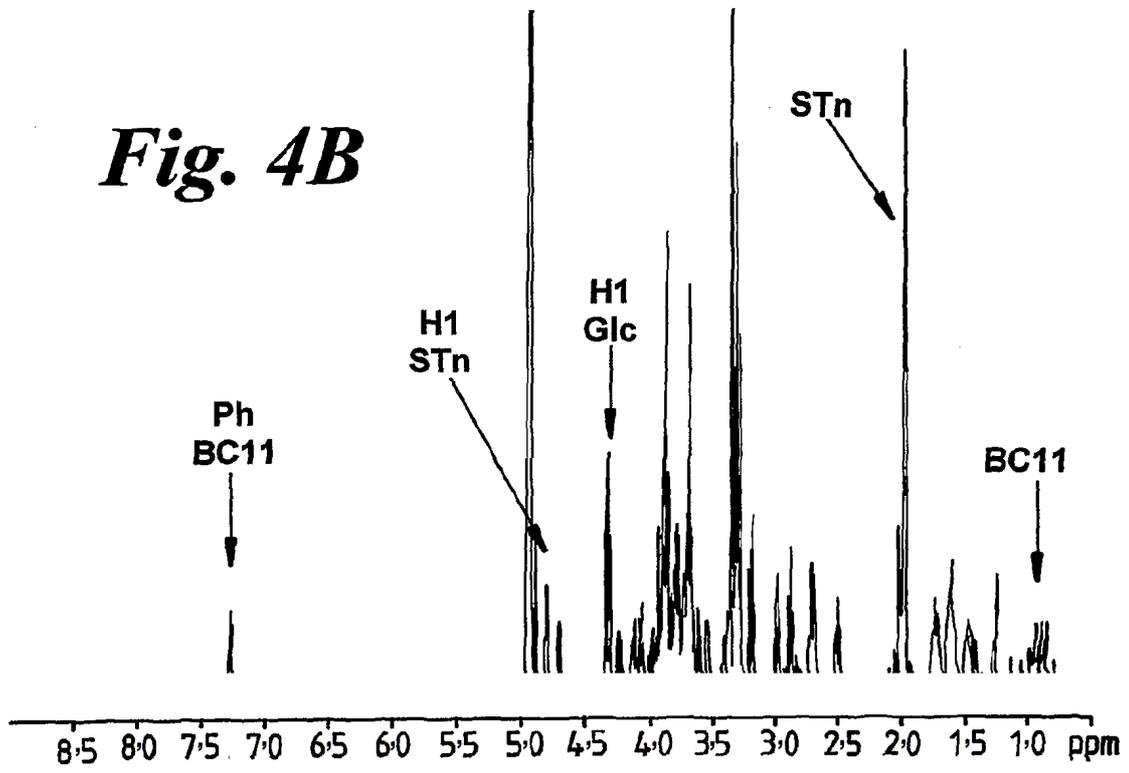
**Fig. 2**

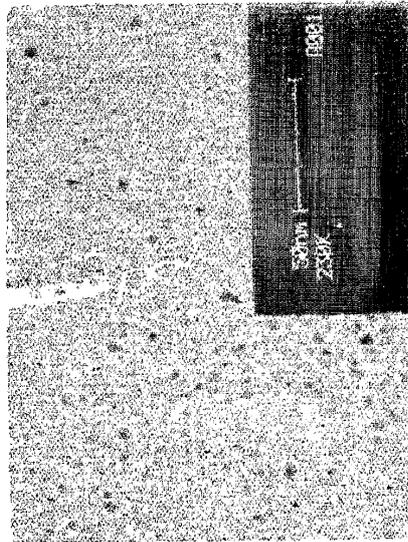
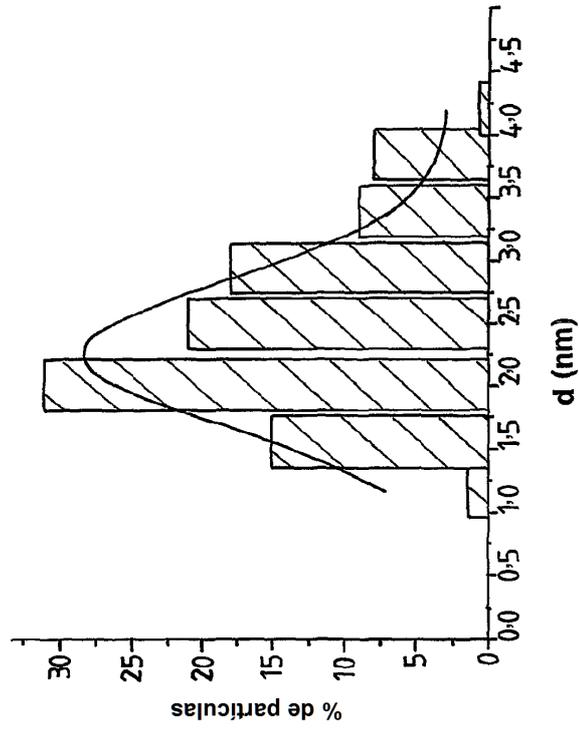


*Fig. 4A*

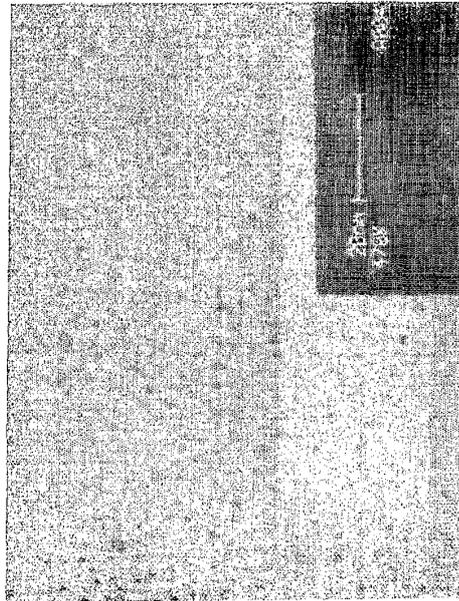
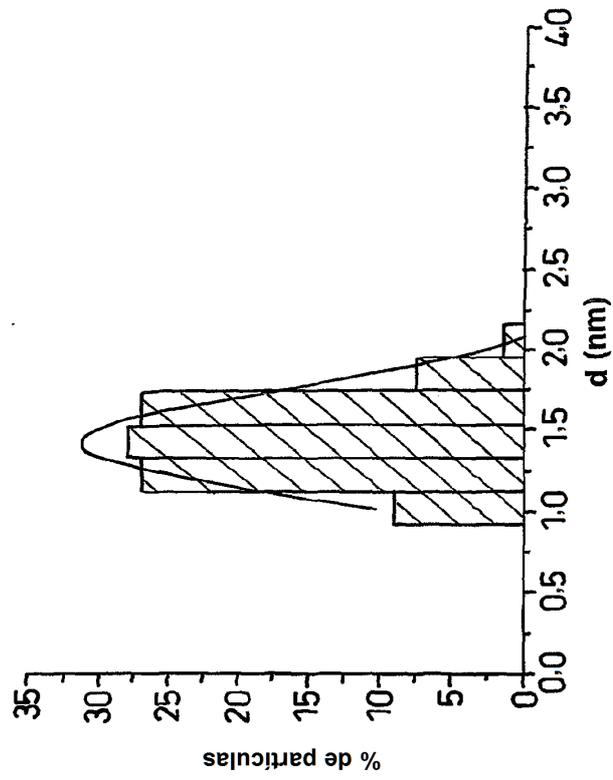


**Fig. 4B**

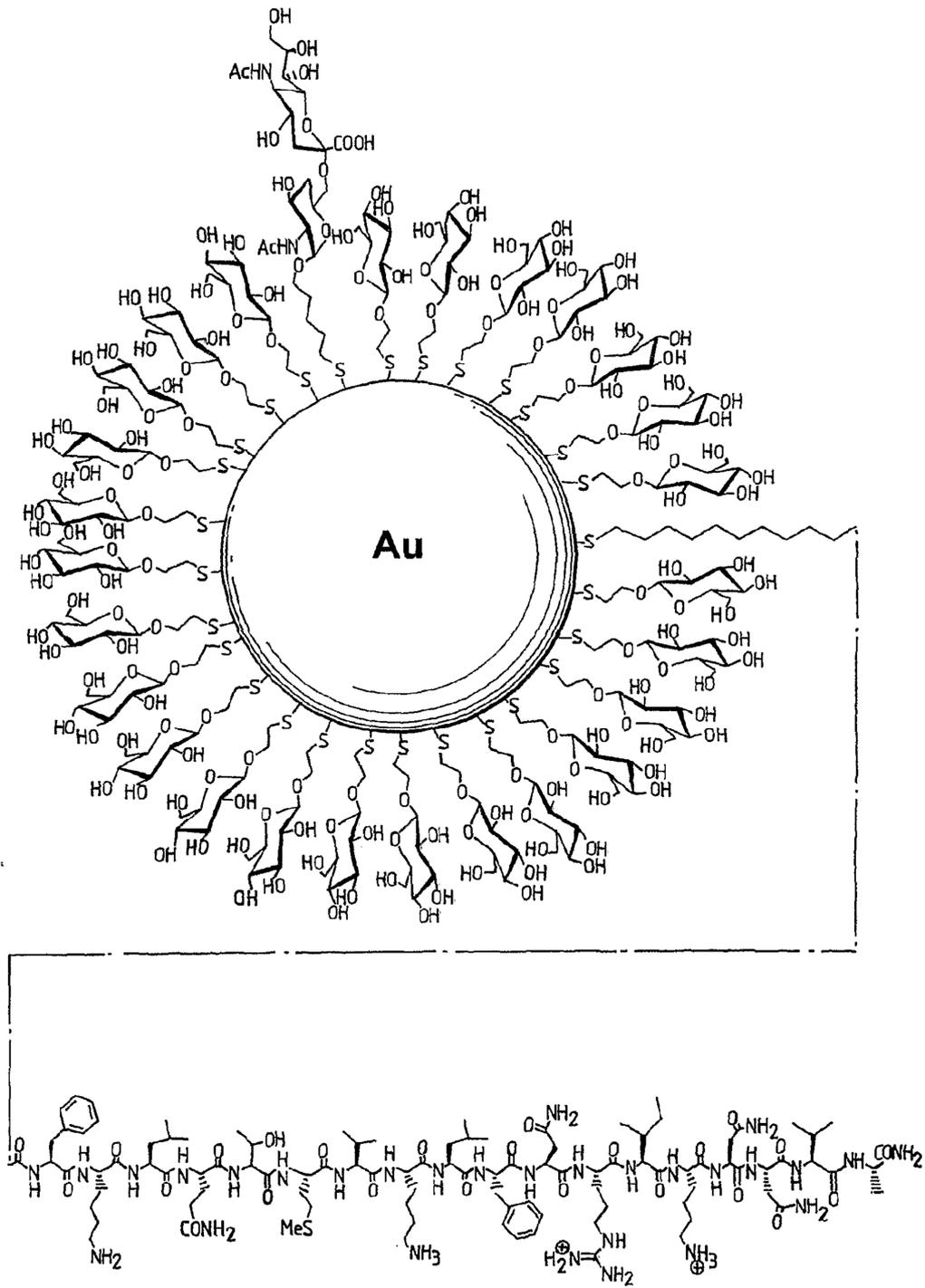




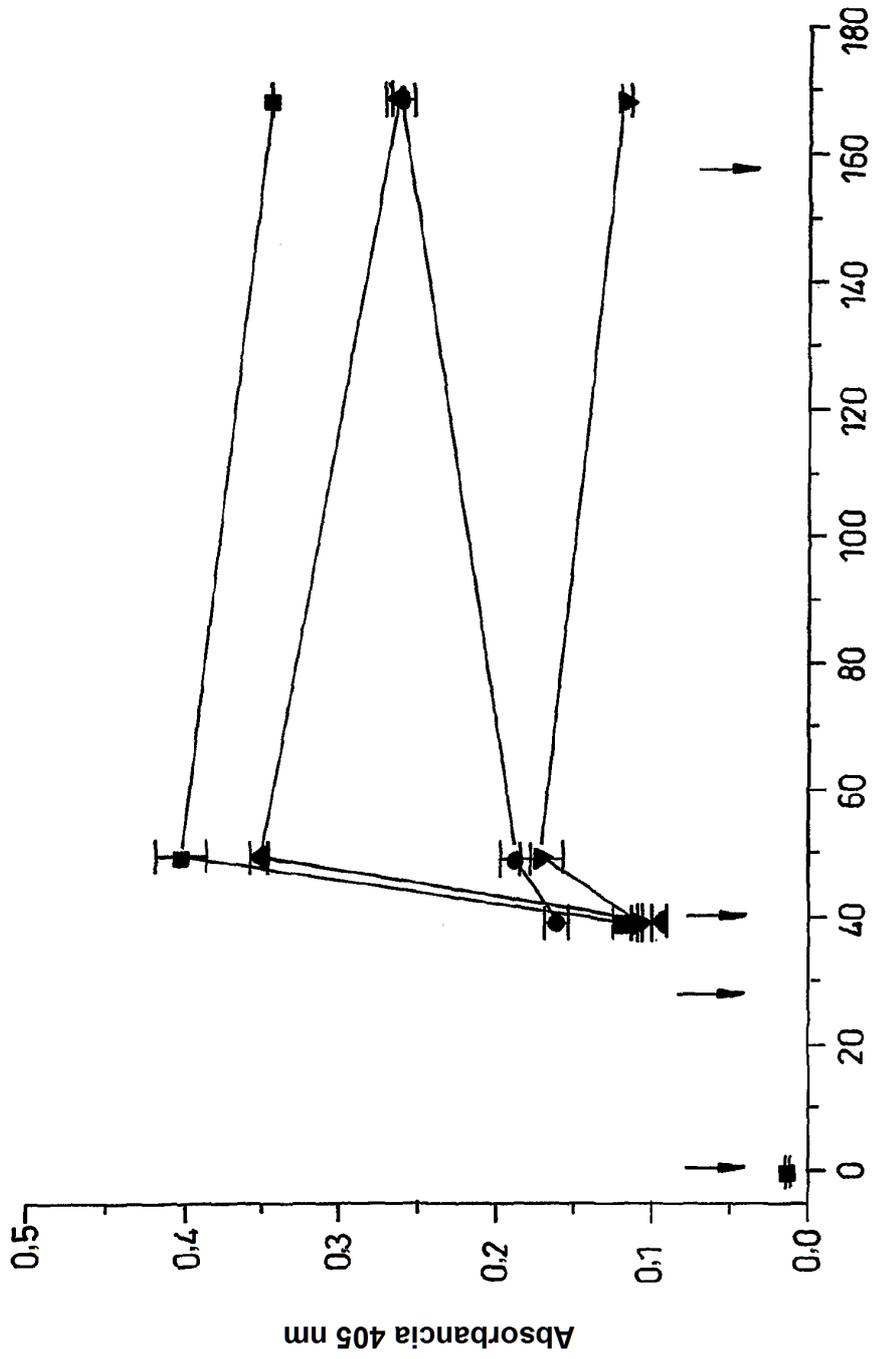
**Fig. 5A**



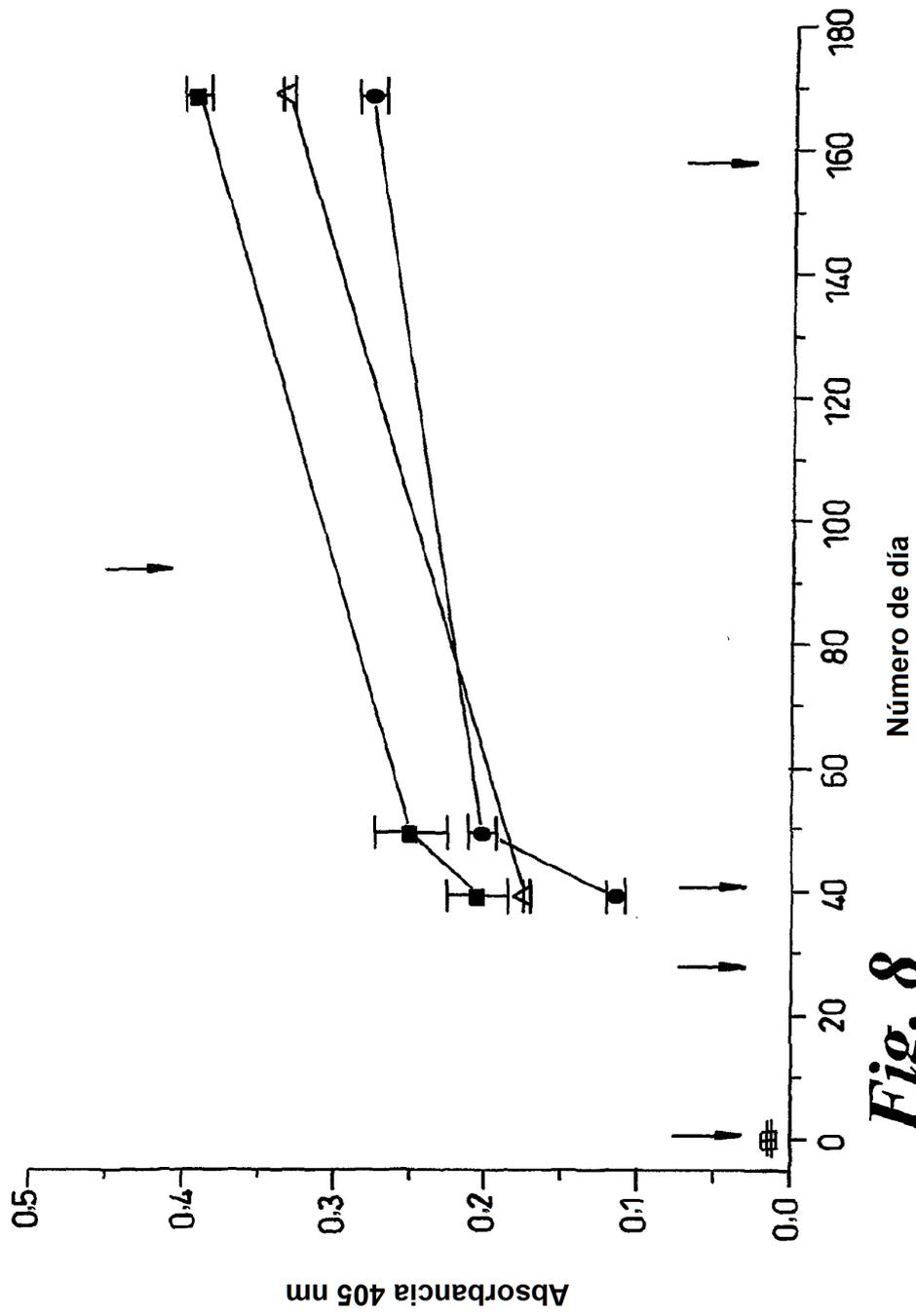
**Fig. 5B**



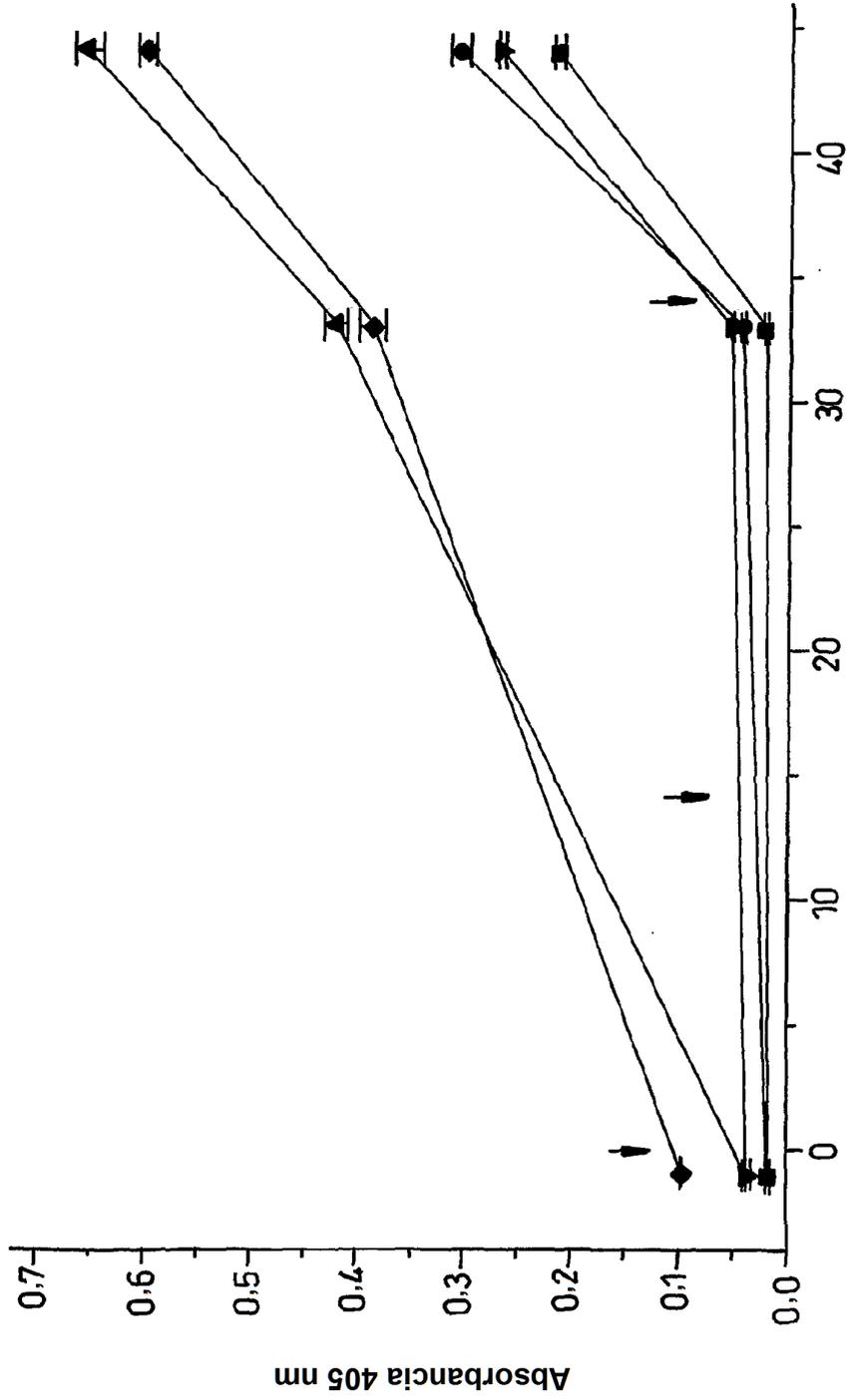
**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9** 240205 dilución 1/200  
Día del experimento