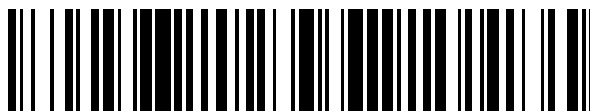


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 978**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 39/385</b>	(2006.01)	<b>A61K 33/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/39</b>	(2006.01)	<b>A61P 31/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)	<b>A61P 31/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/02</b>	(2006.01)	<b>A61P 31/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/22</b>	(2006.01)	<b>A61P 25/34</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/24</b>	(2006.01)	<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/51</b>	(2006.01)	<b>A61K 39/35</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/7115</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/4745</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2011 PCT/US2011/038200**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11150249**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2011 E 11787442 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2575876**

54 Título: **Vacunas multivalentes de nanovehículos sintéticos**

30 Prioridad:

**26.05.2010 US 348728 P**  
**26.05.2010 US 348717 P**  
**26.05.2010 US 348713 P**  
**25.06.2010 US 358635 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.04.2018**

73 Titular/es:

**SELECTA BIOSCIENCES, INC. (100.0%)**  
**480 Arsenal Street Building One**  
**Watertown, MA 02472, US**

72 Inventor/es:

**BRATZLER, ROBERT, L.;**  
**JOHNSTON, LLOYD;**  
**LIPFORD, GRAYSON, B. y**  
**ZEPP, CHARLES**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 661 978 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

Vacunas multivalentes de nanovehículos sintéticos

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Las vacunas multivalentes son una forma útil de generar una respuesta inmune a ciertas sustancias extrañas que de otro modo no sería deseablemente vigorosa. Por ejemplo, la vacunación contra múltiples cepas de un virus puede proporcionar una protección cruzada más fuerte contra múltiples cepas de dicho virus en comparación con la vacunación mediante el uso de una vacuna monovalente.

10 No obstante, las vacunas multivalentes actuales y los métodos para prepararlas requieren mejoras. Por ejemplo, los enfoques actuales para conjugar antígenos para vehículos proteínicos son complejos y producen rendimientos bajos. Además, habitualmente es necesario desarrollar nuevas técnicas para conjugar nuevos antígenos para proteínas vehículo debido a que las técnicas convencionales pueden no ser exitosas debido a la fragilidad relativa de las proteínas vehículo convencionales.

Se necesitan composiciones y métodos que proporcionen vacunas multivalentes mejoradas.

### 15 SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona composiciones como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

En otro aspecto, la invención proporciona un proceso como se define en las reivindicaciones adjuntas.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 La figura 1 muestra valoraciones de anticuerpo antinicotina (barras color gris oscuro) y antiovalbúmina (barras color gris claro) en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-Nic y NC-OVA (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada nanovehículo (NC) por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas).

La figura 2 muestra valoraciones de anticuerpo antinicotina, antiovalbúmina y antipéptido L2 en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-Nic-OVA y NC-L2 (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada NC por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas).

25 La figura 3 muestra valoraciones de anticuerpo antinicotina, antiovalbúmina, antipéptido M2e y antipéptido L2 en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-Nic-OVA y NC-M2e-L2 (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada NC por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas)

30 La figura 4 muestra valoraciones de anticuerpo antipéptido M2e y antipéptido L2 en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-M2e y NC-L2 (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada NC por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas).

La figura 5 muestra valoraciones de anticuerpo antiproteína HA5 y antiproteína de ovalbúmina en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-HA5 y NC-OVA (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada NC por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas).

35 La figura 6 muestra valoraciones de anticuerpo anti HA, antiovalbúmina, antipéptido M2e y antipéptido L2 en ratones no inmunizados y ratones a los que se inyectó NC-HA5, NC-OVA, y NC-M2e-L2 (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada NC por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas).

La figura 7 muestra valoraciones de anticuerpo en ratones inmunizados con una combinación de NC-M2e, NC-péptido L2 y NC-nicotina-ovalbúmina.

40 La figura 8 muestra valoraciones de anticuerpo en ratones inmunizados con una combinación de NC-3'-nicotina y NC-1'-nicotina.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que la presente invención no se limita a los materiales o parámetros de procesos ejemplificados particularmente, que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente es a los efectos de describir las realizaciones particulares de la invención únicamente y no pretende limitar el uso de terminología alternativa para describir la presente invención.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la", incluyen los referentes plurales salvo que se exprese de otra forma en el contexto. Por ejemplo, la referencia a "un polímero" incluye una mezcla de dos o más de tales moléculas, la referencia a "un solvente" incluye

una mezcla de dos o más de tales solventes, la referencia a “un adhesivo” incluye mezclas de dos o más de tales materiales y similares.

## INTRODUCCIÓN

5 Los inventores descubrieron de forma inesperada y sorprendente que los problemas y limitaciones mencionados anteriormente pueden superarse mediante la práctica de la invención divulgada en la presente. En particular, los inventores descubrieron de forma inesperada que es posible proporcionar composiciones de la invención y métodos relacionados que abordan los problemas y limitaciones en la técnica mediante el suministro de una composición que comprende una forma de dosificación que comprende: una primera población de nanovehículos sintéticos que comprende un primer conjunto de antígenos de superficie; una segunda población de nanovehículos sintéticos que  
10 comprende un segundo conjunto de antígenos de superficie; y un excipiente farmacéuticamente aceptable; donde el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie son estructuralmente diferentes.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende: una forma de dosificación que comprende: una primera población de nanovehículos sintéticos que comprende un primer conjunto de antígenos de superficie; una segunda población de nanovehículos sintéticos que comprende un segundo conjunto de antígenos de superficie; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde el primer conjunto de antígenos de superficie y el  
15 segundo conjunto de antígenos de superficie son inmunológicamente diferentes.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende: una forma de dosificación que comprende: un primer medio de nanovehículo sintético que comprende un primer conjunto de antígenos de superficie; un segundo medio de nanovehículo sintético para presentar un segundo conjunto de antígenos de superficie; y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde el primer conjunto de antígenos de superficie y el  
20 segundo conjunto de antígenos de superficie son estructuralmente diferentes.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende: una forma de dosificación que comprende: un primer medio de nanovehículo sintético para presentar un primer conjunto de antígenos de superficie; un segundo medio de nanovehículo sintético para presentar un segundo conjunto de antígenos de superficie; y un excipiente farmacéuticamente aceptable; donde el primer conjunto de antígenos de superficie y el  
25 segundo conjunto de antígenos de superficie son inmunológicamente diferentes.

En otro aspecto, la invención proporciona un método que comprende: preparar una primera población de nanovehículos sintéticos que comprende un primer conjunto de antígenos de superficie; preparar una segunda población de nanovehículos sintéticos que comprende un segundo conjunto de antígenos de superficie; y combinar la primera y segunda población de nanovehículos sintéticos en una forma de dosificación; donde el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie son estructuralmente diferentes.  
30

En aún otro aspecto, la invención proporciona un método que comprende: preparar una primera población de nanovehículos sintéticos que comprende un primer conjunto de antígenos de superficie; preparar una segunda población de nanovehículos sintéticos que comprende un segundo conjunto de antígenos de superficie; y combinar la primera y la segunda población de nanovehículos sintéticos en una forma de dosificación; donde el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie son inmunológicamente diferentes.  
35

Se descubrió que es posible generar una primera y una segunda población de nanovehículos sintéticos que comprende un primer y un segundo conjunto de antígenos de superficie, respectivamente, que pueden combinarse con un excipiente farmacéuticamente aceptable para crear una forma de dosificación. Esta forma de dosificación puede, en ciertas realizaciones, ser útil como una vacuna multivalente. Los inventores descubrieron además ciertas ventajas en la creación de formas de dosificación de la invención, particularmente con respecto a vacunas multivalentes convencionales. Estas incluyen, a modo no taxativo, minimizar los volúmenes de vacunas que  
40 representa un problema en las vacunas multivalentes convencionales y minimizar las interacciones proteína-proteína presentes en las vacunas multivalentes convencionales de vehículo de proteína-hapteno que pueden conducir a la unión no específica y a la precipitación.

Una ventaja adicional de la presente invención es que la combinación de diferentes poblaciones de nanovehículos sintéticos que comprenden conjuntos de antígenos de superficie permite el uso de diferentes métodos para acoplar antígenos de superficie a diferentes poblaciones de nanovehículos sintéticos. Esto puede ser una ventaja significativa para las realizaciones donde se requiere que los métodos de acoplamiento incompatibles acoplen conjuntos de antígenos de superficie a poblaciones de nanovehículos sintéticos. Como un ejemplo, las vacunas para *Streptococcus pneumonia* (patente de los Estados Unidos 6,132,723 de *Alberta Research Council* y WO 2008/143709 para Wyeth) contienen múltiples antígenos. Debido a que las condiciones de unión química no son las mismas para todos los antígenos de polisacáridos (WO 2008/143709), no se desean los métodos de acoplamiento que acoplarían todos los antígenos de superficie a una única población de nanovehículos sintéticos en un único ambiente de acoplamiento. La práctica de las realizaciones de la presente invención donde diferentes poblaciones  
50  
55

de nanovehículos sintéticos se acoplan en primer lugar a ciertos conjuntos de antígenos de superficie y después se combinan, puede mitigar el problema apreciado en la técnica.

Otro ejemplo de vacunas multivalentes que podrían beneficiarse de la presente realización de la invención comprende vacunas contra *N. meningitides* que es a base de polisacáridos y multivalente. Tales realizaciones pueden dirigirse a grupos A y C de *N. meningitides* (bivalentes) o a grupos A, C, W135 e Y (tetravalentes).

Los ejemplos ilustran ciertas realizaciones de conformidad con la invención, donde los péptidos, polisacáridos, moléculas pequeñas, etc. se conjugan en una primera población de nanovehículos sintéticos y/o en una segunda población de nanovehículos sintéticos. Estas poblaciones a continuación se combinan para formar una composición de conformidad con la invención.

La presente invención a continuación se describirá en más detalle.

## DEFINICIONES

“Sustancia de abuso” es cualquier sustancia tomada por un individuo (por ejemplo, un humano) con una finalidad diferente para la que se receta o en una forma o en cantidades diferentes a las que indica el médico. La sustancia de abuso, en algunas realizaciones, es una sustancia adictiva. En algunas realizaciones, la sustancia de abuso para su inclusión en un nanovehículo es la molécula completa, su análogo o una porción de esta. “Sustancia adictiva” es una sustancia que provoca obsesión, compulsión o dependencia física o psicológica. En algunas realizaciones, la sustancia adictiva para su inclusión en un nanovehículo es la molécula completa, su análogo o una porción de esta.

“Adyuvante” significa un agente que no constituye un antígeno específico, pero que incrementa la fuerza y longevidad de la respuesta inmune a un antígeno administrado (por ejemplo, un antígeno administrado de forma concomitante). Tales adyuvantes pueden incluir, a modo no taxativo, estimuladores de receptores de reconocimiento de patrones, tales como receptores tipo Toll, receptores tipo RIG-1 y NOD (NLR), sales minerales, como alumbre, alumbre combinado con monofosforil lípido (MPL) A de *Enterobacteria*, como *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, o *Shigella flexneri* o específicamente con MPL® (AS04), MPL A de las bacterias mencionadas anteriormente separadamente, saponinas, como QS-21, Quil-A, ISCOM, ISCOMATRIX™, emulsiones como MF59™, Montanide® ISA 51 e ISA 720, AS02 (QS21+escualeno+MPL®), liposomas y formulaciones liposomales como AS01, AS15, micropartículas y microvehículos sintetizados o preparados específicamente como vesículas fuera de la membrana derivadas de bacterias (OMV) de *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y otros, o partículas de quitosano, agentes formadores de depósitos, como copolímeros bloqueadores Pluronic®, péptidos modificados o preparados específicamente, muramil dipéptido, como un dipéptido de muramilo, aminoalquil glucosaminida 4-fosfato, como RC529, o proteínas, como toxoides bacterianos o fragmentos de toxina.

En realizaciones, los adyuvantes comprenden agonistas para los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que incluyen, a modo no taxativo, receptores tipo Toll (TLR), específicamente TLR 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 y/o sus combinaciones. En otras realizaciones, los adyuvantes comprenden agonistas para los receptores tipo Toll 3, agonistas para los receptores tipo Toll 7 y 8 o agonistas para los receptores tipo Toll 9; preferentemente los adyuvantes mencionados comprenden imidazoquinolinas; como R848; derivados de adenina, como las descritas en la patente de Estados Unidos 6,329,381 (Sumitomo Pharmaceutical Company), la solicitud de patente de Estados Unidos 2010/0075995 para Biggadike et al., o WO 2010/018132 para Campos et al.; ADN inmunoestimulador; o ARN inmunoestimulador.

En realizaciones específicas, los nanovehículos sintéticos se incorporan como compuestos adyuvantes que son agonistas para los receptores tipo Toll (TLR) 7 y 8 (“agonistas de TLR 7/8”). Los compuestos agonistas de TLR 7/8 divulgados en la patente de Estados Unidos 6,696,076 de Tomai et al., que incluyen, a modo no taxativo, aminos imidazoquinolina, aminos imidazopiridina, aminos cicloalquilimidazopiridina fusionadas en 6,7 y aminos imidazoquinolina puenteadas en 1,2. Los adyuvantes preferidos comprenden imiquimod y resiquimod (también conocido como R848). En realizaciones específicas, los nanovehículos sintéticos incorporan un ligando para el receptor tipo Toll (TLR)-9, como CpG, que induce la producción de interferón tipo I y estimula la activación de los linfocitos T y B que conduce a un aumento en la producción de anticuerpos y en las respuestas a los linfocitos T citotóxicos (*Krieg et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. Nature. 1995. 374:546-549; Chu et al. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. J. Exp. Med. 1997. 186:1623-1631; Lipford et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. Eur. J. Immunol. 1997. 27:2340-2344; Roman et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. Nat. Med. 1997. 3:849-854; Davis et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. J. Immunol. 1998. 160:870-876; Lipford et al., Bacterial DNA as immune cell activator. Trends Microbiol. 1998. 6:496-500; patente de Estados Unidos 6,207,646 para Krieg et al.; patente de Estados Unidos 7,223,398 de Tuck et al.; patente de Estados Unidos 7,250,403 de Van Nest et al.; o patente de Estados Unidos 7,566,703 de Krieg et al.*).

En realizaciones específicas, un adyuvante puede ser un agonista para la molécula de superficie de DC CD40. En ciertas realizaciones, para estimular la inmunidad en lugar de la tolerancia, el nanovehículo sintético incorpora un

adyuvante que promueve la maduración de DC (necesaria para la imprimación de los linfocitos T nativos) y la producción de citocinas, como los interferones tipo I, que promueve las respuestas inmunes de los anticuerpos y la inmunidad antiviral. En algunas realizaciones, los adyuvantes pueden comprender además moléculas de ARN inmunoestimuladoras, como, a modo no taxativo, ARN bicatenario, ARN de cadena simple, poli I:C o poli I:poli C12U (disponible como Ampligen®, tanto como I:C y poli I:poliC12U conocidos como estimuladores de TLR3), y/o los descritos en F. Heil et al., "Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8" Science 303(5663), 1526-1529 (2004); J. Vollmer et al., "Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides" WO 2008033432 A2; A. Forsbach et al., "Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s) and targeting the Toll-like receptor 8 pathway" WO 2007062107 A2; E. Uhlmann et al., "Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity" U.S. Pat. Appl. Publ. US 2006241076; G. Lipford et al., "Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections" WO 2005097993 A2; G. Lipford et al., "Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides, compositions, and screening methods" WO 2003086280 A2.

En algunas realizaciones, un adyuvante puede ser un agonista de TLR-4, como un lipopolisacárido bacteriano (LPS), VSV-G, y/o HMGB-1. En algunas realizaciones, los adyuvantes pueden comprender agonistas de TLR-5, como flagelina, o sus porciones o derivados, incluidos a modo no taxativo los divulgados en las patentes de los Estados Unidos 6,130,082, 6,585,980 y 7,192,725.

En algunas realizaciones, los adyuvantes pueden ser estímulos proinflamatorios liberados por las células necróticas (por ejemplo, cristales de urato). En algunas realizaciones, los adyuvantes pueden ser componentes activados de la cascada de complemento (por ejemplo, CD21, CD35, etc.). En algunas realizaciones, los adyuvantes pueden ser componentes activados de complejos inmunes. Los adyuvantes incluyen además agonistas de receptores complementarios, como una molécula que se une a CD21 o CD35. En algunas realizaciones, el agonista de receptores complementarios induce la opsonización del complemento endógeno del nanovehículo sintético. En algunas realizaciones, los adyuvantes son citocinas, que son proteínas o factores biológicos pequeños (en el intervalo de 5 kD – 20 kD) que se liberan por las células y tienen efectos específicos sobre la interacción célula-célula, comunicación y comportamiento de otras células. En algunas realizaciones, el agonista del receptor de citocina es una molécula pequeña, un anticuerpo, una proteína de fusión o un aptámero.

En realizaciones, al menos una porción de la dosis de adyuvante puede acoplarse a nanovehículos sintéticos, preferentemente, la totalidad de la dosis de adyuvante se acopla a los nanovehículos sintéticos. En otras realizaciones, al menos una porción de la dosis de adyuvante no se acopla a los nanovehículos sintéticos. En realizaciones, la dosis de adyuvante comprende dos o más tipos de adyuvantes. Por ejemplo, y a modo no taxativo, los adyuvantes que actúan sobre los diferentes receptores de TLR pueden combinarse. Como un ejemplo, en una realización el agonista de TLR 7/8 puede combinarse con un agonista de TLR 9. En otra realización el agonista de TLR 7/8 puede combinarse con un agonista de TLR 4. En aún otra realización, el agonista de TLR 9 puede combinarse con un agonista de TLR 3.

"Administrar" o "administración" significa proporcionar una sustancia a un individuo en una forma que es farmacológicamente útil.

"Cantidad eficaz" es cualquier cantidad de una composición que produce una o más respuestas inmunes deseadas. Esta cantidad puede ser a los efectos *in vitro* o *in vivo*. A los efectos *in vivo*, la cantidad puede ser una que el médico considere que pueda conferir un beneficio clínico a un individuo que necesite una respuesta de anticuerpo específica para uno o más antígenos. "Respuesta de anticuerpo" significa una respuesta inmune que resulte en la producción o estimulación de las células B y/o la producción de anticuerpos. Por consiguiente, en realizaciones, una cantidad eficaz es una que un médico considere que pueda generar una respuesta de anticuerpo contra el antígeno de superficie de las composiciones de la invención proporcionadas en la presente. Las cantidades eficaces pueden controlarse mediante métodos de rutina. Una cantidad que es eficaz para producir una o más respuestas inmunes deseadas puede ser también una cantidad de una composición proporcionada en la presente que produce un criterio de valoración terapéutico deseado o un resultado terapéutico deseado. Por consiguiente, en otras realizaciones, la cantidad eficaz es una que el médico considere que pueda conferir un beneficio terapéutico (incluido un beneficio profiláctico) a un individuo proporcionado en la presente. Tales sujetos incluyen los que padecen o presentan el riesgo de padecer cáncer, una infección o enfermedad infecciosa.

Lo(s) antígeno(s) de cualquiera de las composiciones de la invención proporcionados en la presente pueden, en realizaciones, encontrarse en una cantidad eficaz. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es una que un médico considere que puede generar valores de anticuerpo contra los conjuntos de antígenos de superficie de las composiciones proporcionadas en la presente. "Valoración de anticuerpo" significa la producción de un nivel medible de anticuerpos. Preferentemente, la respuesta de anticuerpo o generación de la valoración de anticuerpo se produce en un humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos de un cierto isotipo, como IgG o una subclase de este. Los métodos para medir las valoraciones de anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los métodos para medir la respuesta de anticuerpos también se describen en algún detalle en los ejemplos. Preferentemente, la respuesta de anticuerpo o valoración de anticuerpo es específica para un conjunto de antígenos de superficie. En algunas realizaciones donde los nanovehículos sintéticos también comprenden un antígeno universal además de un conjunto de antígenos de

superficie contra el cual se produce una respuesta inmune específica, como una respuesta de anticuerpo o valoración de anticuerpo, la respuesta inmune es específica para el conjunto de antígenos de superficie pero no para el antígeno universal.

5 Las cantidades eficaces dependerán, por supuesto, del individuo particular que se está tratando; la seriedad de la afección, enfermedad o trastorno; los parámetros individuales del paciente que incluyen la edad, estado físico, tamaño y peso; la duración del tratamiento; la naturaleza de la terapia concurrente (si la hubiere); la vía de administración específica y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del médico. Estos factores son bien conocidos por los entendidos en la técnica y pueden abordarse sin más que experimentación de rutina. Generalmente se prefiere que se utilice una “dosis máxima”, es decir, la dosis segura más alta de conformidad con el juicio médico razonable. No obstante, los entendidos en la técnica entenderán que un paciente puede insistir en una dosis más baja o una dosis tolerable por razones médicas, razones psicológicas o por cualquier otra razón.

15 “Antígeno” significa un antígeno de células B o un antígeno de linfocitos T. En realizaciones, los antígenos se acoplan a los nanovehículos sintéticos. En otras realizaciones, los antígenos no se acoplan a los nanovehículos sintéticos. En realizaciones, los antígenos se coadministran con nanovehículos sintéticos. En otras realizaciones, los antígenos no se coadministran con nanovehículos sintéticos. “Tipos de antígenos” significa moléculas que comparten las mismas, o sustancialmente las mismas características antigénicas.

“Al menos una porción de la dosis” significa al menos alguna parte de la dosis que varía hasta incluir la totalidad de la dosis.

20 Un individuo “en riesgo” es uno donde el médico considera que tiene la posibilidad de padecer la enfermedad o afección proporcionada en la presente, que incluye, a modo no taxativo, una infección, una enfermedad infecciosa, cáncer o una adicción.

25 “Antígeno de células B” significa cualquier antígeno que es reconocido por una célula B y dispara una respuesta inmune en una célula B (por ejemplo, un antígeno que es reconocido específicamente por un receptor de células B en una célula B). En algunas realizaciones, el antígeno que es un antígeno de linfocitos T también es un antígeno de células B. En otras realizaciones, el antígeno de linfocitos T no es un antígeno de células B. Los antígenos de células B incluyen, a modo no taxativo, proteínas, péptidos, moléculas pequeñas, carbohidratos, oligosacáridos y polisacáridos. En algunas realizaciones, el antígeno de células B comprende un antígeno no proteínico (es decir, no es un antígeno de proteína o péptido). En algunas realizaciones, el antígeno de células B comprende un carbohidrato, un oligosacárido o polisacárido asociado con un agente infeccioso. En algunas realizaciones, el antígeno de células B comprende una glicoproteína o glicopéptido asociado con un agente infeccioso. El agente infeccioso puede ser una bacteria, virus, hongo, protozoo o parásito. En algunas realizaciones, el antígeno de células B comprende un antígeno escasamente inmunogénico. En algunas realizaciones, el antígeno de células B comprende una sustancia de abuso o adictiva o una porción o análogo de esta. Las sustancias adictivas incluyen, a modo no taxativo, nicotina, un narcótico, un inhibidor de la tos, un tranquilizante y un sedante. En algunas realizaciones, el antígeno de células B comprende una toxina, como una toxina de un arma química o fuentes naturales. El antígeno de células B también puede comprender un agente medioambiental peligroso. En algunas realizaciones el antígeno de células B comprende un autoantígeno. En otras realizaciones, el antígeno de células B comprende un aloantígeno, un alérgeno, un sensibilizador de contacto, un antígeno de enfermedad degenerativa, un hapteno, un antígeno de enfermedad infecciosa, un antígeno de cáncer, un antígeno de enfermedad atópica, un antígeno de enfermedad autoinmune, una sustancia adictiva, un xenoantígeno o una enzima de enfermedad metabólica o su producto enzimático.

45 “Acoplar” o “acoplado” (y similares) significa asociar químicamente una entidad (por ejemplo una porción) con otra. En algunas realizaciones, el acoplamiento es covalente, lo que significa que el acoplamiento ocurre en el contexto de la presencia de un enlace covalente entre dos entidades. En realizaciones no covalentes, el acoplamiento no covalente es mediado por interacciones no covalentes que incluyen a modo no taxativo, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de agrupación TT, interacciones de unión de hidrógeno, interacciones van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo y/o sus combinaciones. En realizaciones, la encapsulación es una forma de acoplamiento.

50 “Derivado” significa adaptado o modificado con respecto a la fuente original. Por ejemplo, como un ejemplo no limitativo, un antígeno peptídico derivado de una cepa infecciosa puede tener varios residuos de aminoácidos no naturales substituidos por los residuos de aminoácidos naturales encontrados en el antígeno original encontrado en la cepa infecciosa. Las adaptaciones o modificaciones pueden ser por una variedad de razones, que incluyen, a modo no taxativo, un aumento en la especificidad, un procesamiento de antígeno más fácil o una mejora en la seguridad.

En realizaciones, se dice que el péptido o ácido nucleico con una secuencia con únicamente un 50% de identidad con un péptido o ácido nucleico natural, preferentemente un péptido o ácido nucleico de consenso natural se deriva de un péptido o ácido nucleico natural. En otras realizaciones, el material se encuentra sustancialmente modificado. Un material sustancialmente modificado significa un material que se modifica de forma tal que la modificación afecta

de forma significativa las propiedades inmunológicas o químicas del material en cuestión. Los péptidos y ácidos nucleicos derivados también pueden incluir aquellos con una secuencia con más de un 50% de identidad con una secuencia de péptido o ácido nucleico natural si dichos péptidos y ácidos nucleicos derivados presentan propiedades químicas o inmunológicas alteradas en comparación con el péptido o ácido nucleico natural. Estas propiedades químicas o inmunológicas comprenden hidrofiliidad, estabilidad, afinidad y capacidad para acoplarse con un vehículo como un nanovehículo sintético.

“Forma de dosificación” significa un material farmacológicamente y/o inmunológicamente activo, como una vacuna, en un medio, vehículo o dispositivo adecuado para la administración a un individuo.

“Encapsular” o “encapsulado” significa encerrar dentro de un nanovehículo sintético, preferentemente encerrarse completamente dentro de un nanovehículo sintético. La mayoría o la totalidad de la sustancia que se encuentra encapsulada no se expone al medioambiente local externo al nanovehículo sintético. La encapsulación es diferente a la adsorción, que coloca a la mayoría o a la totalidad de una sustancia sobre una superficie del nanovehículo sintético, y deja la sustancia expuesta al medioambiente local externo al nanovehículo sintético.

“Inmunológicamente diferente” se refiere a una diferencia entre ciertos antígenos de superficie que puede notarse si el suero generado por la inmunización genera un espectro de respuesta de anticuerpo diferente para cada uno de los antígenos de superficie. Los anticuerpos específicos de antígenos de superficie únicamente reconocerán un conjunto específico de antígenos de superficie y se unirán en patrones de unión distinguibles a otros conjuntos de antígenos de superficie. Por ejemplo, si se inmuniza con un conjunto de antígenos de superficie A, el antisuero generado únicamente se unirá al conjunto de antígenos de superficie A, pero no al conjunto de antígenos de superficie B. Si dos o más antígenos de superficie se combinan en un único nanovehículo sintético, puede diseñarse un ensayo panorámico que distinguirá los patrones de unión del suero con relación a los dos conjuntos de antígenos de superficie. En realizaciones, el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie son inmunológicamente diferentes. En otras realizaciones, el primer conjunto de antígenos de superficie, el segundo conjunto de antígenos de superficie y el tercer conjunto de antígenos de superficie son inmunológicamente diferentes.

Una “infección” o “enfermedad infecciosa” es cualquier afección o enfermedad causada por un microorganismo, patógeno u otro agente como una bacteria, hongo, prión o virus. Si las composiciones de la invención proporcionadas en la presente pueden obtenerse o derivarse de cualquier agente infeccioso, como los que pueden provocar infecciones o enfermedades infecciosas, los antígenos de superficie se proporcionan en la presente.

“Género infeccioso” significa un género que comprende organismos capaces de infectar a un individuo. En realizaciones, los antígenos de superficie pueden obtenerse o derivarse de un primer género infeccioso u obtenerse o derivarse de un segundo género infeccioso. En realizaciones, el primer género infeccioso y el segundo género infeccioso son iguales. En otras realizaciones, el primer género infeccioso y el segundo género infeccioso son diferentes.

“Especie infecciosa” significa una especie que comprende organismos capaces de infectar a un individuo. En realizaciones, los antígenos de superficie pueden obtenerse o derivarse de una primera especie infecciosa u obtenerse o derivarse de una segunda especie infecciosa. En realizaciones, la primera especie infecciosa y la segunda especie infecciosa son del mismo género. En otras realizaciones, la primera especie infecciosa y la segunda especie infecciosa también son iguales. En algunas realizaciones, la primera especie infecciosa y la segunda especie infecciosa son diferentes pero del mismo género. En otras realizaciones, las diferentes especies infecciosas son de géneros diferentes.

“Cepa infecciosa” significa una cepa que comprende organismos capaces de infectar a un individuo. En realizaciones, los antígenos de superficie pueden obtenerse o derivarse de una primera cepa infecciosa u obtenerse o derivarse de una segunda cepa infecciosa. En realizaciones, la primera cepa infecciosa y la segunda cepa infecciosa son de la misma especie. En otras realizaciones, la primera cepa infecciosa y la segunda cepa infecciosa también son iguales. En aún otras realizaciones, son de la misma especie pero de diferente cepa. En algunas realizaciones, la primera cepa infecciosa y la segunda cepa infecciosa son de especies diferentes pero del mismo género.

“Ácido nucleico aislado” significa un ácido nucleico que se encuentra separado de su ambiente nativo y presente en una cantidad suficiente para permitir su identificación o uso. El ácido nucleico aislado puede ser uno que (i) se amplifique in vitro mediante, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) se produzca de forma recombinante mediante clonación; (iii) se purifique mediante escisión y separación en gel; o (iv) se sintetice mediante, por ejemplo, síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que puede manipularse fácilmente mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por consiguiente, se considera que una secuencia de nucleótidos contenida en un vector donde los sitios de restricción 5' y 3' son conocidos o para la cual se divulgaron las secuencias de cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una secuencia aislada, pero no lo es así una secuencia de ácidos nucleicos existente en su estado nativo en su hospedador natural. Un ácido nucleico aislado puede encontrarse sustancialmente purificado pero no es necesario. Por ejemplo, un ácido nucleico que se encuentra aislado dentro de un vector de clonación o expresión no es puro en

cuanto a que puede comprender únicamente un pequeño porcentaje del material en la célula en la cual reside. No obstante, dicho ácido nucleico se encuentra aislado, como el término se utiliza en la presente, porque puede manipularse fácilmente mediante técnicas estándar conocidas por los entendidos en la técnica. Cualquiera de los ácidos nucleicos proporcionados en la presente puede aislarse. En algunas realizaciones, los antígenos en las composiciones proporcionadas en la presente se encuentran presentes en la forma de un ácido nucleico aislado, como un ácido nucleico aislado que codifica un péptido, polipéptido o proteína antigénica.

“Péptido, polipéptido o proteína aislada” significa un péptido, polipéptido o proteína que se encuentra separada de su ambiente nativo y presente en una cantidad suficiente para permitir su identificación o uso. Esto significa, por ejemplo, que el péptido, polipéptido o proteína puede (i) producirse de forma selectiva mediante la clonación de expresión o (ii) purificarse mediante cromatografía o electroforesis. Los péptidos, polipéptidos o proteínas aisladas pueden ser sustancialmente puros pero no es necesario. Debido a que el péptido, polipéptido o proteína aislada puede mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el péptido, polipéptido o proteína puede comprender únicamente un pequeño porcentaje en peso de la preparación. No obstante, el péptido, polipéptido o proteína se encuentra aislado en que se separó de sustancias con las cuales podría estar asociado en sistemas vivientes, es decir, aislado de otros péptidos, polipéptidos o proteínas. Cualquiera de los péptidos, polipéptidos o proteínas proporcionados en la presente puede aislarse. En algunas realizaciones, los antígenos en las composiciones proporcionadas en la presente son péptidos, polipéptidos o proteínas.

“Dimensión máxima de un nanovehículo sintético” significa la mayor dimensión de un nanovehículo medida a través de cualquier eje del nanovehículo sintético. “Dimensión mínima de un nanovehículo sintético” significa la menor dimensión de un nanovehículo sintético medida a través de cualquier eje del nanovehículo sintético. Por ejemplo, para un nanovehículo sintético esférico, la dimensión máxima y mínima de un nanovehículo sintético sería sustancialmente idéntica y tendría el tamaño de su diámetro. De forma similar, para un nanovehículo sintético cuboidal, la dimensión mínima de un nanovehículo sintético sería la menor de su altura, ancho o largo, mientras que la dimensión máxima de un nanovehículo sintético sería la mayor de su altura, ancho o largo. En una realización, la dimensión mínima de al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90% de los nanovehículos sintéticos en una muestra, basada en el número total de nanovehículos sintéticos en la muestra, es mayor que 100 nm. En una realización, la dimensión máxima de al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90% de los nanovehículos sintéticos en una muestra, basada en el número total de nanovehículos sintéticos en la muestra, es igual o menor que 5  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, la dimensión mínima de al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90% de los nanovehículos sintéticos en una muestra, basada en el número total de nanovehículos sintéticos en la muestra, es igual o mayor que 110 nm, más preferentemente es igual o mayor que 120 nm, más preferentemente es igual o mayor que 130 nm, y más preferentemente aún es igual o mayor que 150 nm. Las proporción de aspectos de las dimensiones máximas y mínimas de los nanovehículos sintéticos de la invención puede variar en función de la realización. Por ejemplo, las relaciones de aspecto de las dimensiones máxima a mínima de los nanovehículos sintéticos puede variar de 1:1 a 1.000.000:1, preferentemente de 1:1 a 100.000:1, más preferentemente de 1:1 a 1000:1, aún más preferentemente de 1:1 a 100:1, y aún más preferentemente de 1:1 a 10:1. Preferentemente, la dimensión máxima de al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90% de los nanovehículos sintéticos en una muestra, basada en el número total de nanovehículos sintéticos en la muestra, es igual o menor que 3  $\mu\text{m}$ , más preferentemente igual o menor que 2  $\mu\text{m}$ , más preferentemente igual o menor que 1  $\mu\text{m}$ , más preferentemente igual o menor que 800 nm, más preferentemente igual o menor que 600 nm y más preferentemente igual o menor que 500 nm. En realizaciones preferidas, la dimensión máxima de al menos un 75%, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90% de los nanovehículos sintéticos en una muestra, basada en el número total de nanovehículos sintéticos en la muestra, es igual o mayor que 100 nm, más preferentemente igual o mayor que 120 nm, más preferentemente igual o mayor que 130 nm, más preferentemente igual o mayor que 140 nm y más preferentemente igual o mayor que 150 nm. La medición de los tamaños de los nanovehículos sintéticos se obtiene mediante la suspensión de los nanovehículos sintéticos en un medio líquido (habitualmente acuoso) y el uso de dispersión de luz dinámica (por ejemplo, mediante el uso de un instrumento Brookhaven ZetaPALS).

“Peso molecular menor que 10.000” significa un peso molecular calculado con base en la estructura molecular de una molécula menor que 10.000.

“Obtenido” significa tomado de una fuente sin modificación sustancial. Modificación sustancial es la modificación que afecta de forma significativa las propiedades químicas o inmunológicas del material en cuestión. Por ejemplo, como un ejemplo no limitativo, se diría que un péptido o ácido nucleico con una secuencia con más de un 90%, preferentemente más de un 95%, preferentemente más de un 97%, preferentemente más de un 98%, preferentemente más de un 99%, preferentemente un 100%, de identidad con una secuencia de péptidos o nucleótidos naturales, preferentemente una secuencia de péptidos de consenso o nucleótidos naturales, y propiedades químicas y/o inmunológicas que no son significativamente diferentes al péptido o ácido nucleico natural, se obtiene de una secuencia de péptidos o nucleótidos naturales. Estas propiedades químicas o inmunológicas comprenden hidrofiliicidad, estabilidad, afinidad y capacidad para acoplarse con un vehículo como un nanovehículo sintético. En realizaciones, el material obtenido se extrajo de la fuente original y no fue adaptado o modificado. Por



ejemplo, en realizaciones, los antígenos obtenidos a partir de una fuente pueden comprender la secuencia de residuos de aminoácidos original encontrada en dicha fuente. Por ejemplo, en otras realizaciones, los antígenos obtenidos a partir de una fuente pueden comprender la estructura molecular original encontrada en dicha fuente.

5 “Oligosacárido(s)” significa un polímero de sacáridos que contiene un número reducido (generalmente de dos a veinte) de unidades de sacáridos unidas mediante enlaces glicosídicos. En un número elevado de unidades de sacáridos, los oligosacáridos pueden comprender polisacáridos.

10 “Péptidos” significa compuestos que comprenden residuos de aminoácidos unidos principalmente por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos contiguos y que presentan de 100 o menos residuos de aminoácidos. Ciertos de los enlaces peptídicos en el péptido pueden reemplazarse por otros tipos de enlace, para varias finalidades, como la estabilización o acoplamiento.

15 “Excipiente (o vehículo) farmacéuticamente aceptable” significa un material farmacológicamente inactivo utilizado junto con los nanovehículos sintéticos mencionados para formular las composiciones de la invención. Los materiales farmacológicamente inactivos pueden agregarse a la forma de dosificación de la invención para facilitar además la administración de la composición. Los excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden una variedad de materiales conocidos en la técnica, incluidos a modo no taxativo los sacáridos (como la glucosa, lactosa y similares), conservantes como agentes antimicrobianos, auxiliares de reconstitución, solución salina (como solución salina tamponada con fosfato) y soluciones amortiguadoras. Los ejemplos, a modo no taxativo, de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios diluyentes, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles, conservantes, 20 varios vehículos farmacéuticos, solución salina estéril, estabilizadores de liofilización y similares. Las composiciones pueden prepararse mediante el uso de técnicas de fabricación y composición farmacéuticas convencionales para lograr formas de dosificación útiles. En una realización, los nanovehículos sintéticos de la invención se suspenden en solución salina estéril para la inyección junto con un conservante.

25 “Polisacárido(s)” significa un polímero de sacáridos compuesto por unidades de muchos sacáridos unidas por enlaces glicosídicos. En un número reducido de unidades de sacáridos, los polisacáridos pueden comprender oligosacáridos.

30 “Población” significa un grupo definido de nanovehículos sintéticos que comparten una o más características físicas o químicas. Las características físicas o químicas pueden comprender tener un conjunto de antígenos de superficie común, adyuvantes acoplados comunes, materiales comunes que componen la masa del nanovehículo, una forma común, un tamaño de partícula común y similares. Pueden identificarse múltiples poblaciones de nanovehículos sintéticos, por ejemplo, una primera población, una segunda población, una tercera población, una cuarta población y similares. En una realización, tres o más poblaciones de nanovehículos sintéticos pueden encontrarse presentes, preferentemente donde cada población de nanovehículos sintéticos comprende un conjunto de antígenos de superficie; y donde cada conjunto de antígenos de superficie es estructuralmente o inmunológicamente diferente 35 entre sí.

40 “Proteína(s)” significa compuestos, que generalmente tienen un peso molecular mayor que 1000 daltons, que comprenden residuos de aminoácidos unidos entre sí principalmente por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos contiguos. Las proteínas pueden comprender además estructuras de enlace adicionales como estructuras secundarias, estructuras terciarias y similares. Ciertos de los enlaces peptídicos en las proteínas pueden reemplazarse por otros tipos de enlace, para varias finalidades, como la estabilización o coplamiento.

45 “Conjunto de antígenos de superficie monovalentes” significa un conjunto de antígenos de superficie donde los antígenos de superficie no son diferentes, preferentemente no son diferentes estructuralmente y/o inmunológicamente. En realizaciones, el conjunto de antígenos de superficie monovalentes se compone de múltiples copias de un tipo de antígeno de superficie que no es estructuralmente o inmunológicamente diferente (es decir, múltiples copias del mismo antígeno). Las múltiples copias del mismo antígeno pueden, en algunas realizaciones, coordinarse como se ilustra en la publicación de los Estados Unidos 2003/0223938. Un conjunto de antígenos de superficie monovalentes que se compone de múltiples copias de un tipo de antígenos de superficie que no es estructuralmente o inmunológicamente diferente no es un conjunto de antígenos de superficie 50 oligovalentes (o multivalentes).

55 “Conjunto de antígenos de superficie oligovalentes (o multivalentes)” significa un conjunto de antígenos de superficie donde existe un número limitado, que es mayor que uno, de diferentes tipos de antígenos de superficie donde la diferencia comprende diferencia estructural y/o diferencia inmunológica. En realizaciones preferidas, el número limitado de antígenos de superficie en el conjunto comprende de 2 a 15 tipos de antígenos de superficie, preferentemente de 2 a 10 tipos de antígenos de superficie, más preferentemente de 2 a 8 tipos de antígenos de superficie, más preferentemente de 2 a 7 tipos de antígenos de superficie, más preferentemente de 2 a 6 tipos de antígenos de superficie, más preferentemente de 2 a 5 tipos de antígenos de superficie, más preferentemente de 2 a 4 tipos de antígenos de superficie, más preferentemente de 2 a 3 tipos de antígenos de superficie, y aún más preferentemente de 2 tipos de antígenos de superficie. En otras realizaciones, el conjunto de antígenos de

superficie oligovalentes (o multivalentes) comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más tipos de antígenos de superficie.

“Conjunto de antígenos de superficie” significa un grupo de antígenos de superficie que se identifican, preferentemente, mediante la medición y/o predicción, con base en sus propiedades, preferentemente sus propiedades estructurales y/o inmunológicas. El conjunto de antígenos de superficie puede identificarse, en parte o en su totalidad, con base en la predicción mediante el uso de métodos sintéticos químicos utilizados para sintetizar, junto con los métodos utilizados para acoplar, el conjunto de antígenos de superficie y/o la población de nanovehículos sintéticos de los que se compone el conjunto de antígenos de superficie. Los múltiples conjuntos de antígenos de superficie pueden identificarse; por ejemplo, un primer conjunto, un segundo conjunto, un tercer conjunto y así sucesivamente.

“Estructuralmente diferente” o “diferencia estructural” significa que presenta estructuras moleculares diferentes para su interacción con un receptor de células B. En realizaciones, esta diferencia puede expresarse mediante la comparación de la prevalencia y tipos de antígenos presentados en un conjunto de antígenos de superficie para la prevalencia y tipos de antígenos presentados en un conjunto de antígenos de superficie diferente. Si la prevalencia y/o tipos de antígenos presentados son diferentes entre los conjuntos, entonces puede decirse que los conjuntos de antígenos de superficie son estructuralmente diferentes. En realizaciones, la diferencia en la prevalencia y/o tipos de antígenos presentados puede determinarse mediante la comparación de las estrategias sintéticas químicas y las estrategias de la formulación utilizadas para generar los antígenos de superficie y/o acoplar los antígenos de superficie a una superficie de los nanovehículos sintéticos. Por ejemplo, en una realización, si el conjunto de antígenos de superficie se generó mediante el uso de un compuesto o compuestos químicos particulares, y el otro conjunto de antígenos de superficie se generó mediante el uso de un compuesto o compuestos químicos diferentes, entonces puede establecerse que los dos conjuntos de antígenos de superficie son diferentes. En una realización diferente, si los antígenos de superficie se generaron mediante el uso de tres compuestos químicos para formar un conjunto de tres antígenos de superficie y los otros antígenos de superficie se generaron mediante el uso de dos compuestos químicos para formar un conjunto de dos antígenos de superficie, entonces puede establecerse que los dos conjuntos de antígenos de superficie son diferentes. En aún otra realización, si se utilizan estrategias sintéticas químicas y estrategias de formulación que no difieren (que incluyen el uso de cantidades de materiales que no difieren –dentro del error experimental– en las estrategias) para generar dos conjuntos de antígenos de superficie y (según corresponda) acoplar los dos conjuntos de antígenos de superficie a superficies de nanovehículos sintéticos, y los dos conjuntos de antígenos de superficie poseían la misma conformación y orientación, entonces probablemente los dos conjuntos de antígenos de superficie no serán estructuralmente diferentes. En realizaciones, la diferencia estructural entre un primer conjunto de antígenos de superficie y un segundo conjunto de antígenos de superficie comprende conjuntos de moléculas que no difieren que se presentan en orientaciones que difieren entre el primer y el segundo conjunto de antígenos de superficie. En realizaciones, la diferencia estructural entre un primer conjunto de antígenos de superficie y un segundo conjunto de antígenos de superficie comprende conjuntos de moléculas que no difieren que se presentan en conformaciones que difieren entre el primer y el segundo conjunto de antígenos de superficie. En realizaciones, la diferencia estructural entre un primer conjunto de antígenos de superficie y un segundo conjunto de antígenos de superficie comprende conjuntos de moléculas cuya estructura molecular es diferente entre el primer y el segundo conjunto de antígenos de superficie.

“Individuo” significa animales, incluidos los animales de sangre caliente como los humanos y primates; aves; animales domésticos o de granja como perros, gatos, ovejas, cabras, ganado, caballos y cerdos; animales de laboratorio como ratones, ratas y cobayos; peces; reptiles; animales de zoológico y salvajes; y similares.

“Antígeno(s) de superficie” significa un antígeno encontrado en o alrededor de la superficie de un nanovehículo sintético. En realizaciones preferidas, los antígenos de superficie comprenden antígenos de células B. En realizaciones, los antígenos de superficie se acoplan a los nanovehículos sintéticos.

“Nanovehículo(s) sintético(s)” significa un objeto separado que no se encuentra en la naturaleza y que posee al menos una dimensión que es menor o igual a 5 micrones en tamaño. Las nanopartículas de albúmina generalmente se incluyen como nanovehículos sintéticos, no obstante, en ciertas realizaciones los nanovehículos sintéticos no comprenden nanopartículas de albúmina. En realizaciones, los nanovehículos sintéticos no comprenden quitosano.

El nanovehículo sintético puede ser, a modo no taxativo, una o una pluralidad de nanopartículas a base de lípidos (por ejemplo, liposomas) (también denominados en la presente como nanopartículas lipídicas, es decir, nanopartículas donde la mayoría del material que compone su estructura son lípidos), nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, emulsiones a base de tensioactivos, dendrímeros, fullerenos, nanocables, partículas similares a virus (es decir, partículas principalmente compuestas por proteínas estructurales virales pero que no son infecciosas o presentan una infectividad baja), partículas a base de péptidos o proteínas (también denominadas en la presente como partículas proteínicas, es decir, partículas donde la mayoría del material que compone su estructura son péptidos o proteínas) (como nanopartículas de albúmina) y/o nanopartículas que se desarrollan mediante el uso de una combinación de nanomateriales como nanopartículas de lípido-polímero. Los nanovehículos sintéticos pueden tener una variedad de formas diferentes, que incluyen a modo no taxativo, esférico, cuboidal, piramidal, oblonga, cilíndrica, toroidal y similares. Los nanovehículos sintéticos de conformidad con la invención comprenden una o más superficies. Los nanovehículos sintéticos ejemplares que pueden

adaptarse para su uso en la práctica de la presente invención comprenden: (1) las nanopartículas biodegradables divulgadas en la patente de Estados Unidos 5,543,158 de Gref et al., (2) las nanopartículas poliméricas de la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 20060002852 de Saltzman et al., (3) las nanopartículas construidas litográficamente de la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 20090028910 de DeSimone et al., (4) la divulgación de WO 2009/051837 de von Andrian et al., (5) las nanopartículas divulgadas en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2008/0145441 de Penades et al., (6) las nanopartículas proteínicas divulgadas en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 20090226525 de de los Rios et al., (7) las partículas similares a virus divulgadas en la solicitud de patente de Estados Unidos 20060222652 de Sebbel et al., (8) las partículas similares a virus acopladas a ácido nucleico divulgadas en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada 20060251677 de Bachmann et al., (9) las partículas similares a virus divulgadas en WO2010047839A1 o WO2009106999A2, o (10) las nanopartículas nanoprecipitadas divulgadas en P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" *Nanomedicine*. 5(6):843-853 (2010). En realizaciones, los nanovehículos sintéticos pueden poseer una relación de aspecto mayor que 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, o mayor que 1:10.

Los nanovehículos sintéticos de conformidad con la invención que tienen una dimensión mínima igual o menor que 100 nm, preferentemente igual o menor que 100 nm, no comprenden una superficie con grupos hidroxilo que activan complementos o de forma alternativa, comprenden una superficie que consiste básicamente en porciones que no son grupos hidroxilo que activan complementos. En una realización preferida, los nanovehículos sintéticos de conformidad con la invención que tienen una dimensión mínima igual o menor que 100 nm, preferentemente igual o menor que 100 nm, no comprenden una superficie que activa complementos de forma sustancial o, de forma alternativa, comprenden una superficie que consiste básicamente en porciones que no activan complementos de forma sustancial. En una realización más preferida, los nanovehículos sintéticos de conformidad con la invención que tienen una dimensión mínima igual o menor que 100 nm, preferentemente igual o menor que 100 nm, no comprenden una superficie que activa complementos o, de forma alternativa, comprenden una superficie que consiste básicamente en porciones que no activan complementos. En realizaciones, los nanovehículos sintéticos excluyen partículas similares a virus. En realizaciones, cuando los nanovehículos sintéticos comprenden partículas similares a virus, las partículas similares a virus comprenden adyuvantes no naturales (lo que significa que las partículas similares a virus (VLP) comprenden un adyuvante diferente a un ARN natural generado durante la producción de las partículas similares a virus). En realizaciones, los nanovehículos sintéticos pueden poseer una relación de aspecto mayor que 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, o mayor que 1:10.

"Antígeno de linfocitos T" significa cualquier antígeno que sea reconocido y dispare una respuesta inmune en un linfocito T (por ejemplo, un antígeno que sea específicamente reconocido por un receptor de linfocitos T en un linfocito T o en un linfocito NKT mediante la presentación del antígeno o su porción unida a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II o unida a un complejo CD1. En algunas realizaciones, el antígeno que es un antígeno de linfocitos T también es un antígeno de células B. En otras realizaciones, el antígeno de linfocitos T no es un antígeno de células B. Los antígenos de linfocitos T generalmente son proteínas o péptidos. Los antígenos de linfocitos T pueden ser un antígeno que estimule la respuesta de CD8+ linfocito T, la respuesta de CD4 + linfocito T o ambas. Por consiguiente, los nanovehículos, en algunas realizaciones pueden estimular de forma eficaz ambos tipos de respuesta.

En algunas realizaciones el antígeno de linfocitos T es un antígeno de linfocitos T "universal" o un antígeno de memoria de linfocitos T, (es decir, uno para el cual un individuo tiene una memoria preexistente y que puede utilizarse para estimular la asistencia de linfocitos T a un antígeno no relacionado, por ejemplo un antígeno de células B no relacionado). Los antígenos de linfocitos T universales incluyen un toxoide tetánico, así como uno o más péptidos derivados de un toxoide tetánico, virus de Epstein-Barr o virus de la gripe. Los antígenos de linfocitos T universales incluyen además un componente del virus de la gripe, como hemaglutinina, neuraminidasa o proteína nuclear o uno o más péptidos derivados de estos. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T universales no es uno que se presenta en un complejo con una molécula del MHC. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T universales no forma un complejo con una molécula del MHC para la presentación para un linfocito T auxiliar. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T universales no es un antígeno de linfocitos T colaboradores. No obstante, en otras realizaciones, el antígeno de linfocitos T universales es un antígeno de linfocitos T colaboradores.

En realizaciones, el antígeno de linfocitos T colaboradores puede comprender uno o más péptidos obtenidos o derivados del toxoide tetánico, virus de Epstein-Barr, virus de la gripe, virus sincitial respiratorio, virus del sarampión, virus de paperas, virus de la rubeola, citomegalovirus, adenovirus, toxoide de difteria, o un péptido PADRE (conocido por el trabajo de Sette et al., patente de Estados Unidos 7,202,351). En otras realizaciones, el antígeno de linfocitos T colaboradores puede comprender ovoalbúmina o un péptido obtenido o derivado de esta. Preferentemente, la ovoalbúmina comprende la secuencia de aminoácidos como se expresa en el No. de acceso AAB59956, NP\_990483.1, AAA48998, o CAA2371. En otras realizaciones, el péptido obtenido o derivado de ovoalbúmina comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: H-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH (SEQ ID NO: 1). En otras realizaciones, el antígeno de linfocitos T colaboradores puede comprender uno o más lípidos, o glicolípidos, que incluyen a modo no taxativo:  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer), glicoesfingolípidos unidos por  $\alpha$  (de *Sphingomonas spp.*), galactosil diacilgliceroles (de *Borrelia burgdorferi*),

lipofosfoglicano (de *Leishmania donovani*), y fosfatidilinositol tetramanosida (PIM4) (de *Mycobacterium leprae*). Por lípidos y/o glicolípidos adicionales útiles como antígenos de linfocitos T colaboradores, véase V. Cerundolo et al., "Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies". *Nature Rev Immun*, 9:28-38 (2009).

5 En realizaciones, los CD4 + antígenos de linfocitos T pueden ser derivados de un CD4 + antígeno de linfocitos T que se obtiene de una fuente como una fuente natural. En dichas realizaciones, las secuencias de CD4 + antígeno de linfocitos T, como los péptidos que se unen a MHC II, pueden tener al menos un 70%, 80%, 90%, o un 95% de identidad con el antígeno obtenido de la fuente. En realizaciones, el antígeno de linfocitos T, preferentemente un antígeno de linfocitos T universales o un antígeno de linfocitos T colaboradores, puede encontrarse acoplado o no acoplado a un nanovehículo sintético. En algunas realizaciones, el antígeno de linfocitos T universales o antígeno de linfocitos T colaboradores se encuentra encapsulado en los nanovehículos de las composiciones de la invención.

"Tipos de antígenos de superficie" significa un grupo definido de antígenos de superficie que comparten una o más características químicas y/o inmunológicas comunes.

15 "Vacuna" significa una composición de material que mejora la respuesta inmune a un patógeno o enfermedad particular. Una vacuna generalmente contiene factores que estimulan el sistema inmune del individuo para que reconozca un antígeno específico como extraño y lo elimine del cuerpo del individuo. La vacuna también establece una 'memoria' inmunológica de forma tal que el antígeno será reconocido rápidamente y se responderá a este si se pone a prueba nuevamente a la persona. Las vacunas pueden ser profilácticas (por ejemplo para prevenir una futura infección por cualquier patógeno) o terapéutica (por ejemplo una vacuna contra un antígeno específico de un tumor para el tratamiento del cáncer). En realizaciones, la vacuna puede comprender formas de dosificación de conformidad con la invención.

#### POBLACIONES DE NANOVEHÍCULOS Y CONJUNTOS DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE

25 En algunas realizaciones, las poblaciones de nanovehículos sintéticos comparten características físicas o químicas comunes. En realizaciones, tales características físicas o químicas comunes pueden comprender un conjunto común de antígenos de superficie, adyuvantes acoplados comunes, materiales comunes que componen la masa del nanovehículo, una forma común, un tamaño de partícula común, una carga superficial común y similares. Los tipos de adyuvantes, materiales, formas y tamaños de partículas se discuten a lo largo de la presente solicitud.

30 En realizaciones, una población puede compartir un conjunto de antígenos de superficie común. Estos antígenos de superficie comunes pueden agruparse con base en las características físicas o químicas comunes, como, a modo no taxativo, las propiedades estructurales o inmunológicas. En realizaciones, las características comunes pueden comprender una orientación o conformación común, o conjuntos de moléculas que comparten una estructura molecular común, o todo lo que antecede. En realizaciones, los antígenos de superficie comunes pueden comprender aquellos que tienen un peso molecular menor que 10.000. En otras realizaciones, los antígenos de superficie comunes pueden comprender péptidos, proteínas, oligosacáridos, polisacáridos o moléculas pequeñas. En aún otras realizaciones, los antígenos de superficie comunes pueden comprender los que presentan un peso molecular menor que 10.000 y que comprenden péptidos, proteínas, oligosacáridos, polisacáridos o moléculas pequeñas. En otras realizaciones, los antígenos de superficie comunes pueden agruparse con base en los organismos infecciosos de los que se obtuvieron o derivaron; y se categorizarían por compartir géneros, especies y/o cepas comunes. En realizaciones donde los antígenos de superficie tienen un peso molecular menor que 10.000, los antígenos de superficie comunes pueden agruparse con base en las clases de moléculas como los agentes de guerra química, toxinas medioambientales, sustancias de abuso o adictivas y moléculas fisiológicamente endógenas que incluyen, a modo no taxativo, hormonas, lípidos y neurotransmisores. En algunas realizaciones, los conjuntos de antígenos de superficie comunes pueden definirse por la fuerza de su capacidad para inducir una respuesta de anticuerpo in vivo. Por ejemplo, un conjunto de antígenos puede tener la capacidad de inducir una producción de anticuerpos de alta afinidad *in vivo*, mientras que otro conjunto de antígenos de superficie puede inducir una producción de afinidad baja *in vivo*.

45 En realizaciones, el conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) puede comprender antígenos obtenidos o derivados de un agente infeccioso. En algunas realizaciones, el agente infeccioso es una bacteria, hongo, virus, protozoo o parásito. En otras realizaciones, el virus es el virus de la sífilis, el virus de la viruela, el virus ébola, el virus de Marburgo, virus del sarampión (en realizaciones, el antígeno puede obtenerse o derivarse de la proteína hemaglutinina, epítipo de enlace de hemaglutinina, aminoácidos hemaglutinizantes 106-114 y/o 519-550, etc.), virus de la fiebre del dengue, virus de la gripe, virus de la gripe A virus (en realizaciones, el antígeno puede obtenerse o derivarse de una proteína HA, proteína M2e, etc.), virus de la gripe H5N1, virus de la gripe H1N1, virus de la anemia infecciosa del salmón, virus de parainfluenza, virus sincitial respiratorio, virus de la rubeola, virus de inmunodeficiencia humana, virus del papiloma humano, virus varicela-zóster, virus del herpes simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr virus, virus JC, rabdovirus, rotavirus, rinovirus, adenovirus, papilomavirus (en realizaciones, el antígeno puede obtenerse o derivarse de proteínas L1 o L2), parvovirus, picornavirus, poliovirus, virus que produce paperas, virus que provocan rabia, reovirus, virus de la rubeola, togavirus, ortomixovirus, retrovirus, hepadnavirus, virus de Coxsackie, virus de encefalitis equina, encefalitis por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa, virus de la fiebre amarilla, virus de la

fiebre de Rift Valley, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D o virus de la hepatitis E.

5 En realizaciones, un conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) comprende o se obtiene o deriva de un virus de una familia de virus mostrados a continuación en la tabla 1. En otra realización, un conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) comprende o se obtiene o deriva de un virus de una especie proporcionada en la tabla 1. En aún otra realización, un conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) comprende o se obtiene o deriva de un antígeno proporcionado en la tabla 1.

10 **Tabla 1: Agentes infecciosos virales**

Familia	Especies ejemplares	Antígenos ejemplares
Adenoviridae	adenovirus	VI, VII, E1A, E3-19K, 52K
Picornaviridae	virus de Coxsackie	VP1
	Virus de la hepatitis A	Antígeno de superficie
	poliovirus	Proteína 3A, proteína de la cápside
	Rinovirus (por ejemplo, tipo 16)	Nucleocápside, proyección de la superficie y proteínas transmembranales.
Herpesviridae	Herpes simple (tipo 1 y tipo 2)	Proteínas de la cápside (por ejemplo, UL6, UL18, UL35, UL38, y UL19)
	virus varicela-zóster	Antígeno prematuro
	virus de Epstein-Barr	Antígeno prematuro, antígeno de la cápside
	citomegalovirus humano	Pp65, gB, p52
	Virus del herpes humano (por ejemplo, tipo 8)	Antígeno nuclear latente 1
Hepadnaviridae	Virus de la hepatitis B	Antígeno de superficie
Flaviviridae	Virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo occidental	NS3, proteína envolvente (por ejemplo, dominio E2)
Retroviridae	VIH	gp120, p24, y lipopéptidos Gag (17-35), Gag (253-284), Nef (66-97), Nef (116-145), y Pol (325-355); véase Roberts et al., J. Immunol. Methods, 365(1-2):27-37, 2011
Orthomyxoviridae	Virus de la gripe	neuraminidasa, antígeno de superficie,
Paramyxoviridae	Virus del sarampión	proteína de la nucleocápside, proteína de matriz, fosfoproteína, proteína de fusión, hemaglutinina, hemaglutinina-neuraminidasa, glicoproteína
	Virus de paperas	
	Virus de la parainfluenza	
	virus sincitial respiratorio	
	Metaneumovirus humano	
Papillomaviridae	virus del papiloma humano (por ejemplo, tipo 16 y 18)	E6, E7, antígeno de la cápside

Rhabdoviridae	Virus de la rabia	Lipoproteína envolvente
Togaviridae	Virus de la rubeola	Proteína de la cápside
Paroviridae	Bocavirus humano o parvovirus humano B19.	Proteína de la cápside, proteína no estructural (NS)

En otras realizaciones, el conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) puede comprender antígenos obtenidos o derivados de organismos bacterianos como especies de *Borrelia*, *Bacillus anthracis*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Camphylobacter jejuni*, especies de *Chlamydia*, *Chlamydial psittaci*, *Chlamydial trachomatis*, especies de *Clostridium*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, especies de *Coxiella*, una especie de *Enterococcus*, especies de *Ehrlichia*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, especies de *Haemophilus*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, especies de *Lactobacillus*, una especie de *Legionella*, *Legionella pneumophila*, *Leptospiriosis interrogans*, especies de *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Mycobacterium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, especies de *Mycoplasma*, *Mycoplasma pneumoniae*, especies de *Neisseria*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, especies de *Pneumococcus* (por ejemplo, tipo 6A, 6B, 3, 4, 14, 19F, etc.), especies de *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Salmonella*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enterica*, especies de *Rickettsia*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, especies de *Shigella*, especies de *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, especies de *Treponema*, *Treponema pallidum*, una especie de *Vibrio*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis* y similares.

En realizaciones, un conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) comprende o se obtiene o deriva de una bacteria del género de bacterias mostrado a continuación en la tabla 2. En otra realización, un conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) comprende o se obtiene o deriva de una especie de bacterias proporcionada en la tabla 2. En aún otra realización, un conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) comprende o se obtiene o deriva de un antígeno proporcionado en la tabla 2.

Tabla 2: Agentes infecciosos bacterianos

Género bacteriano patogénico	Especies ejemplares	Antígenos ejemplares
<i>Bordetella</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	oxina Pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN), fimbrias (FIM 2/3)
<i>Borrelia</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	VlsE; DbpA y OspA
<i>Brucella</i>	<i>Brucella abortus</i>	Hia, PrpA, MltA, L7/L12, D15, 0187, VirJ, Mdh, AfuA
	<i>Brucella canis</i>	L7/L12
	<i>Brucella melitensis</i>	Proteínas fuera de la membrana como Omp28
	<i>Brucella suis</i>	
<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	LPS, un antígeno 100-kD
<i>Chlamydia y Chlamydophila</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Véase Richard et al., J. Infectious Diseases. 181:S521 (2000)
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	
	<i>Chlamydophila psittaci</i>	
<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	Antígenos tipos A, B, C, D, y E
	<i>Clostridium difficile</i>	FliC, FliD, y Cwp84
	<i>Clostridium perfringens</i>	alfa-toxina, tetra-toxina, fructosa 1,6-bifosfato-aldolasa (FBA), gliceraldehidos-3-fosfato dehidrogenasa (GPD), piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), factor de elongación-G (EF-G), proteína hipotética (HP)
	<i>Clostridium tetani</i>	Toxina T
<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Anfígeno toxoide
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Polisacáridos capsulares
	<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	Véase Moriel et al., PNAS 107(20):9072-9077 (2010)
<i>Francisella</i>	<i>Francisella tularensis</i>	Véase Havlasova et al., Proteomics 2(7):857-867, 2002
<i>Haemophilus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	Polisacáridos capsulares, proteína D
<i>Helicobacter</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	Véase Bumann et al., Proteomics 4(10):2843-2843, 2004
<i>Legionella</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	Mip
<i>Leptospira</i>	<i>Leptospira interrogans</i>	Véase Brown et al., Infect Immu 59(5):1772-1777, 1991
<i>Listeria</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Nucleoproteína (NP)

<i>Mycobacterium*</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RD1, PE35, PPE68, EsxA, EsxB, RD9, y EsxV
	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	
<i>Mycoplasma</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Hsp70
<i>Neisseria</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
	<i>Neisseria meningitidis</i>	Véase Litt et al., J. Infectious Disease 190(8):1488-1497, 2004
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lipopolisacáridos
<i>Rickettsia</i>	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Antígeno de superficie
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhi</i>	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Shigella</i>	<i>Shigella sonnei</i>	
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Véase Vytvtska et al., Proteomics 2(5):580-590, 2002; Etz et al., PNAS 99(10):6573-6578; 2002
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sp1, Sp2, Sp3
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Lei et al., J. Infectious Disease 189(1):79-89, 2004
<i>Treponema</i>	<i>Treponema pallidum</i>	Glicerofosfodiéster fosfodiesterasa
<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	Proteínas fuera de la membrana como OmpK
<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia pestis</i>	proteína Chaperone-Usher, proteína capsular (F1) o proteína V

En aún otras realizaciones, el conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) puede comprender antígenos obtenidos o derivados de hongos, protozoos, y/u organismos parasíticos como especies de *Aspergillus*, especies de *Candida*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, especies de *Cryptococcus*, *Cryptococcus neoformans*, *Entamoeba histolytica*, *Histoplasma capsulatum*, especies de *Leishmania*, *Nocardia asteroides*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, especies de *Toxoplasma*, *Trypanosoma brucei*, *Schistosoma mansoni* y similares.

5

En aún otras realizaciones, el conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) puede comprender antígenos obtenidos o derivados de una toxina, como O-alquilo (<C10, incluido cicloalquilo) alquil (Me, Et, n-Pr o i-Pr)-fosfonofluoridatos (por ejemplo, Sarin: metilfosfonofluoridato de O-isopropilo, Soman: metilfosfonofluoridato de O-pinacolilo), O-alquil (<C10, incluido cicloalquilo) N,N-dialquil (Me, Et, n-Pr o i-Pr) fosforamidocianidatos (por ejemplo, Tabun: O-Etil N,N-dimetilfosforamidocianidato), O-alquil (H o <C10, incluido cicloalquilo) S-2-dialquil (Me, Et, n-Pr o i-Pr)-aminoetil alquil (Me, Et, n-Pr o i-Pr) fosfonotiolatos y las correspondientes sales alquiladas o protonadas (por ejemplo, VX: O-etil S-2-diisopropilaminoetil metilfosfonotiolato), mostazas de azufre: 2-cloroetilclorometilsulfuro, gas mostaza: bis(2-cloroetil)sulfuro, bis(2-cloroetil) metano,

10



sesquimostaza: 1,2-Bis(2-cloroetil)etano, 1,3-bis(2-cloroetil)-n-propano, 1,4-bis(2-cloroetil)-n-butano, 1,5-bis(2-cloroetil)-n-pentano, bis(2-cloroetil)éter, O-mostaza: bis(2-cloroetil)éter, Lewisites: Lewisite 1: 2-clorovinildicloroarsina, Lewisite 2: Bis(2-clorovinil)cloroarsina, Lewisite 3: tris(2-clorovinil)arsina, mostazas de nitrógeno: HN1: bis(2-cloroetil)etilamina, HN2: bis(2-cloroetil)metilamina, HN3: tris(2-cloroetil)amina, saxitoxina, ricina, amiton: O,O-dietil S-(2-(dietilamino)etil)fosforotiolato y las sales alquiladas o protonadas correspondientes, PFIB: 1,1,3,3,3-pentafluoro-2-(trifluorometil)-1-propeno, benzilato de 3-quinuclidinilo (BZ), fosgeno: dicloruro de carbonilo, cloruro de cianógeno, cianuro de hidrógeno y cloropicrina: tricloronitrometano.

En otras realizaciones, un conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) comprende o se obtiene o deriva de un hongo del género de hongos mostrado a continuación en la tabla 3. En otra realización, un conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) comprende o se obtiene o deriva de una especie de hongos proporcionada en la tabla 3. En aún otra realización, un conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) comprende o se obtiene o deriva de un antígeno proporcionado en la tabla 3.

**Tabla 3: Agentes infecciosos fúngicos**

Género	Especies ejemplares	Antígenos ejemplares
<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>	Antígenos de superficie, véase también Thomas et al., Proteomics 6(22):6033-6041, 2006
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Aspergillus flavus</i> .	Stevens et al., Medical Mycology 49 (Suppl. 1):S170-S176, 2011
<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i> y <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Cryptococcus gattii</i>	Glicoproteínas capsulares
<i>Histoplasma</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Yps3P, Hsp60
<i>Pneumocystis</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	proteína principal de superficie (Msg) como MsgC1, MsgC3, MsgC8 y MsgC9
<i>Stachybotrys</i>	<i>Stachybotrys chartarum</i>	SchS34,

En aún otras realizaciones, un conjunto de antígenos de superficie (por ejemplo, un primer y/o un segundo conjunto de antígenos de superficie) puede comprender antígenos obtenidos o derivados de una sustancia de abuso o adictiva. En algunas realizaciones, la sustancia de abuso o adictiva es una droga, como una droga ilegal, medicación sin receta o un fármaco de venta con receta. En otras realizaciones, la sustancia de abuso o adictiva produce efectos que alteran el humor y, por consiguiente, incluye inhalantes y solventes. En otras realizaciones, la sustancia de abuso o adictiva es una que no produce efectos de alteración del humor o propiedades de intoxicación y, por consiguiente, incluye esteroides anabólicos. La sustancia de abuso o adictiva incluye, a modo no taxativo, cannabinoides (por ejemplo, hachís, marihuana), depresivos (por ejemplo, barbituatos, benzodiazepinas, flunitrazepam (Rohypnol), GHB, metacualona (quaaludes)), anestésicos disociativos (por ejemplo, ketamina, PCP), alucinógenos (por ejemplo, LSD, mescalina, psilocibina), derivados de opioides y morfina (por ejemplo, codeína, fentanil, heroína, morfina, opio), estimulantes (anfetamina, cocaína, éxtasis (MDMA), metanfetamina, metilfenidato (Ritalina), nicotina), esteroides anabólicos e inhalantes. En realizaciones, el antígeno comprende un análogo de cocaína, como norcocaína. En otras realizaciones, el antígeno comprende cotinina.

En realizaciones de la presente invención, pueden combinarse diferentes poblaciones de nanovehículos sintéticos donde cada una comprende un conjunto de antígenos de superficie. La diferencia entre las poblaciones se basa en las diferencias entre los conjuntos de antígenos de superficie.

En ciertas realizaciones, estas diferencias pueden comprender diferencias en las características físicas o químicas, tales como, a modo no taxativo, propiedades estructurales o inmunológicas. En realizaciones, las diferencias pueden comprender diferencias en la orientación o conformación de los antígenos de superficie, o diferencias en la estructura molecular entre los conjuntos de antígenos de superficie. En aún otras realizaciones, la diferencia en los antígenos de superficie puede basarse en los organismos infecciosos de los que se obtuvieron o derivaron; y se categorizarían por pertenecer a géneros, especies y/o cepas diferentes. En realizaciones donde los antígenos de superficie tienen un peso molecular menor que 10.000, los antígenos de superficie pueden ser diferentes con base

en las clases químicas como los agentes de guerra química, sustancias adictivas o de abuso y moléculas endógenas que incluyen, a modo no taxativo, hormonas, lípidos y neurotransmisores.

En algunas realizaciones, las diferencias pueden comprender diferencias en la orientación o conformación de los antígenos de superficie. Por ejemplo, los diferentes puntos de unión de un antígeno de superficie a un nanovehículo sintético darían lugar a diferentes presentaciones de dicho antígeno de superficie. Estas diferentes presentaciones pueden producir anticuerpos que reconocen diferentes epítomos del antígeno de superficie. Los antígenos de superficie pueden presentarse con diferentes conformaciones y pueden sintetizarse o modificarse para lograr dichas conformaciones. Por ejemplo, puede realizarse el truncado de péptidos o proteínas donde los resultados en los cambios conformacionales modificados en el antígeno peptídico o proteínico de interés. De forma alternativa, pueden agregarse aminoácidos o enlaces químicos para proporcionar una mayor longitud o estabilizar una orientación específica que altera la exposición del antígeno de péptidos o proteínas. De forma similar, los antígenos como los que presentan un peso molecular menor que 10.000 o los oligosacáridos o los polisacáridos pueden alterarse mediante la adición de un enlace químico o mediante modificación química.

En otras realizaciones, las diferencias entre las poblaciones de nanovehículos sintéticos pueden basarse en las diferencias entre los conjuntos de antígenos de superficie con base en las diferentes estructuras moleculares y/o la prevalencia de los antígenos. En algunas realizaciones, la diferencia puede comprender una diferencia en la prevalencia de uno o más tipos de antígenos de superficie entre los conjuntos.

En realizaciones donde una población comprende un conjunto monovalente de antígenos de superficie, la estructura molecular, preferentemente el tipo de antígeno, de su conjunto de antígenos de superficie puede ser diferente de la estructura molecular de un conjunto de antígenos de superficie monovalentes de otra población u otras poblaciones. En ciertas realizaciones, donde una población comprende un conjunto monovalente de antígenos de superficie, la prevalencia de los antígenos de superficie de los que se compone su conjunto de antígenos de superficie puede ser diferente a la prevalencia de los antígenos de superficie de los que se compone un conjunto de antígenos de superficie monovalentes de otra población u otras poblaciones.

En realizaciones donde una población de nanovehículos sintéticos comprende un conjunto de antígenos de superficie oligovalentes (o multivalentes), pueden combinarse varios tipos de antígenos en diferentes prevalencias dentro del conjunto para formar combinaciones de dichos tipos de antígenos de superficie. Por consiguiente, en realizaciones donde al menos una población de nanovehículos sintéticos comprende un conjunto de antígenos de superficie oligovalentes (o multivalentes), la estructura molecular del conjunto de antígenos de superficie oligovalentes (o multivalentes) (que pueden expresarse como una función de la estructura molecular de cada tipo de antígeno, junto con su prevalencia dentro del conjunto) puede ser diferente a la estructura molecular del conjunto de antígenos de superficie de otra población u otras poblaciones. En realizaciones, esto puede ser debido a que otra población comprende un conjunto monovalente de antígenos de superficie (donde los conjuntos de antígenos de superficie serían diferentes por definición) o debido a que otra población comprende un conjunto de antígenos de superficie oligovalentes (o multivalentes) donde las estructuras moleculares de los dos conjuntos de antígenos de superficie (expresados como una estructura molecular de cada tipo de antígeno y/o una prevalencia de cada tipo de antígeno dentro del conjunto) son diferentes.

Por ejemplo, los conjuntos de antígenos de superficie pueden estar compuestos por un conjunto de enantiómeros como nicotina (R) y (S). Los enantiómeros pueden encontrarse presentes en cantidades iguales en los mismos nanovehículos o en nanovehículos diferentes y pueden encontrarse presentes en cantidades desiguales en las mismas poblaciones de nanovehículos sintéticos o en poblaciones diferentes. En otra realización, el conjunto de antígenos de superficie puede comprender dos moléculas estructuralmente diferentes pero relacionadas como cotinina y nicotina ópticamente puras o racémicas. La cotinina y nicotina puede encontrarse presente en cantidades iguales en las mismas poblaciones de nanovehículos sintéticos o en poblaciones diferentes y puede encontrarse presente en cantidades desiguales en las mismas poblaciones de nanovehículos sintéticos o en poblaciones diferentes. Además, los conjuntos de antígenos de superficie pueden estar compuestos por antígenos de un único organismo compuesto por varios serotipos como los polisacáridos antigénicos capsulares de *Streptococcus Pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Los varios antígenos pueden encontrarse presentes en cantidades iguales en las mismas poblaciones de nanovehículos sintéticos o en poblaciones diferentes y pueden encontrarse presentes en cantidades desiguales en las mismas poblaciones de nanovehículos sintéticos o en poblaciones diferentes. En realizaciones, los conjuntos de antígenos de superficie pueden comprender una familia de antígenos diferentes de un único organismo como las proteínas de la cápside L1 y L2 del virus del papiloma humano. Los conjuntos de antígenos de superficie pueden encontrarse presentes en cantidades iguales en las mismas poblaciones de nanovehículos sintéticos o en poblaciones diferentes y pueden encontrarse presentes en cantidades desiguales en las mismas poblaciones de nanovehículos sintéticos o en poblaciones diferentes. En realizaciones, los conjuntos de antígenos de superficie pueden comprender varias moléculas pequeñas de diversas estructuras como los gases de guerra VX, sarín y somán. Los diferentes compuestos pueden encontrarse presentes en cantidades iguales en las mismas poblaciones de nanovehículos sintéticos o en poblaciones diferentes y pueden encontrarse presentes en cantidades desiguales en las mismas poblaciones de nanovehículos sintéticos o en poblaciones diferentes. Por ejemplo, en una realización, un conjunto de antígenos de superficie puede comprender un 50% de VX y un 50% de sarina, mientras que otro conjunto de antígenos de superficie puede comprender un



*jiroveci*. En otras realizaciones, una población de nanovehículos sintéticos puede comprender un conjunto de antígenos de superficie obtenidos o derivados de una fuente viral, mientras que la otra población puede comprender un conjunto de antígenos de superficie obtenidos o derivados de parásitos como *plasmodium falciparum*. Otras combinaciones y subcombinaciones junto con las líneas de ilustraciones anteriores se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

En otras realizaciones, los varios conjuntos de antígenos de superficie pueden obtenerse o derivarse de géneros, especies o cepas infecciosas que no son diferentes. En realizaciones, tales diferencias pueden surgir de la selección de antígenos diferentes dentro del género, especie o cepa infecciosa. Por ejemplo, un conjunto de antígenos de superficie puede obtenerse o derivarse de una proteína de recubrimiento viral, mientras que el otro conjunto de antígenos de superficie puede obtenerse o derivarse de diferentes epítomos a partir de la misma o de otra proteína de recubrimiento viral del mismo virus. En una realización, los diferentes conjuntos de antígenos de superficie pueden obtenerse o derivarse de una proteína viral, por ejemplo, la proteína de la cápside del citomegalovirus (CMV) u otras proteínas del CMV, que pueden comprender varios epítomos diferentes. Del mismo modo, los diferentes conjuntos de antígenos de superficie pueden obtenerse o derivarse de diferentes epítomos de difteria o toxina tetánica.

En otras realizaciones, las diferencias entre las poblaciones de nanovehículos sintéticos pueden basarse en las diferencias entre los conjuntos de antígenos de superficie con base en las diferentes clases químicas de los antígenos. Por ejemplo, en el caso de las moléculas que tienen un peso molecular menor que 10.000 tales diferencias pueden basarse en el andamiaje químico o la estructura molecular total o la actividad mostrada por dichas moléculas. Por ejemplo, los conjuntos de antígenos de superficie diferentes pueden obtenerse o derivarse de conjuntos de antígenos de superficie de diferente estructura pero con actividades similares como los opiodes tales como la morfina y la heroína. En otras realizaciones, los diferentes conjuntos de antígenos de superficie pueden estar compuestos por moléculas con estructuras similares pero con actividades diferentes ejemplificadas por los enantiómeros tales como ritalina (R) y (S) o nicotina (R) y (S). En algunas realizaciones, las diferencias entre los conjuntos de antígenos de superficie pueden comprender compuestos y sus metabolitos como la terfenadina y fexofenadina o astemazol y norastemazol. Las diferencias entre los conjuntos de antígenos de superficie también pueden basarse en la no asociación de la estructura de los compuestos tales como la nicotina y la metanfetamina.

En otras realizaciones, las diferencias entre las poblaciones de nanovehículos sintéticos pueden basarse en las diferencias entre los conjuntos de antígenos de superficie con base en las diferencias inmunológicas entre los conjuntos de antígenos de superficie. En realizaciones, los conjuntos de antígenos de superficie pueden definirse por su capacidad para inducir una respuesta inmune *in vivo*. Por ejemplo, un conjunto de antígenos de superficie puede tener la capacidad de inducir altos niveles de producción de anticuerpos de alta afinidad para un antígeno de interés *in vivo*, mientras que un segundo conjunto de antígenos de superficie puede no inducir altos niveles de producción de anticuerpos de alta afinidad *in vivo* para dicho antígeno. Como otro ejemplo, un primer conjunto de antígenos de superficie puede tener la capacidad de generar valoraciones de anticuerpos específicas para los antígenos del primer conjunto de antígenos de superficie, mientras que el segundo conjunto de antígenos de superficie puede tener la capacidad de generar valoraciones de anticuerpos específicas para los antígenos del segundo conjunto de antígenos de superficie. En algunas realizaciones, el segundo conjunto de antígenos de superficie genera valoraciones de anticuerpos específicas para los antígenos del segundo conjunto de antígenos de superficie pero no para los antígenos del primer conjunto.

#### COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS DE LA INVENCIÓN

Los nanovehículos sintéticos pueden prepararse mediante el uso de una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los nanovehículos sintéticos pueden formarse mediante métodos como nanoprecipitación, enfoque de flujo mediante el uso de canales fluidicos, secado por atomización, evaporación de solvente de emulsión simple y doble, extracción de solventes, separación de fases, molienda, procedimientos de microemulsión, microfabricación, nanofabricación, capas sacrificio, coacervación simple y compleja y otros métodos bien conocidos por los entendidos en la técnica. De forma alternativa o adicional, se han descrito las síntesis de solventes acuosos y orgánicos para monodispersar materiales semiconductores, conductores, magnéticos, orgánicos y otros nanomateriales (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; and Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843). En la bibliografía se han descrito métodos adicionales (véase, por ejemplo, Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy," CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; y Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755, y también las patentes de los Estados Unidos 5578325 y 6007845; P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)).

En algunas realizaciones, la presente invención comprende medios de nanovehículos sintéticos para presentar conjuntos de antígenos de superficie, preferentemente conjuntos de antígenos de superficie monovalentes u oligovalentes. Una realización particular de la invención comprende un primer medio de nanovehículo sintético para presentar un primer conjunto de antígenos de superficie, preferentemente un primer conjunto de antígenos de superficie monovalentes u oligovalentes; y un segundo medio de nanovehículo sintético para presentar un segundo conjunto de antígenos de superficie; preferentemente un segundo conjunto de antígenos de superficie monovalentes

u oligovalentes. Tales medios de nanovehículos sintéticos para presentar antígenos de superficie se divulgan a lo largo de la presente divulgación y abarcan las realizaciones divulgadas en la presente.

Varios materiales pueden encapsularse en nanovehículos sintéticos como se desea mediante el uso de una variedad de métodos incluidos, a modo no taxativo, C. Aste et al., "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles" *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 17, No. 3, pág. 247-289 (2006); K. Avgoustakis "Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery" *Current Drug Delivery* 1:321-333 (2004); C. Reis et al., "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles" *Nanomedicine* 2:8-21 (2006); P. Paolicelli et al., "Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles" *Nanomedicine*. 5(6):843-853 (2010). Pueden utilizarse otros métodos adecuados para encapsular materiales, como los oligonucleótidos, en nanovehículos sintéticos, incluidos, a modo no taxativo, los métodos divulgados en la patente de Estados Unidos 6,632,671 de Unger, 14 de octubre de 2003.

En ciertas realizaciones, los nanovehículos sintéticos se preparan mediante un proceso de nanoprecipitación o secado por atomización. Las condiciones utilizadas en la preparación de los nanovehículos sintéticos pueden alterarse para proporcionar partículas con un tamaño o propiedad deseada (por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliidad, morfología externa, "pegajosidad", forma, etc.). El método para preparar los nanovehículos sintéticos y las condiciones (por ejemplo, solvente, temperatura, concentración, velocidad de flujo de aire) utilizadas pueden depender de los materiales que van a acoplarse a los nanovehículos sintéticos y/o de la composición de la matriz polimérica.

Si las partículas preparadas mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente tienen un intervalo de tamaño por fuera del intervalo deseado, las partículas pueden clasificarse según el tamaño, por ejemplo, mediante el uso de un tamiz, centrifugación diferencial o sedimentación.

Los elementos de los nanovehículos sintéticos de la invención como las porciones de las que se compone una superficie inmunoactiva, porciones diana, matrices poliméricas, antígenos, adyuvantes y similares pueden acoplarse al nanovehículo sintético, por ejemplo, mediante uno o más enlaces covalentes, o pueden acoplarse por medio de uno o más enlaces. Otros métodos para funcionalizar nanovehículos sintéticos pueden adaptarse a partir de la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos 2006/0002852 de Saltzman et al., la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos 2009/0028910 de DeSimone et al., o la solicitud de patente internacional publicada WO/2008/127532 A1 de Murthy et al.

De forma alternativa o adicional, los nanovehículos sintéticos pueden acoplarse a porciones de las cuales se compone la superficie inmunoactiva, porciones diana, adyuvantes, antígenos y/u otros elementos directamente o indirectamente mediante interacciones no covalentes. En realizaciones no covalentes, el acoplamiento no covalente es mediado por interacciones no covalentes que incluyen a modo no taxativo, interacciones de carga, interacciones de afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de agrupación TT, interacciones de unión de hidrógeno, interacciones van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electroestáticas, interacciones dipolo-dipolo y/o sus combinaciones. Tales acoplamientos pueden disponerse para encontrarse sobre una superficie externa o superficie interna de un nanovehículo sintético de la invención. En realizaciones, la encapsulación y/o absorción es una forma de acoplamiento.

Puede utilizarse una amplia variedad de nanovehículos sintéticos de conformidad con la invención. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos son esferas o esferoides. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos son planos o tienen forma de placa. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos son cubos o cúbicos. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos son ovals o elipses. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos son cilindros, conos o pirámides.

En algunas realizaciones, es deseable el uso de una población de nanovehículos sintéticos que sea relativamente uniforme en términos de tamaño, forma y/o composición de forma tal que cada nanovehículo sintético tenga propiedades similares. Por ejemplo, al menos un 80%, al menos un 90%, o al menos un 95% de los nanovehículos sintéticos, con base en el número total de nanovehículos sintéticos, puede tener una dimensión mínima o una dimensión máxima que se encuentra dentro del 5%, 10%, o 20% del diámetro promedio o dimensión promedio de los nanovehículos sintéticos. En algunas realizaciones, la población de nanovehículos sintéticos puede ser heterogénea con respecto al tamaño, forma y/o composición.

Los nanovehículos sintéticos pueden ser sólidos o huecos y pueden comprender una o más capas. En algunas realizaciones, cada capa tiene una composición única y propiedades únicas con relación a la(s) otra(s) capa(s). Para proporcionar más de un ejemplo, los nanovehículos sintéticos pueden tener una estructura de núcleo/caparazón, donde el núcleo es una capa (por ejemplo un núcleo polimérico) y el caparazón es la segunda capa (por ejemplo, una bicapa o monocapa lipídica). Los nanovehículos sintéticos pueden comprender una pluralidad de capas diferentes.

- En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos pueden comprender de forma opcional uno o más lípidos. En algunas realizaciones, el nanovehículo sintético puede comprender un liposoma. En algunas realizaciones, el nanovehículo sintético puede comprender una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, el nanovehículo sintético puede comprender una monocapa lipídica. En algunas realizaciones, el nanovehículo sintético puede comprender una micela. En algunas realizaciones, el nanovehículo sintético puede comprender un núcleo que comprende una matriz polimérica rodeada por una capa lipídica (por ejemplo, una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, etc.). En algunas realizaciones, el nanovehículo sintético puede comprender un núcleo no polimérico (por ejemplo, partícula metálica, punto cuántico, partícula cerámica, partícula ósea, partícula viral, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc.) rodeados por una capa lipídica (por ejemplo, una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, etc.).
- Los nanovehículos sintéticos en la primera y segunda población y opcionalmente en cada población adicional comprenden uno o más polímeros. En algunas realizaciones, dicho polímero puede estar rodeado por una capa de recubrimiento (por ejemplo, un liposoma, una monocapa lipídica, una micela, etc.). En algunas realizaciones, varios elementos de los nanovehículos sintéticos pueden acoplarse con el polímero.
- En algunas realizaciones, la superficie inmunoactiva, porciones diana, antígenos, adyuvantes y/o oligonucleótidos puede asociarse covalentemente con la matriz polimérica. En algunas realizaciones, la asociación covalente es mediada por un enlace. En algunas realizaciones, la superficie inmunoactiva, porciones diana, antígenos, adyuvantes y/u oligonucleótidos puede asociarse de forma no covalente con la matriz polimérica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la superficie inmunoactiva, porción diana, antígenos, adyuvantes y/o oligonucleótidos pueden encapsularse dentro, rodearse por y/o dispersarse a través de la matriz polimérica. De forma alternativa o adicional, la superficie inmunoactiva, porción diana, antígenos, adyuvantes y/o nucleótidos pueden asociarse con una matriz polimérica mediante interacciones hidrófobas, interacciones de cargas, fuerzas de van der Waals, etc.
- Convencionalmente, se conoce una amplia variedad de polímeros y métodos para formar matrices poliméricas a partir de estos. En general, la matriz polimérica comprende uno o más polímeros. Los polímeros pueden ser polímeros naturales o no naturales (sintéticos). Los polímeros pueden ser homopolímeros o copolímeros que comprenden dos o más monómeros. En términos de secuencia, los copolímeros pueden ser aleatorios, de bloqueo o comprender una combinación de secuencias aleatorias y de bloqueo. Típicamente, los polímeros de conformidad con la presente invención son polímeros orgánicos
- Los ejemplos de polímeros adecuados para su uso en la presente invención incluyen, a modo no taxativo, polietilenos, policarbonatos (por ejemplo, poli(1,3-dioxan-2ona)), polianhídridos (por ejemplo, anhídrido poli(sebácico)), polipropilfumaratos, poliamidas (por ejemplo, policaprolactama), poliacetales, poliéteres, poliésteres (por ejemplo, polilactida, poliglicolida, polilactida-co-glicolida, policaprolactona, polihidroxiácidos (por ejemplo, poli( $\beta$ -hidroxialcanoato))), poli(ortoésteres), policianoacrilatos, alcoholes de polivinilo, poliuretanos, polifosfazenos, poli(acrilatos), polimetacrilatos, poliureas, poliestirenos, poliaminas, polilisina, copolímeros de polilisina-PEG, poli(etilénimina), copolímeros de poli(etilén imina)-PEG y polifosfazinas.
- En algunas realizaciones, los polímeros de conformidad con la presente invención incluyen polímeros que fueron aprobados por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para su uso en humanos según el artículo 177.2600 del título 21 del Código de Reglamentos Federales, incluidos a modo no taxativo, poliésteres (por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poli(láctico-coglicólico), policaprolactona, polivalerolactona, poli(1,3-dioxan-2ona)); polianhídridos (por ejemplo, anhídrido poli(sebácico)); poliéteres (por ejemplo, polietilenglicol); poliuretanos; polimetacrilatos; poli(acrilatos); y policianoacrilatos.
- En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser hidrófilos. Por ejemplo, los polímeros pueden comprender grupos aniónicos (por ejemplo, grupo fosfato, grupo sulfato, grupo carboxilato); grupos catiónicos (por ejemplo, grupo de amina cuaternaria); o grupos polares (por ejemplo, grupo hidroxilo, grupo tiol, grupo amina). En algunas realizaciones, el nanovehículo sintético que comprende una matriz polimérica hidrófila genera un ambiente hidrófilo dentro del nanovehículo sintético. En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser hidrófobos. En algunas realizaciones, el nanovehículo sintético que comprende una matriz polimérica hidrófoba genera un ambiente hidrófobo dentro del nanovehículo sintético. La selección de hidrofiliidad o hidrofobicidad del polímero puede tener un impacto sobre la naturaleza de los materiales que se incorporan (por ejemplo, acoplados) dentro del nanovehículo sintético.
- En algunas realizaciones, los polímeros pueden modificarse con una o más porciones y/o grupos funcionales. Puede utilizarse una variedad de grupos funcionales de conformidad con la presente invención. En algunas realizaciones, los polímeros pueden modificarse con polietilenglicol (PEG), con un carbohidrato y/o con poliacetales acíclicos derivados de polisacáridos (Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301). Ciertas realizaciones pueden prepararse mediante el uso de las demostraciones generales de la patente de Estados Unidos No. 5543158 de Gref et al., o la publicación internacional WO2009/051837 de Von Andrian et al.
- En algunas realizaciones, los polímeros pueden modificarse con un grupo de lípidos o ácidos grasos. En algunas realizaciones, el grupo de ácidos grasos puede ser uno o más ácidos butíricos, caproicos, caprílicos, cápricos, láuricos, mirísticos, palmíticos, esteáricos, araquídicos, behénicos o lignocéricos. En algunas realizaciones, el grupo

de ácidos grasos puede ser uno o más de ácido palmitoleico, oleico, vaccénico, linoleico, alfa-linoleico, gammalinoleico, araquidónico, gadoleico, araquidónico, eicosapentanoico, docosahexaenoico o erúcido.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres, que incluyen copolímeros que comprenden unidades de ácido láctico y ácido glicólico, como ácido poli(láctico-ácido coglicólico) y poli(láctida-coglicolida), denominados colectivamente en la presente como "PLGA"; y homopolímeros que comprenden unidades de ácido glicólico, denominados en la presente como "PGA", y unidades de ácido láctico, como ácido poli-L-láctico, ácido poli-D-láctico, ácido poli-D,L-láctico, poli-L-láctida, poli-D-láctida y poli-D,L-láctida, denominados colectivamente en la presente como "PLA". En algunas realizaciones, los poliésteres ejemplares incluyen, por ejemplo, polihidroxiácidos; copolímeros de PEG y copolímeros de lactida y glicolida (por ejemplo, copolímeros PLA-PEG, copolímeros PGA-PEG, copolímeros PLGA-PEG y sus derivados. En algunas realizaciones, los poliésteres incluyen, por ejemplo, poli(caprolactona), copolímeros de poli(caprolactona)-PEG, poli(L-láctida-co-L-lisina), poli(serina éster), poli(4-hidroxi-L-prolina éster), ácido poli[ $\alpha$ -(4-aminobutil)-L-glicólico] y sus derivados.

En algunas realizaciones, el polímero puede ser PLGA. El PLGA es un copolímero biocompatible y biodegradable de ácido láctico y ácido glicólico y varias formas de PLGA se caracterizan por la proporción de ácido láctico:ácido glicólico. El ácido láctico puede ser ácido L-láctico, ácido D-láctico o ácido D,L-láctico. La velocidad de degradación de PLGA puede ajustarse mediante la alteración de la proporción de ácido láctico:ácido glicólico. En algunas realizaciones, el PLGA para utilizarse de conformidad con la presente invención se caracteriza por una proporción de ácido láctico:ácido glicólico de aproximadamente 85:15, aproximadamente 75:25, aproximadamente 60:40, aproximadamente 50:50, aproximadamente 40:60, aproximadamente 25:75 o aproximadamente 15:85.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser uno o más polímeros acrílicos. En ciertas realizaciones, los polímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metil metacrilato, etoxietil metacrilatos, cianoetil metacrilato, copolímero de aminoalquil metacrilato, ácido poli(acrílico), ácido poli(metacrílico), copolímero de alquilamida de ácido metacrílico, poli(metil metacrilato), anhídrido de ácido poli(metacrílico), metil metacrilato, polimetacrilato, copolímero de poli(metil metacrilato), poli(acrilamida), copolímero de aminoalquil metacrilato, copolímeros de glicidil metacrilato, policianoacrilatos y combinaciones que comprenden uno o más de los polímeros que anteceden. El polímero acrílico puede comprender copolímeros completamente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos de amonio cuaternario.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros catiónicos. En general, los polímeros catiónicos son capaces de condensar y/o proteger las cadenas de ácidos nucleicos cargadas negativamente (por ejemplo, ADN o sus derivados). Los polímeros que contienen aminas como la poli(lisina) (Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; and Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7), poli(etilen imina) (PEI; Bousif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297) y dendrímeros de poli(amidoamina) (Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; y Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372) presentan carga positiva a un pH fisiológico, forman pares de iones con ácidos nucleicos y median la transfección en una variedad de líneas celulares. En realizaciones, los nanovehículos sintéticos de la invención pueden no comprender (o pueden excluir) polímeros catiónicos.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser poliésteres degradables que presentan cadenas laterales catiónicas (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; y Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399). Los ejemplos de estos poliésteres incluyen poli(L-láctida-co-L-lisina) (Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010), éster de poli(serina) (Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399), éster de poli(4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; y Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633), y éster de poli(4-hidroxi-L-prolina) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; y Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633).

Las propiedades de estos y otros polímeros y los métodos para prepararlos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 6,123,727; 5,804,178; 5,770,417; 5,736,372; 5,716,404; 6,095,148; 5,837,752; 5,902,599; 5,696,175; 5,514,378; 5,512,600; 5,399,665; 5,019,379; 5,010,167; 4,806,621; 4,638,045; and 4,946,929; Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; y Urich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181). Más generalmente, una variedad de métodos para sintetizar ciertos polímeros adecuados se describe en *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts*, Ed. por Goethals, Pergamon Press, 1980; *Principles of Polymerization* por Odian, John Wiley & Sons, cuarta edición, 2004; *Contemporary Polymer Chemistry* por Allcock et al., Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386; y en las patentes de los Estados Unidos 6,506,577, 6,632,922, 6,686,446 y 6,818,732.

En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser polímeros lineales o ramificados. En algunas realizaciones, los polímeros pueden ser dendrímeros. En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente entrecruzados entre sí. En algunas realizaciones, los polímeros pueden estar sustancialmente libres de enlaces cruzados. En algunas realizaciones, los polímeros pueden utilizarse de conformidad con la presente invención sin pasar por una etapa de entrecruzamiento. Además debe entenderse que los nanovehículos sintéticos de la invención pueden comprender copolímeros de bloqueo, copolímeros de injertos, mezclas y/o aductos de cualquiera

de los polímeros que anteceden u otros polímeros. Los entendidos en la técnica reconocerán que los polímeros listados en la presente representan una lista ejemplar, no exhaustiva, de los polímeros que pueden utilizarse de conformidad con la presente invención.

5 En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos comprenden uno o más polímeros. Por consiguiente, los nanovehículos sintéticos poliméricos, pueden incluir además los descritos en la publicación WO2009/051837 de Von Andrian et al., incluidos, a modo no taxativo, los que tienen uno o más componentes hidrófilos. Preferentemente, el uno o más polímeros comprende un poliéster como un ácido poli(láctico), un ácido poli(glicólico), un ácido poli(láctico coglicólico) o una policaprolactona. Más preferentemente, el uno o más polímeros comprenden o comprenden además un poliéster acoplado a un polímero hidrófilo, como un poliéter. En realizaciones, el poliéter comprende polietilenglicol. Aún más preferentemente, el uno o más polímeros comprenden un poliéster y un poliéster acoplado a un polímero hidrófilo, como un poliéter. En otras realizaciones, el uno o más polímeros se encuentran acoplados a uno o más antígenos y/o a uno o más adyuvantes. En realizaciones, al menos algunos de los polímeros se encuentran acoplados a los antígenos y/o a uno o más adyuvantes. En realizaciones, al menos algunos de los polímeros se encuentran acoplados a los antígenos. Preferentemente, cuando existe más de un tipo de polímero, uno de los tipos de polímero se acopla a los antígenos. En realizaciones, uno de los otros tipos de polímero se acopla a los adyuvantes. Por ejemplo, en realizaciones, cuando los nanovehículos comprenden un poliéster y un poliéster acoplado a un polímero hidrófilo, como el poliéter, el poliéster se acopla al adyuvante, mientras que el poliéster acoplado al polímero hidrófilo, como un poliéter, se acopla a los antígenos. En realizaciones, cuando los nanovehículos comprenden un antígeno de linfocitos T universales, como el antígeno de linfocitos T colaboradores, el antígeno de linfocitos T universales puede encapsularse en el nanovehículo.

En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos no comprenden un componente polimérico. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos pueden comprender partículas metálicas, puntos cuánticos, partículas cerámicas, etc. En algunas realizaciones, el nanovehículo sintético no polimérico es un agregado de componentes no poliméricos, como un agregado de átomos metálicos (por ejemplo, átomos de oro).

25 En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos pueden comprender de forma opcional una o más entidades anfífilas. En algunas realizaciones, la entidad anfífila puede promover la producción de nanovehículos sintéticos con una estabilidad superior, una uniformidad superior o una viscosidad superior. En algunas realizaciones, las entidades anfífilas pueden asociarse a la superficie interior de una membrana lipídica (por ejemplo, una bicapa lipídica, una monocapa lipídica, etc.). Muchas entidades anfífilas conocidas en la técnica son adecuadas para su uso en la preparación de nanovehículos sintéticos de conformidad con la presente invención. Dichas entidades anfífilas incluyen, a modo no taxativo fosfoglicéridos; fosfatidilcolinas; dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC); dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE); dioleiloxipropiltriethylamonio (DOTMA); dioleoilfosfatidilcolina; colesterol; éster de colesterol; diacilglicerol; diacilglicerolsuccinato; difosfatidil glicerol (DPPG); hexanodecanol; alcoholes grasos como polietilenglicol (PEG); polioxietileno-9-lauril éter; un ácido graso tensioactivo, como ácido palmítico o ácido oleico; ácidos grasos; monoglicéridos de ácidos grasos; diglicéridos de ácidos grasos; amidas de ácidos grasos; trioleato de sorbitán (Span®85) glicocolato; monolaurato de sorbitán (Span®20); polisorbato 20 (Tween®20); polisorbato 60 (Tween®60); polisorbato 65 (Tween®65); polisorbato 80 (Tween®80); polisorbato 85 (Tween®85); polioxietileno monoestearato; surfactina; un poloxómero; un éster de ácido graso de sorbitán como un trioleato de sorbitán; lecitina; lisolectina; fosfatidilserina; fosfatidilinositol; esfingomiolina; fosfatidiletanolamina (cefalina); cardiolipina; ácido fosfatídico; cerebrosidas; dicetilfosfato; dipalmitoilfosfatidilglicerol; estearilamina; dodecilamina; hexadecil-amina; acetil palmitato; glicerol ricinoleato; hexadecil estearato; isopropil miristato; tiloxapol; poli(etilenglicol)5000-fosfatidiletanolamina; poli(etilenglicol)400-monoestearato; fosfolípidos; detergentes sintéticos y/o naturales que tienen propiedades de tensioactivos elevados; deoxicolatos; ciclodextrinas; sales caotrópicas; agentes de formación de pares de iones; y sus combinaciones. Un componente de la entidad anfífila puede ser una mezcla de diferentes entidades anfífilas. Los entendidos en la técnica reconocerán que esta es una lista ejemplar, no exhaustiva de sustancias con actividad tensioactiva. Puede utilizarse cualquier entidad anfífila en la producción de nanovehículos sintéticos para utilizarse de conformidad con la presente invención.

50 En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos pueden comprender de forma opcional uno o más carbohidratos. Los carbohidratos pueden ser naturales o sintéticos. Un carbohidrato puede ser un carbohidrato natural derivatizado. En ciertas realizaciones, el carbohidrato comprende monosacáridos o disacáridos, que incluyen, a modo no taxativo, glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, lactosa, sucrosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, manosa, xilosa, arabinosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galatosamina y ácido neurámico. En ciertas realizaciones, el carbohidrato es un polisacárido, que incluye, a modo no taxativo, pululano, celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), hidroxixelulosa (HC), metilcelulosa (MC), dextrano, ciclodextrano, glicógeno, hidroxietilalmidón, carragenano, glicón, amilosa, quitosano, N,O-carboximetilquitosano, ácido de algina y alginico, almidón, quitina, inulina, konjac, glucomanano, pustulan, heparina, ácido hialurónico, curdlano y xantano. En realizaciones, los nanovehículos sintéticos no comprenden (o excluyen específicamente) carbohidratos, como un polisacárido. En ciertas realizaciones, el carbohidrato puede comprender un derivado de carbohidratos como el alcohol de azúcar, incluido a modo no taxativo, manitol, sorbitol, xilitol, eritritol, maltitol y lactitol.



Las composiciones de conformidad con la invención comprenden los nanovehículos sintéticos de la invención en combinación con excipientes farmacéuticamente aceptables, como los conservantes, soluciones amortiguadoras, soluciones salinas o solución salina tamponada con fosfato. Las composiciones pueden prepararse mediante el uso de técnicas de fabricación y composición farmacéuticas convencionales para lograr formas de dosificación útiles. En una realización, los nanovehículos sintéticos de la invención se suspenden en solución salina estéril para la inyección junto con un conservante.

En algunas realizaciones, al preparar los nanovehículos sintéticos como vehículos para los antígenos y/o adyuvantes para su uso en vacunas, pueden ser útiles los métodos para acoplar los antígenos y/o adyuvantes a los nanovehículos sintéticos. Si el antígeno y/o adyuvante es una molécula pequeña puede ser ventajoso unir el antígeno y/o adyuvante a un polímero antes de la construcción de los nanovehículos sintéticos. En realizaciones, también puede ser ventajoso preparar los nanovehículos sintéticos con grupos superficiales que se utilizan para acoplar el antígeno y/o adyuvante al nanovehículo a través del uso de estos grupos superficiales en lugar de unir el antígeno y/o adyuvante a un polímero y después utilizar este conjugado polimérico en la construcción de los nanovehículos sintéticos.

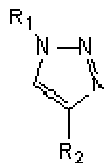
Los antígenos de superficie pueden acoplarse a los nanovehículos sintéticos mediante una variedad de métodos. En realizaciones, el antígeno de superficie se acopla a una superficie externa del nanovehículo sintético covalentemente o no covalentemente.

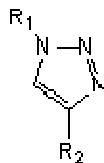
En ciertas realizaciones, el acoplamiento puede realizarse mediante un enlace covalente. En realizaciones, los antígenos de superficie y/o adyuvantes de conformidad con la invención pueden acoplarse covalentemente a la superficie externa mediante un enlace de 1,2,3-triazol formado por la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de los grupos azido sobre la superficie del nanovehículo con antígenos de superficie y/o adyuvantes que contienen un grupo alquino o mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de alquinos sobre la superficie del nanovehículo con antígenos de superficie y/o adyuvantes que contienen un grupo azido. Dichas reacciones de cicloadición se llevan a cabo preferentemente en la presencia de un catalizador de Cu(I) junto con un ligando de Cu(I) adecuado y un agente reductor para reducir el compuesto Cu(II) al compuesto Cu(I) catalítico activo. Esta cicloadición de azido-alquino catalizada por Cu(I) (CuAAC) también puede denominarse reacción "click".

Además, el acoplamiento covalente puede comprender un enlace covalente que comprende un enlace de amida, un enlace de disulfuro, un enlace de tioéter, un enlace de hidrazona, un enlace de hidrazida, un enlace de imina u oxima, un enlace de urea o tiourea, un enlace de amidina, un enlace de amina y un enlace de sulfonamida.

El enlace de amina se forma mediante un enlace de amida entre una amida sobre un componente como el péptido con el grupo de ácido carboxílico de un segundo componente como el nanovehículo. El enlace amida en el enlace puede realizarse mediante el uso de cualquiera de las reacciones que forman enlaces amida convencionales con aminoácidos o péptidos protegidos de forma adecuada y ácido carboxílico activado como éster activado por N-hidroxisuccinimida.

El enlace de disulfuro se prepara mediante la formación de un enlace de disulfuro (S-S) entre dos átomos de azufre de la forma, por ejemplo, R<sub>1</sub>-S-S-R<sub>2</sub>. El enlace de disulfuro puede formarse mediante el intercambio de tiol de antígenos de superficie y/o adyuvantes que contienen un grupo tiol/mercaptano (-SH) con otro grupo tiol activado sobre un polímero o nanovehículo o un nanovehículo que contiene grupos tiol/mercaptano con un antígeno y/o adyuvante que contiene un grupo tiol activado.



El enlace de triazol, específicamente un 1,2,3-triazol de la forma , donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> puede ser cualquier entidad química, se forma mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de una azida unida a un primer componente como el nanovehículo con un alquino terminal unido a un segundo componente como un antígeno y/o adyuvante. La reacción de cicloadición 1,3-dipolar se lleva a cabo con o sin un catalizador, preferentemente con un catalizador Cu(I), que une los dos componentes a través de una función 1,2,3-triazol. Esta química se describe en detalle por Sharpless et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41(14), 2596, (2002) y Meldal, et al, *Chem. Rev.*, 2008, 108(8), 2952-3015 y a menudo se denomina como la reacción "click" o CuAAC.

En realizaciones, se prepara un polímero que contiene un grupo azida o alquino, terminal a la cadena de polímeros. Este polímero a continuación se utiliza para preparar un nanovehículo de forma tal que una pluralidad de grupos alquino o azida se posiciona sobre la superficie de dicho nanovehículo. De forma alternativa, el nanovehículo sintético puede prepararse mediante otra ruta y subsiguientemente funcionalizarse con grupos alquino o azida. El antígeno y/o adyuvante se prepara con la presencia de un grupo alquino (si el polímero contiene una azida) o un grupo azida (si el polímero contiene un alquino). El antígeno y/o adyuvante a continuación se deja reaccionar con el nanovehículo a través de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar con o sin un catalizador que acopla covalentemente el antígeno y/o adyuvante con la partícula a través de un enlace de 1,2,3-triazol 1,4-disustituido.

- El enlace de tioéter se prepara mediante la formación de un enlace de azufre-carbono (tioéter) en la forma, por ejemplo, de  $R_1-S-R_2$ . El tioéter puede prepararse mediante alquilación de un grupo tiol/mercaptano (-SH) en un componente como el antígeno y/o adyuvante con un grupo de alquilación como haluro o epóxido en un segundo componente como el nanovehículo. Los enlaces de tioéter también pueden formarse mediante la adición de Michael de un grupo tiol/mercaptano sobre un componente como un antígeno y/o adyuvante a un grupo alquino con deficiencia de electrones, sobre un segundo componente como un polímero que contiene un grupo maleimida o un grupo de vinil sulfona como el aceptor de Michael. En otra forma, los enlaces de tioéter pueden prepararse mediante la reacción del tioleno radical de un grupo tiol/mercaptano sobre un componente como un antígeno y/o adyuvante con un grupo alqueno sobre un segundo componente como un polímero o nanovehículo.
- El enlace de hidrazona se prepara mediante la reacción de un grupo hidrazida sobre un componente como un antígeno y/o adyuvante con un grupo aldehído/cetona sobre el segundo componente como el nanovehículo.
- El enlace de hidrazida se forma mediante la reacción de un grupo hidrazida sobre un componente como el antígeno y/o adyuvante con un grupo de ácido carboxílico sobre el segundo componente como el nanovehículo. Dicha reacción generalmente se lleva a cabo mediante el uso de química similar a la formación de un enlace amida donde el ácido carboxílico se activa con un reactivo de activación.
- El enlace de imina u oxima se forma mediante la reacción de un grupo amina o N-alcoxiamina (o aminooxi) sobre un componente como el antígeno y/o adyuvante con un grupo aldehído o cetona sobre el segundo componente como el nanovehículo.
- El enlace de urea o tiourea se prepara mediante la reacción de un grupo amina sobre un componente como el antígeno y/o adyuvante con un grupo de isocianato o tiisocianato sobre el segundo componente como el nanovehículo.
- El enlace de amidina se prepara mediante la reacción de un grupo amina sobre un componente como el antígeno y/o adyuvante con un grupo imidoéster sobre el segundo componente como el nanovehículo.
- El enlace de amina puede prepararse mediante la reacción de alquilación de un grupo amina sobre un componente como un antígeno y/o adyuvante con un grupo de alquilación como un grupo haluro, epóxido o éster de sulfonato sobre un segundo componente como el nanovehículo. De forma alternativa, el enlace de amina también puede prepararse mediante afinación reductiva de un grupo amina sobre un componente como el antígeno y/o adyuvante con un grupo aldehído o cetona sobre el segundo componente como el nanovehículo con un agente de reducción adecuado como el cianoborohidruro de sodio o el triacetoxiborohidruro de sodio.
- El enlace de sulfonamina se prepara mediante la reacción de un grupo amina sobre un componente como el antígeno y/o adyuvante con un grupo de haluro de sulfonilo (como cloruro de sulfonilo o fluoruro de sulfonilo) sobre el segundo componente como el nanovehículo. El enlace de sulfona se prepara mediante la adición de Michael de un nucleófilo a una vinil sulfona. Tanto la vinil sulfona como el nucleófilo pueden encontrarse sobre la superficie de la nanopartícula o unidos al antígeno o adyuvante.
- El antígeno o adyuvante también puede conjugarse al nanovehículo mediante métodos de conjugación no covalente. Por ejemplo, un antígeno o adyuvante cargado negativamente puede conjugarse en un nanovehículo cargado positivamente a través de adsorción electrostática. El antígeno o adyuvante que contenga un ligando metálico también puede conjugarse en un nanovehículo que contiene un complejo metálico mediante un complejo metal-ligando.
- En realizaciones, el antígeno o adyuvante puede unirse a un polímero, por ejemplo, ácido poliláctico-bloque-poliétilenglicol, antes de la configuración del nanovehículo sintético o el nanovehículo sintético puede formarse con grupos reactivos o activables en su superficie. En el último caso, el antígeno o el adyuvante puede prepararse con un grupo que es compatible con la química de unión que presenta la superficie de los nanovehículos sintéticos. En otras realizaciones, el antígeno peptídico puede unirse a VLP o liposomas mediante el uso de un enlace adecuado.
- El enlace es un compuesto o reactivo que es capaz de juntar dos moléculas. En una realización, el enlace puede ser un reactivo homobifuncional u heterobifuncional como se describe en Hermanson 2008. Por ejemplo, el nanovehículo sintético de VLP o liposoma que contiene un grupo carboxílico en su superficie puede tratarse con un enlace homobifuncional, una dihidrazida adípica (ADH), en la presencia de EDC para formar el nanovehículo sintético correspondiente con el enlace de ADH. El ADH resultante unido al nanovehículo sintético a continuación se conjuga con un antígeno y/o adyuvante peptídico que contiene un grupo ácido a través del otro extremo del enlace de ADH sobre NC para producir el conjugado peptídico de partículas similares a virus (VLP) o liposoma.
- Para descripciones detalladas de métodos de conjugación disponibles, véase Hermanson G T "Bioconjugate Techniques", 2nd Edition, Published by Academic Press, Inc., 2008. Además del enlace covalente, el antígeno y/o adyuvante puede acoplarse mediante adsorción a un nanovehículo sintético preformado o puede/n acoplarse mediante encapsulación durante la formación del nanovehículo sintético.

En realizaciones, los antígenos de superficie pueden acoplarse de forma no covalente a los nanovehículos sintéticos mediante el uso de varias interacciones no covalentes que incluyen a modo no taxativo, interacciones de carga,

interacciones de afinidad, coordinación de metales, adsorción física, interacciones hospedador-huésped, interacciones hidrófobas, interacciones de agrupación TT, interacciones de unión de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electroestáticas, interacciones dipolo-dipolo y/o sus combinaciones. En realizaciones, la encapsulación es una forma de acoplamiento. Al acoplar antígenos de superficie cargados, los nanovehículos sintéticos pueden producirse en la presencia de tensioactivos que se adsorben a las superficies del nanovehículo sintético y al hacerlo imparten una carga al nanovehículo sintético. Los antígenos de superficie cargados pueden entonces unirse mediante enlace no covalente al nanovehículo sintético cargado mediante una interacción carga-carga (véase, por ejemplo, O'Hagen WO2000006123A1).

En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos de la invención pueden combinarse con uno o más adyuvantes mediante la mezcla en el mismo vehículo o sistema de administración. Tales adyuvantes pueden incluir, pero no se limitan a los adyuvantes proporcionados en la presente, tales como sales minerales, como alumbre, alumbre combinado con monofosforil lípido (MPL) A de *Enterobacteria*, como *Escherichia coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, o *Shigella flexneri* o específicamente con MPL® (AS04), MPL A de las bacterias mencionadas anteriormente separadamente, saponinas, como QS-21, Quil-A, ISCOM, ISCOMATRIX™, emulsiones como MF59™, Montanide® ISA 51 e ISA 720, AS02 (QS21+escualeno+ MPL®), liposomas y formulaciones liposomales como AS01, AS15, micropartículas y microvehículos sintetizados o preparados específicamente como vesículas fuera de la membrana derivadas de bacterias (OMV) de *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y otros, o partículas de quitosano, agentes formadores de depósitos, como copolímeros bloqueadores Pluronic®, péptidos modificados o preparados específicamente, como muramil dipéptido, aminoalquil glucosaminida 4-fosfato, como RC529, o proteínas como toxoides bacterianos o fragmentos de toxina. Las dosis de tales otros adyuvantes pueden determinarse mediante el uso de estudios de graduación de dosis convencionales.

En realizaciones, los nanovehículos sintéticos de la invención pueden combinarse con otros antígenos diferentes, similares o idénticos a los acoplados a un nanovehículo (con o sin adyuvante, mediante el uso o no de otro vehículo de administración) administrado separadamente en un intervalo de tiempo diferente y/o en una ubicación del cuerpo diferente y/o mediante una vía de inmunización diferente o con otro antígeno y/o nanovehículo sintético que tiene un adyuvante administrado separadamente en un intervalo de tiempo diferente y/o en una ubicación del cuerpo diferente y/o mediante una vía de inmunización diferente.

Las poblaciones de nanovehículos sintéticos pueden combinarse para formar formas de dosificación de conformidad con la presente invención mediante el uso de métodos de mezclado farmacéuticos tradicionales. Estos incluyen mezcla líquida-líquida donde dos o más suspensiones, cada una de las cuales contiene uno o más subconjuntos de nanovehículos, se combinan directamente o se juntan mediante uno o más recipientes que contienen el diluyente. Como los nanovehículos sintéticos también pueden producirse o almacenarse en forma de polvo, la mezcla en seco polvo-polvo puede llevarse a cabo como lo puede la resuspensión de dos o más polvos en un medio común. En función de las propiedades de los nanovehículos y sus potenciales de interacción, puede haber ventajas conferidas a una u otra ruta de mezclado.

Las composiciones típicas de la invención que comprenden nanovehículos sintéticos pueden comprender soluciones amortiguadoras inorgánicas u orgánicas (por ejemplo, sales de sodio o potasio de fosfato, carbonato, acetato, o citrato) y agentes de ajuste de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o potasio, sales de citrato o acetato, aminoácidos y sus sales) antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, alfa-tocoferol), tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, polioxietileno 9-10 nonil fenol, desoxicolato de sodio), estabilizadores de solución y/o criolío estabilizadores (por ejemplo, sucrosa, lactosa, manitol, trehalosa), agentes de ajuste osmótico (por ejemplo, sales o azúcares), agentes antibacterianos (por ejemplo, ácido benzoico, fenol, gentamicina), agentes antiespumantes (por ejemplo, polidimetilsiloxano), conservantes (por ejemplo, timerosal, 2-fenoxietanol, EDTA), estabilizadores poliméricos y agentes de ajuste de la viscosidad (por ejemplo, polivinilpirrolidona, poloxámero 488, carboximetilcelulosa) y cosolventes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol, etanol).

Las composiciones de conformidad con la invención comprenden nanovehículos sintéticos de la invención en combinación con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones pueden prepararse mediante el uso de técnicas de fabricación y composición farmacéuticas convencionales para lograr formas de dosificación útiles. Las técnicas adecuadas para su uso en la práctica de la presente invención pueden encontrarse en Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice, editado por Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng y Suzanne M. Kresta, 2004 John Wiley & Sons, Inc.; y Pharmaceuticals: The Science of Dosage Form Design, segunda edición editada por M. E. Auten, 2001, Churchill Livingstone. En una realización, los nanovehículos sintéticos de la invención se suspenden en solución salina estéril para la inyección junto con un conservante.

Las dosis de las formas de dosificación contienen cantidades variantes de poblaciones de nanovehículos sintéticos de conformidad con la invención. La cantidad de nanovehículos sintéticos presentes en las formas de dosificación de la invención pueden ser variadas de conformidad con la naturaleza de los conjuntos de antígenos de superficie, el beneficio terapéutico que se quiere alcanzar y otros parámetros. En algunas realizaciones, los estudios de graduación de dosis pueden llevarse a cabo para establecer una cantidad terapéutica óptima de nanovehículos sintéticos presentes en la forma de dosificación. En algunas realizaciones, la primera y segunda población se encuentra presente en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmune al primer conjunto de antígenos de superficie y al segundo conjunto de antígenos de superficie tras la administración a un individuo. Puede ser posible

determinar cantidades de la primera, segunda y/o poblaciones subsiguientes eficaces para generar una respuesta inmune mediante el uso de estudios y técnicas de graduación de dosis convencionales en sujetos. Las formas de dosificación de la invención pueden administrarse en una variedad de frecuencias. En una realización preferida, al menos una administración de la forma de dosificación es suficiente para generar una respuesta farmacológicamente relevante. En una realización más preferida, al menos dos administraciones, al menos tres administraciones o al menos cuatro administraciones de la forma de dosificación se utilizan para asegurar una respuesta farmacológicamente relevante.

Debe entenderse que las composiciones de la invención pueden prepararse en cualquier forma adecuada y la invención no se limita en ninguna forma a las composiciones que pueden producirse mediante el uso de los métodos descritos en la presente. La selección de un método adecuado puede requerir la atención a las propiedades de las porciones particulares que se están asociando. En realizaciones, los métodos de fabricación comprenden preparar una primera población de nanovehículos sintéticos que comprende un primer conjunto de antígenos de superficie; preparar una segunda población de nanovehículos sintéticos que comprende un segundo conjunto de antígenos de superficie; y combinar la primera y segunda población de nanovehículos sintéticos en una forma de dosificación farmacéutica, donde el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie son estructuralmente o inmunológicamente diferentes.

En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos de la invención se fabrican en condiciones estériles o se esterilizan en fase terminal. Esto puede asegurar que la composición resultante sea estéril y no infecciosa, lo que mejora la seguridad cuando se compara con composiciones no estériles. Esto proporciona una medida de seguridad valiosa, especialmente cuando los sujetos reciben nanovehículos sintéticos que presentan defectos inmunes, presentan una infección y/o son susceptibles de presentar una infección. En algunas realizaciones, los nanovehículos sintéticos de la invención pueden liofilizarse y almacenarse en suspensión o como un polvo liofilizado en función de la estrategia de formulación para períodos extendidos de tiempo sin perder actividad.

Las composiciones de la invención pueden administrarse mediante una variedad de vías de administración, que incluyen a modo no taxativo, la administración parenteral (como subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradermal); oral; transnasal, intranasal, transmucosal, sublingual, rectal, oftálmica, transdermal, transcutánea o mediante una combinación de estas vías.

Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden utilizarse para inducir, mejorar, modular, estimular, suprimir, dirigir o redirigir una respuesta inmune. Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden utilizarse en el diagnóstico o profilaxis y/o tratamiento de afecciones como el cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, enfermedades degenerativas, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunológicas u otros trastornos y/o afecciones. Las composiciones y métodos descritos en la presente también pueden utilizarse para la profilaxis o tratamiento de una adicción, como una adicción a la nicotina o a un narcótico. Las composiciones y métodos descritos en la presente también pueden utilizarse para la profilaxis y/o tratamiento de una afección que resulta de la exposición a una toxina, a una sustancia nociva, a una toxina medioambiental u otro agente nocivo.

Los sujetos proporcionados en la presente pueden presentar o encontrarse en riesgo de presentar una adicción a una sustancia de abuso o adictiva.

Los sujetos proporcionados en la presente pueden estar en riesgo de padecer cáncer. Los cánceres incluyen, a modo no taxativo, cáncer de mama; cáncer del tracto biliar; cáncer de vejiga; cáncer cerebral incluidos los glioblastomas y meduloblastomas; cáncer cervical; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer de endometrio; cáncer esofágico; cáncer gástrico; neoplasmas hematológicos que incluyen leucemia linfocítica y mielógena aguda, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica de células B; leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos T; leucemia de células pilosas; leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple; leucemias asociadas con el SIDA y leucemia/linfoma de linfocitos T adultas; neoplasmas intraepiteliales que incluyen enfermedad de Bowen y enfermedad de Paget; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; linfomas que incluyen enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cáncer oral que incluye carcinoma de células escamosas; cáncer de ovarios que incluye los que surgen de las células epiteliales, células estromales, células germinativas y células mesenquimales; cáncer pancreático; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas que incluyen leiomioma, rhabdomioma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel que incluye melanoma, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células basales y cáncer de células escamosas; cáncer testicular que incluye tumores germinales como seminoma, no seminoma (teratomas, coriocarcinomas), tumores estromales y tumores de células germinativas; cáncer de tiroides que incluye adenocarcinoma de tiroides y carcinoma medular; y cáncer renal que incluye adenocarcinoma y tumor de Wilms.

Los sujetos proporcionados en la presente pueden estar en riesgo de padecer una infección o enfermedad infecciosa. Las infecciones o enfermedades infecciosas incluyen, a modo no taxativo, enfermedades infecciosas virales, como SIDA, varicela, resfriado común, infección por citomegalovirus, fiebre por garrapatas de Colorado, fiebre por dengue, fiebre hemorrágica por el virus de Ébola, fiebre aftosa, hepatitis, herpes simple, herpes zóster, virus del papiloma humano (HPV), influenza (gripe), fiebre de Lassa, sarampión, fiebre hemorrágica de Marburgo, mononucleosis infecciosa, paperas, norovirus, poliomielitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva, rabia, rubeola,

síndrome respiratorio agudo severo (SARS), viruela, encefalitis viral, gastroenteritis viral, meningitis viral, neumonía viral, enfermedad del Nilo occidental y fiebre amarilla; enfermedades infecciosas bacterianas, como ántrax, meningitis bacteriana, botulismo, brucelosis, campilobacteriosis, enfermedad por arañazo de gato, cólera, difteria, tífus epidémico, gonorrea, impétigo, legionelosis, lepra (enfermedad de Hansen), leptoespirosis, listeriosis, enfermedad de Lyme, melioidosis, fiebre reumática, infección por *Safilococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), nocardiosis, Pertussis (tos farina), plaga, neumonía neumocócica, psitacosis, fiebre Q, fiebre maculosa de las montañas rocosas (RMSF), salmonelosis, fiebre escarlata, shigelosis, sífilis, tétano, tracoma, tuberculosis, tularemia, fiebre tifoidea, tífus e infecciones del tracto urinario; enfermedades infecciosas parasitarias, tales como tripanosomiasis africana, amebiasis, Ascariasis, babesiasis, enfermedad de Chagas, clonorchiasis, criptosporidiosis, cisticercosis, difilobotriasis, dracunculiasis, equinococosis, enterobiasis, fascioliasis, fasciolopsiasis, filariasis, infección por amebas de vida libre, giardiasis, gnatostomiasis, himenolepiasis, isoesporiasis, Kala-azar, leishmaniasis, malaria, metagonimiasis, miasis, oncocerciasis, pediculosis, infección por oxiuros, sarna, esquistosomiasis, teniasis, toxocariasis, toxoplasmosis, triquinelosis, triquinosis, trichuriasis, tricomoniasis y tripanosomiasis; enfermedad infecciosa fúngica, como aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, coccidioidomicosis, Criptococosis, histoplasmosis, tinea pedis (pie de atleta) y tinea cruris; enfermedades infecciosas por priones, como enfermedad de Alper, insomnio fatal familiar, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y la variante Kuru.

### Ejemplos

La invención se entenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente a los efectos de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención y no como limitaciones.

Los entendidos en la técnica apreciarán que las varias adaptaciones y modificaciones de las realizaciones descritas pueden realizarse sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Otras técnicas y métodos adecuados conocidos en la técnica pueden aplicarse en numerosas modalidades específicas por el entendido en la técnica a la luz de la descripción de la presente invención descrita en la presente.

Por consiguiente, debe entenderse que la invención puede realizarse de otra forma diferente a la descrita específicamente en la presente. La descripción que antecede pretende ser ilustrativa y no restrictiva. Muchas otras realizaciones resultarán evidentes para los entendidos en la técnica tras la revisión de la descripción que antecede. Por consiguiente, el alcance de la invención debe determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

#### 30 **Ejemplo 1: Formulación de la primera población de nanovehículos (Predicción)**

Los nanovehículos sintéticos que comprenden el conjugado de PLGA-R848 (adyuvante), el conjugado de PLA-PEG-N3 (enlace para el antígeno peptídico) y el péptido de ovoalbúmina (antígeno de linfocitos T) se preparan mediante un método de emulsión doble donde el péptido de ovoalbúmina (OVA) se encapsula en los nanovehículos sintéticos. A una suspensión de nanovehículos sintéticos (10 mg/mL en PBS (solución amortiguadora pH 7,4), 5 mL, que contenía aproximadamente 12,5 mg (peso molecular: 20, 000; 0,000625 mmol) de PLA-PEG-N3) se le agregó un péptido L1 del HPV que comprendía un enlace de acetileno (33 mg) con agitación suave. Se agregó una solución de ascorbato de sodio (100 mM en H<sub>2</sub>O, 0,3 mL), seguida de una solución de CuSO<sub>4</sub> (10 mM en agua, 0,6 mL). La suspensión color amarillo claro resultante se agitó a 20 °C durante 15 horas y se agregó una solución adicional de CuSO<sub>4</sub> (0,3 mL) y una solución de ascorbato de sodio (0,15mL). La suspensión se agitó durante 5 horas a 20 °C y se diluyó con una solución amortiguadora de PBS (pH 7,4) a 10 mL y se centrifugó para extraer el sobrenadante. Los gránulos de nanovehículo residuales se lavaron dos veces con solución amortiguadora de PBS. A continuación los nanovehículos (NC) lavados se volvieron a suspender en 5 mL de solución amortiguadora de PBS y se almacenaron bajo congelación. La conjugación del péptido L1 en la superficie de los nanovehículos sintéticos se confirmó mediante análisis de HPLC de los nanovehículos sintéticos digeridos y mediante bioensayo.

#### 45 **Ejemplo 2: Formulación de la segunda población de nanovehículos (Predicción)**

Mediante el uso de las explicaciones de los procedimientos generales en el ejemplo 1, los nanovehículos sintéticos que comprendían PLA-R848, PLA-PEG-N3 y el péptido de ovoalbúmina encapsulado se prepararon y conjugaron con un péptido L2 del virus del papiloma humano (HPV) para proporcionar los nanovehículos sintéticos conjugados por el péptido L2.

#### 50 **Ejemplo 3: Formulación mediante la combinación de la primera y segunda población de nanovehículos (Predicción)**

Las preparaciones de nanovehículos sintéticos de los ejemplos 1 y 2 que anteceden se descongelaron y se diluyeron en PBS hasta una concentración final de 5 mg de nanovehículos por milímetro. Se combinaron alícuotas iguales de cada uno (0,5 mL) para proporcionar una población de nanovehículos que contenía los péptidos L1 y L2 del HPV.

#### **Ejemplo 4: Preparaciones de nanovehículos**

**Preparación de NC-Nic-OVA**

El PLGA-R848, poli-D/L-lactida-coglicolida, 4-amino-2-(etoximetil)- $\alpha,\alpha$ -dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanolamida de aproximadamente 7.000 Da preparado a partir de PLGA con una proporción 3:1 de lactida con respecto a glicolida y que presentaba un contenido de aproximadamente un 8,5% p/p de resiquimod conjugado se fabricó de forma personalizada en Princeton Global Synthesis (300 George Patterson Drive #206, Bristol, PA 19007.) La PLA-PEG-Nicotina (S-642), poli-D/L lactida-bloque-poli(etilenglicol)-( $\pm$ )-trans-3'-hidroximetilnicotina éter con bloque PEG de aproximadamente 5,000 Da y bloque PLA de aproximadamente 21.000 Da se fabricó de forma personalizada en Princeton Global Synthesis (300 George Patterson Drive #206, Bristol, PA 19007.) El copolímero de bloqueo de PLA-PEG-maleimida, que consistía en un bloque de poli-D/L-lactida (PLA) de aproximadamente 22000 Da y un bloque de polietilenglicol (PEG) de aproximadamente 2900 Da que se acabó con un grupo funcional de maleimida se sintetizó a partir de materiales de partida comerciales mediante la generación del bloque de PLA mediante la polimerización de apertura de anillos de dl-lactida con HO-PEG-maleimida con dl-lactida. El alcohol polivinílico PhEur, USP (85 a 89% hidrolizado, con una viscosidad de 3,4 a 4,6 mPa.s) se compró en EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027. número 4-88).

Las soluciones se prepararon en la siguiente forma:

Solución 1: HCl 0,13N en agua purificada.

Solución 2: El PLGA-R848 a 50 mg/mL, la PLA-PEG-Nicotina a 25 mg/mL y la PLA-PEG-maleimida a 25 mg/mL en diclorometano se prepararon mediante la disolución de cada polímero separadamente en diclorometano a 100 mg/mL y la posterior combinación de la solución de 2 partes de PLGA-R848 en 1 parte cada solución de PLA-PEG-Nicotina y solución de PLA-PEG-maleimida.

Solución 3: Alcohol polivinílico a 50 mg/mL en 100 mM de solución amortiguadora de fosfato, pH 8.

Solución 4: solución amortiguadora de fosfato 70 mM, pH 8.

Primero se creó una emulsión primaria (W1/O) mediante el uso de la solución 1 y la solución 2. La solución 1 (0,2 mL) y la solución 2 (1,0 mL) se combinaron en un tubo de vidrio pequeño a presión y se sonicaron a un 50% de amplitud durante 40 segundos en un sonificador Branson Digital Sonifier 250. A continuación se formó una emulsión secundaria (W1/O/W2) mediante la adición de la solución 3 (2,0 mL) a la solución primaria, con agitación excéntrica para crear una dispersión de rumbo, y después se sonicó a un 30% de amplitud durante 40 segundos mediante el uso de un sonificador Branson Digital Sonifier 250.

La emulsión secundaria se agregó a un vaso de precipitación de 50 mL que contenía 70 mM de solución amortiguadora de fosfato (30 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evaporara y que los nanovehículos se formaran en suspensión. Una porción de los nanovehículos suspendidos se lavó mediante la transferencia de la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrifuga, la centrifugación a 21.000 rcf durante 45 minutos, la extracción del sobrenadante y la resuspensión del sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Este procedimiento de lavado se repitió y después el sedimento se volvió a suspender en solución salina tamponada con fosfato para lograr una suspensión de nanovehículos que tuviera una concentración nominal de 10 mg/mL en una base de polímeros. La suspensión de nanovehículos se almacenó a -20 °C hasta su uso adicional.

Tabla 4: Caracterización de NC-Nic-OVA

Nanovehículo	Diámetro eficaz (nm)	Agonista de receptores tipo Toll, % p/p	Agonista de linfocitos T, % p/p
NC-Nic-OVA	215	R848, 4.2	Ninguno

(1) Nanovehículo (NC) con PEG-Nicotina y PEG-MAL sobre la superficie, preparado como antecede; 6,5 mg/mL suspensión en solución amortiguadora de PBS.

(2) Proteína OVA (Ovoalbúmina de clara de huevo): Worthington, Lote# POK12101, peso molecular: 46000.

(3) Reactivo de Traut (2-iminotiolano.HCl): MP Biomédico, Lote # 8830KA, peso molecular: 137,6

(4) solución amortiguadora a pH 8 (fosfato de sodio, 20 mM con EDTA 0,5 mM).

(5) pH 7 1x solución amortiguadora de PBS.

La proteína de OVA (10 mg) se disolvió en 1 mL de solución amortiguadora a pH 8. Se agregó una solución recién preparada de reactivo de Traut en solución amortiguadora a pH 8 (0,25 mL, 2 mg/mL) a la solución de proteína de OVA. La solución resultante se agitó bajo argón en la oscuridad durante 1,5 horas. La solución se diafiltró con un tubo de diafiltración MWCO 3K y se lavó con solución amortiguadora a pH 8 dos veces. La ovoalbúmina modificada

resultante con un grupo tiol se disolvió en 1 mL de solución amortiguadora a pH 8 bajo argón. La suspensión de nanovehículos (3 mL, 6,5 mg/mL) se centrifugó para extraer el sobrenadante. La solución de ovoalbúmina modificada a continuación se mezcló con los sedimentos de nanovehículos. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente bajo argón en la oscuridad durante 12 horas. La suspensión de nanovehículos a continuación se diluyó en 10 mL con PBS a pH 7 y se centrifugó. El sedimento de nanovehículos resultante se lavó con 2x10 mL PBS a pH 7. A continuación los conjugados de NC-Nic-OVA se volvieron a suspender en PBS a pH 7 (aproximadamente 6 mg/mL, 3 mL) y se almacenaron a 4°C.

**Preparación de NC-OVA**

El PLGA-R848, poli-D/L-lactida-coglicolida, 4-amino-2-(etoximetil)- $\alpha,\alpha$ -dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanolamida de aproximadamente 7.000 Da preparado a partir de PLGA con una proporción 3:1 de lactida con respecto a glicolida y que presentaba un contenido de aproximadamente un 8,5% p/p de resiquimod conjugado se fabricó de forma personalizada en Princeton Global Synthesis (300 George Patterson Drive #206, Bristol, PA 19007). El copolímero de bloqueo de PLA-PEG-maleimida, que consistía en un bloque de poli-D/L-lactida (PLA) de aproximadamente 22000 Da y un bloque de polietilenglicol (PEG) de aproximadamente 2900 Da que se acabó con un grupo funcional de maleimida se sintetizó a partir de materiales de partida comerciales mediante la generación del bloque de PLA mediante la polimerización de apertura de anillos de dl-lactida con HO-PEG-maleimida. El alcohol polivinílico PhEur, USP (85 a 89% hidrolizado, con una viscosidad de 3,4 a 4,6 mPa.s) se compró en EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027. número 4-88).

Las soluciones se prepararon en la siguiente forma:

Solución 1: HCl 0,13N en agua purificada.

Solución 2: El PLGA-R848 a 50 mg/mL y la PLA-PEG-Maleimida a 50 mg/mL en diclorometano se prepararon mediante la disolución de cada polímero separadamente en diclorometano a 100 mg/mL y la posterior combinación de la solución de 1 parte de PLGA-R848 en solución de 1 parte de PLA-PEG-Maleimida.

Solución 3: Alcohol polivinílico a 50 mg/mL en 100 mM de solución amortiguadora de fosfato, pH 8.

Solución 4: Solución amortiguadora de fosfato 70 mM, pH 8.

Primero se creó una emulsión primaria (W1/O) mediante el uso de la solución 1 y la solución 2. La solución 1 (0,2 mL) y la solución 2 (1,0 mL) se combinaron en un tubo de vidrio pequeño a presión y se sonicaron a un 50% de amplitud durante 40 segundos en un sonificador Branson Digital Sonifier 250. A continuación se formó una emulsión secundaria (W1/O/W2) mediante la adición de la solución 3 (2,0 mL) a la solución primaria, con agitación excéntrica para crear una dispersión de rumbo, y después se sonicó a un 30% de amplitud durante 40 segundos mediante el uso de un sonificador Branson Digital Sonifier 250.

La emulsión secundaria se agregó a un vaso de precipitación abierto de 50 mL que contenía 70 mM de solución amortiguadora de fosfato (30 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evaporara y que los nanovehículos se formaran en suspensión. Una porción de los nanovehículos suspendidos se lavó mediante la transferencia de la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrifuga, la centrifugación a 21.000 rcf durante 45 minutos, la extracción del sobrenadante y la resuspensión del sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Este procedimiento de lavado se repitió y después el sedimento se volvió a suspender en solución salina tamponada con fosfato para lograr una suspensión de nanovehículos que tuviera una concentración nominal de 10 mg/mL en una base de polímeros. La suspensión de nanovehículos se almacenó bajo congelación a -20°C hasta su uso adicional.

Tabla 5: Caracterización de NC-OVA

Nanovehículo	Diámetro eficaz (nm)	Agonista de receptores tipo Toll, % p/p	Agonista de linfocitos T, % p/p
NC-OVA	208	R848, 4,3	Ninguno

(1) Nanovehículo con PEG-MAL sobre la superficie, preparado como antecede; 6 mg/mL suspensión en solución amortiguadora de PBS.

(2) Proteína OVA (Ovoalbúmina de clara de huevo): Worthington, Lote# POK12101, peso molecular: 46000.

(3) Reactivo de Traut (2-iminotiolano.HCl): MP Biomédico, Lote # 8830KA, peso molecular: 137,6.

(4) solución amortiguadora a pH 8 (fosfato de sodio, 20 mM con EDTA 0,5 mM).

(5) pH 7 1x solución amortiguadora de PBS.

La proteína de OVA (20 mg) se disolvió en 1 mL de solución amortiguadora a pH 8. Se agregó una solución recién preparada de reactivo de Traut en solución amortiguadora a pH 8 (0,5 mL, 2 mg/mL) a la solución de proteína de OVA. La solución resultante se agitó bajo argón en la oscuridad durante 1,5 horas. La solución se diafiltró con un tubo de diafiltración MWCO 3K y se lavó con solución amortiguadora a pH 8 dos veces. La ovoalbúmina modificada resultante con un grupo tiol se disolvió en 1 mL de solución amortiguadora a pH 8 bajo argón. La suspensión de nanovehículos (4 mL, 6 mg/mL) se centrifugó para extraer el sobrenadante. La solución de OVA modificada a continuación se mezcló con el sedimento de nanovehículos. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente bajo argón en la oscuridad durante 12 horas. La suspensión de nanovehículos a continuación se diluyó en 10 mL con PBS a pH 7 y se centrifugó. El sedimento de nanovehículos resultante se lavó con 2x10 mL PBS a pH 7. A continuación los conjugados de NC-OVA se volvieron a suspender en PBS a pH 7 (aproximadamente 6 mg/mL, 4 mL) y se almacenaron a 4°C.

**Preparación de NC-HA5**

La sal de acetato de amida del péptido 323-339 de ovoalbúmina se compró a Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505. Código de producto 4065609). El PLGA-R848, poli-D/L-lactida-coglicolida, 4-amino-2-(etoximetil)- $\alpha$ , $\alpha$ -dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanolamida de aproximadamente 7.000 Da preparado a partir de PLGA con una proporción 3:1 de lactida con respecto a glicolida y que presentaba un contenido de aproximadamente un 8,5% p/p de resiquimod conjugado se fabricó de forma personalizada en Princeton Global Synthesis (300 George Patterson Drive #206, Bristol, PA 19007). El copolímero en bloque de PLA-PEG-maleimida, que consistía en un bloque de poli-D/L-lactida (PLA) de aproximadamente 22000 Da y un bloque de polietilenglicol (PEG) de aproximadamente 2900 Da que se acabó con un grupo funcional de maleimida se sintetizó a partir de materiales de partida comerciales mediante la generación del bloque de PLA mediante la polimerización de apertura de anillos de dl-lactida con HO-PEG-maleimida. El alcohol polivinílico PhEur, USP (85 a 89% hidrolizado, con una viscosidad de 3,4 a 4,6 mPa.s) se compró en EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027. número 4-88).

Las soluciones se prepararon en la siguiente forma:

Solución 1: El péptido de ovoalbúmina 323-339 a 20mg/mL se preparó en HCl 0,13N a temperatura ambiente.

Solución 2: El PLGA-R848 a 50 mg/mL y la PLA-PEG-Maleimida a 50 mg/mL en diclorometano se prepararon mediante la disolución de cada polímero separadamente en diclorometano a 100 mg/mL y la posterior combinación de la solución de 1 parte de PLGA-R848 en solución de 1 parte de PLA-PEG-Maleimida.

Solución 3: Alcohol polivinílico a 50 mg/mL en 100 mM de solución amortiguadora de fosfato, pH 8.

Solución 4: Solución amortiguadora de fosfato 70 mM, pH 8.

Primero se creó una emulsión primaria (W1/O) mediante el uso de la solución 1 y la solución 2. La solución 1 (0,2 mL) y la solución 2 (1,0 mL) se combinaron en un tubo de vidrio pequeño a presión y se sonicaron a un 50% de amplitud durante 40 segundos mediante el uso de un sonificador Branson Digital Sonifier 250. A continuación se formó una emulsión secundaria (W1/O/W2) mediante la adición de la solución 3 (2,0 mL) a la solución primaria, con agitación excéntrica para crear una dispersión de rumbo, y después se sonicó a un 30% de amplitud durante 40 segundos mediante el uso de un sonificador Branson Digital Sonifier 250.

La emulsión secundaria se agregó a un vaso de precipitación de 50 mL que contenía 70 mM de solución amortiguadora de fosfato (30 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evaporara y que los nanovehículos se formaran en suspensión. Una porción de los nanovehículos suspendidos se lavó mediante la transferencia de la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrifuga, la centrifugación a 21.000 rcf durante 45 minutos, la extracción del sobrenadante y la resuspensión del sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Este procedimiento de lavado se repitió y después el granulado se volvió a suspender en solución salina tamponada con fosfato para lograr una suspensión de nanovehículos que tuviera una concentración nominal de 10 mg/mL en una base de polímeros. La suspensión de nanovehículos se almacenó bajo congelación a -20°C hasta su uso adicional.

Tabla 6: Caracterización de NC-HA5

Nanovehículo	Diámetro eficaz (nm)	Agonista de receptores tipo Toll, % p/p	Agonista de linfocitos T, % p/p
NC-HA5	216	R848, 3,6	Péptido de ova 323-339, 2,0

(1) Nanovehículo con PEG-MAL sobre la superficie, preparado como antecede; 6,7 mg/mL suspensión en solución amortiguadora de PBS.



(2) Proteína HA5: Hemaglutinina recombinante, A/Vietnam/1203/2004, peso molecular: 72000, proporcionada en solución en pH 7 PBS-solución amortiguadora Tween (0,55 mg/mL).

(3) Reactivo de Traut (2-iminotiolano.HCl): MP Biomédico, Lote # 8830KA, peso molecular: 137,6.

(4) Solución amortiguadora a pH 8 (fosfato de sodio, 20 mM con EDTA 0,5 mM).

5 (5) pH 7 1x solución amortiguadora de PBS.

La proteína HA5 (0,21 g en 0,38 mL PBS-solución amortiguadora Tween a pH 7,1) se diluyó en 0,5 mL con solución amortiguadora a pH 8. Se agregó una solución recién preparada de reactivo de Traut en solución amortiguadora a pH 8 (0,02 mL, 2 mg/mL) a la solución de proteína HA5. La solución resultante se agitó bajo argón en la oscuridad durante 1,5 horas. La solución se diafiltró con un tubo de diafiltración MWCO 3K y se lavó con solución amortiguadora a pH 8 dos veces. La proteína HA5 modificada resultante con el grupo tiol se disolvió en 0,5 mL de solución amortiguadora a pH 8 bajo argón. La suspensión de nanovehículos (3 mL, 6,7 mg/mL) se centrifugó para extraer el sobrenadante. La solución de HA5 modificada a continuación se mezcló con los sedimentos de nanovehículos. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente bajo argón en la oscuridad durante 12 horas. La suspensión de nanovehículos a continuación se diluyó en 10 mL con PBS a pH 7 y se centrifugó. El sedimento de nanovehículos resultante se lavó con 2x10 mL PBS a pH 7. A continuación los conjugados de NC-HA5 se volvieron a suspender en PBS a pH 7 (aproximadamente 6 mg/mL, 3 mL) y se almacenaron a 4°C.

#### Preparación de NC-L2, NC-M2e o NC-M2e-L2

La sal de acetato de amida del péptido de ovoalbúmina 323-339 se compró a Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505. Código de producto 4065609). El PLGA-R848, poli-D/L-lactida-coglicolida, 4-amino-2-(etoximetil)- $\alpha,\alpha$ -dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanolamida de aproximadamente 7.000 Da preparado a partir de PLGA con una proporción 3:1 de lactida con respecto a glicolida y que presentaba un contenido de aproximadamente un 8,5% p/p de resiquimod conjugado se fabricó de forma personalizada en Princeton Global Synthesis (300 George Patterson Drive #206, Bristol, PA 19007). El copolímero en bloque de PLA-PEG-C6-N<sub>3</sub>, que consistía en un bloque de poli-D/L-lactida (PLA) de aproximadamente 23000 Da y un bloque de polietilenglicol (PEG) de aproximadamente 2000 Da terminado en un enlace C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> conjugado por amida a una azida, se sintetizó mediante la conjugación de HO-PEG-COOH en una amino-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-azida y la posterior generación del bloque de PLA mediante la polimerización de apertura de anillos del HO-PEG-C6-N<sub>3</sub> resultante con dl-lactida. El alcohol polivinílico PhEur, USP (85 a 89% hidrolizado, con una viscosidad de 3,4 a 4,6 mPa.s) se compró en EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027. número 4-88).

30 Las soluciones se prepararon en la siguiente forma:

Solución 1: El péptido de ovoalbúmina 323-339 a 20mg/mL se preparó en HCl 0,13N a temperatura ambiente.

Solución 2: El PLGA-R848 a 50 mg/mL y el PLA-PEG-C6-N<sub>3</sub> a 50 mg/mL en diclorometano se prepararon mediante la disolución de cada uno separadamente a 100 mg/mL en diclorometano y la posterior combinación en partes iguales por volumen.

35 Solución 3: Alcohol polivinílico a 50 mg/mL en 100 mM en 100 mM de solución amortiguadora de fosfato, pH 8.

Solución 4: Solución amortiguadora de fosfato 70 mM, pH 8.

Primero se creó una emulsión primaria (W1/O) mediante el uso de la solución 1 y la solución 2. La solución 1 (0,2 mL) y la solución 2 (1,0 mL) se combinaron en un tubo de vidrio pequeño a presión y se sonicaron a un 50% de amplitud durante 40 segundos en un sonificador Branson Digital Sonifier 250. A continuación se formó una emulsión secundaria (W1/O/W2) mediante la adición de la solución 3 (2,0 mL) a la emulsión primaria, con agitación excéntrica para crear una dispersión de rumbo, y después se sonicó a un 30% de amplitud durante 40 segundos mediante el uso de un sonificador Branson Digital Sonifier 250.

La emulsión secundaria se agregó a un vaso de precipitación de 50 mL que contenía 70 mM de solución amortiguadora de fosfato (30 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evaporara y que los nanovehículos se formaran en suspensión. Una porción de los nanovehículos suspendidos se lavó mediante la transferencia de la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrifuga, la centrifugación a 21.000 rcf durante 45 minutos, la extracción del sobrenadante y la resuspensión del sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Este procedimiento de lavado se repitió y después el sedimento se volvió a suspender en solución salina tamponada con fosfato para lograr una suspensión de nanovehículos que tuviera una concentración nominal de 10 mg/mL en una base de polímeros. Se crearon dos lotes idénticos y después se combinaron para formar una única solución homogénea que se almacenó bajo congelamiento a -20°C hasta su uso adicional.

Tabla 7: Caracterización de NC-L2, NC-M2e o NC-M2e-L2

Nanovehículo	Diámetro eficaz (nm)	Agonista de receptores tipo Toll, % p/p	Antígeno, % p/p
NC-L2, NC-M2e o NC-M2e-L2	209	R848, 4,2	Péptido de ova 323-339, 2,4

- (1) Nanovehículos con PEG-C6-N3 de superficie que contenían PLGA-R848 y péptido de Ova, preparados como antecede, suspensión de 7 mg/mL en PBS.
- 5 (2) Péptido L2 del HPV16 modificado con un enlace alquino unido al grupo amino Lys C-terminal; Bachem Americas, Inc, Lote B06055, MW 2595, sal de TFA; secuencia:  
H-Ala-Thr-Gln-Leu-Tyr-Lys-Thr-Cys-Lys-Gln-Ala-Gly-Thr-Cys-Pro-Pro-Asp-Ile-Ile-Pro-Lys-Val-Lys(5-hexinoil)-NH2(con enlace de disulfuro Cys-Cys)
- (3) Catalizadores: CuSO<sub>4</sub>, 100 mM en agua destilada; ligando THPTA, 200 mM en agua destilada; ascorbato de sodio, 200 mM en agua destilada recién preparada.
- 10 (4) Solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.  
La suspensión de nanovehículos (7 mg/mL, 4 mL) se concentró a aproximadamente 1 mL en volumen mediante centrifugación. Se agregó una solución del péptido L2 (20 mg) en 2 mL de solución amortiguadora de PBS. Se agregó una solución premezclada de 0,2 mL de CuSO<sub>4</sub> (100 mM) y 0,2 mL de ligando THPTA (200 mM), seguida de 0,4 mL de ascorbato de sodio (200 mM). La suspensión color amarillo claro resultante se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 18 horas. La suspensión a continuación se diluyó con solución amortiguadora de PBS a 10 mL y se centrifugó para extraer el sobrenadante. Los sedimentos de los conjugados de NC-L2 se lavaron de forma adicional dos veces con 10 mL de solución amortiguadora de PBS y se volvieron a suspender en solución amortiguadora a pH 7,4 a una concentración final de aproximadamente 6 mg/mL (aproximadamente 4 mL) y se almacenaron a 4°C.
- 15 (1) Nanovehículos con PEG-C6-N3 de superficie que contenían PLGA-R848 y péptido de Ova, preparados como antecede, suspensión de 7 mg/mL en PBS.
- (2) Péptido M2e modificado con un enlace alquino unido a Gly C-terminal; CS Bio Co, Catálogo No. CS4956, Lote: H308, MW 2650, sal de TFA; Secuencia:  
H-Met-Ser-Leu-Leu-Thr-Glu-Val-Glu-Thr-Pro-Thy-Arg-Asn-Glu-Trp-Glu-Cys-Arg-Cys-Ser-Asp-Gly-Gly-NHCH<sub>2</sub>CCH.
- 20 (3) Catalizadores: CuSO<sub>4</sub>, 100 mM en agua destilada; ligando THPTA, 200 mM en agua destilada; ascorbato de sodio, 200 mM en agua destilada recién preparada.
- (4) Solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.
- 25 La suspensión de nanovehículos (7 mg/mL, 4 mL) se concentró a aproximadamente 1 mL en volumen mediante centrifugación. Se agregó una solución del péptido M2e (20 mg) en 2 mL de solución amortiguadora de PBS. Se agregó una solución premezclada de 0,2 mL de CuSO<sub>4</sub> (100 mM) y 0,2 mL de ligando THPTA (200 mM), seguida de 0,4 mL de ascorbato de sodio (200 mM). La suspensión color amarillo claro resultante se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 18 horas. La suspensión a continuación se diluyó con solución amortiguadora de PBS a 10 mL y se centrifugó para extraer el sobrenadante. Los sedimentos de los conjugados de NC-M2e se lavaron de forma adicional dos veces con 10 mL de solución amortiguadora de PBS y se volvieron a suspender en solución amortiguadora a pH 7,4 a una concentración final de aproximadamente 6 mg/mL (aproximadamente 4 mL) y se almacenaron a 4°C.
- 30 (1) Nanovehículos con PEG-C6-N3 de superficie que contenían PLGA-R848 y péptido de Ova, preparados como antecede, suspensión de 7 mg/mL en PBS.
- (2) Péptido L2 del HPV16 modificado con un enlace alquino unido al grupo amino Lys C-terminal; Bachem Americas, Inc, Lote B06055, MW 2595, sal de TFA; secuencia:  
H-Ala-Thr-Gln-Leu-Tyr-Lys-Thr-Cys-Lys-Gln-Ala-Gly-Thr-Cys-Pro-Pro-Asp-Ile-Ile-Pro-Lys-Val-Lys(5-hexinoil)-NH<sub>2</sub> (con enlace de disulfuro Cys-Cys)
- (3) Péptido M2e modificado con un enlace alquino unido a Gly C-terminal; CS Bio Co, Catálogo No. CS4956, Lote: H308, MW 2650, sal de TFA; Secuencia:
- 35 H-Met-Ser-Leu-Leu-Thr-Glu-Val-Glu-Thr-Pro-Thy-Arg-Asn-Glu-Trp-Glu-Cys-Arg-Cys-Ser-Asp-Gly-Gly-NHCH<sub>2</sub>CCH.
- 40 (1) Nanovehículos con PEG-C6-N3 de superficie que contenían PLGA-R848 y péptido de Ova, preparados como antecede, suspensión de 7 mg/mL en PBS.
- (2) Péptido L2 del HPV16 modificado con un enlace alquino unido al grupo amino Lys C-terminal; Bachem Americas, Inc, Lote B06055, MW 2595, sal de TFA; secuencia:  
H-Ala-Thr-Gln-Leu-Tyr-Lys-Thr-Cys-Lys-Gln-Ala-Gly-Thr-Cys-Pro-Pro-Asp-Ile-Ile-Pro-Lys-Val-Lys(5-hexinoil)-NH<sub>2</sub> (con enlace de disulfuro Cys-Cys)
- (3) Péptido M2e modificado con un enlace alquino unido a Gly C-terminal; CS Bio Co, Catálogo No. CS4956, Lote: H308, MW 2650, sal de TFA; Secuencia:
- 45 H-Met-Ser-Leu-Leu-Thr-Glu-Val-Glu-Thr-Pro-Thy-Arg-Asn-Glu-Trp-Glu-Cys-Arg-Cys-Ser-Asp-Gly-Gly-NHCH<sub>2</sub>CCH.

(4) Catalizadores: CuSO<sub>4</sub>, 100 mM en agua destilada; ligando THPTA, 200 mM en agua destilada; ascorbato de sodio, 200 mM en agua destilada recién preparada.

(5) Solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

5 La suspensión de nanovehículos (7 mg/mL, 2 mL) se concentró a aproximadamente 0,5 mL en volumen mediante centrifugación. Se agregó una mezcla del péptido L2 (5 mg) y del péptido M2e (5 mg) en 1 mL de solución amortiguadora de PBS. Se agregó una solución de 0,2 mL de CuSO<sub>4</sub> (100 mM) y 0,2 mL de ligando THPTA (200 mM), seguida de 0,4 mL de ascorbato de sodio (200 mM). La suspensión color amarillo claro resultante se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 18 horas. La suspensión a continuación se diluyó con solución amortiguadora de PBS a 10 mL y se centrifugó para extraer el sobrenadante. Los sedimentos de los conjugados de 10 NC-M2e-L2 se lavaron de forma adicional dos veces con 10 mL de solución amortiguadora de PBS y se volvieron a suspender en solución amortiguadora a pH 7,4 a una concentración final de aproximadamente 6 mg/mL (aproximadamente 2 mL) y se almacenaron a 4°C.

**Ejemplo 5: La inmunización con dos nanovehículos de antígenos monovalentes conduce a la respuesta inmune a ambos antígenos**

15 Se midieron las valoraciones de anticuerpo antinicotina (barras color gris oscuro) y antiovoalbúmina (barras color gris claro) en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-Nic y NC-OVA (como se preparó en el ejemplo 4) (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada nanovehículo por inyección, 2 veces en intervalos de 3 20 semanas). Las valoraciones para el día 33 después de la inmunización con nanovehículos se muestran en la figura 1 (ELISA contra polilisina-nicotina o proteína de ovoalbúmina (grupo 1: sin inmunizar; grupo 2: inmunizado con NC-Nic y NC-OVA).

Los ratones se inyectaron con 100 µg de NC-Nic (nanovehículo que presenta nicotina sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) y 100 µg de NC-OVA (nanovehículo que 25 presenta ovoalbúmina sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) (subcutáneamente, patas traseras) en intervalos de 3 semanas (días 0 y 21). Se midieron las valoraciones de los anticuerpos antinicotina y antiovoalbúmina en suero en el día 33 después de la inmunización con el nanovehículo. Se muestran las valoraciones de los anticuerpos de antinicotina y antiovoalbúmina (EC<sub>50</sub>) como se midieron mediante ELISA contra polilisina-nicotina o proteína de ovoalbúmina (figura 1). También se muestran las 30 valoraciones para los ratones sin inmunizar de control. Los resultados demuestran que los ratones inmunizados con una combinación de dos nanovehículos de antígenos monovalentes (NC-Nic y NC-OVA) generan anticuerpos para ambos antígenos.

**Ejemplo 6: La inmunización con nanovehículos de antígenos monovalentes y bivalentes conduce a la respuesta inmune a los tres antígenos**

35 Se midieron las valoraciones de anticuerpo antinicotina, antiovoalbúmina y antipéptido L2 en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-Nic-OVA y NC-L2 (como se preparó en el ejemplo 4) (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada nanovehículo por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas). Las valoraciones para el día 33 después de la inmunización con el nanovehículo se muestran en la figura 2 (ELISA contra polilisina-nicotina o proteína de ovoalbúmina o PLA-PEG-péptido L2) (grupo 1: sin inmunizar; grupo 2: inmunizado con NC-Nic-OVA y NC-L2).

40 Los ratones se inyectaron con 100 µg de NC-Nic-OVA (nanovehículo que presenta nicotina y ovoalbúmina sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) y 100 µg de NC-L2 (nanovehículo que presenta el péptido L2 del HPV (aa17-36) sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) (subcutáneamente, patas traseras) en intervalos de 3 semanas (días 0 45 y 21). Se midieron las valoraciones de los anticuerpos antinicotina, antiovoalbúmina y antipéptido L2 en suero en el día 33 después de la inmunización con el nanovehículo. Se muestran las valoraciones de los anticuerpos antinicotina, antiovoalbúmina y antipéptido L2 (EC<sub>50</sub>) como se midieron mediante ELISA contra polilisina-nicotina, proteína de ovoalbúmina y péptido L2 (figura 2). También se muestran las valoraciones para los ratones sin inmunizar de control. Los resultados demuestran que los ratones inmunizados con una combinación de un nanovehículo de antígeno monovalente y bivalente (NC-Nic-OVA y NC-L2) generan anticuerpos para los tres 50 antígenos.

**Ejemplo 7: La inmunización con dos nanovehículos de antígenos bivalentes conduce a la respuesta inmune a los cuatro antígenos**

55 Se midieron las valoraciones de anticuerpo antinicotina, antiovoalbúmina, antipéptido M2e y antipéptido L2 en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-Nic-OVA y NC-M2e-L2 (como se preparó en el ejemplo 4) (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada nanovehículo por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas). Las valoraciones para el día 33 después de la inmunización con el nanovehículo se muestran en la figura 3 (ELISA contra polilisina-nicotina, proteína de ovoalbúmina, PLA-PEG-péptido M2e o PLA-PEG-péptido L2) (grupo 1: sin inmunizar; grupo 2: inmunizado con NC-Nic-OVA y NC-M2e-L2).

Los ratones se inyectaron con 100 µg de NC-Nic-OVA (nanovehículo que presenta nicotina y ovoalbúmina sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) y 100 µg de NC-M2e-L2 (nanovehículo que presenta el péptido M2e de la influenza (aa2-27) y el péptido L2 del HPV (aa17-36) sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) (subcutáneamente, patas traseras) en intervalos de 3 semanas (días 0 y 21). Se midieron las valoraciones de los anticuerpos antinicotina, antiovoalbúmina, antipéptido M2e y antipéptido L2 en suero en el día 33 después de la inmunización con el nanovehículo. Se muestran las valoraciones de los anticuerpos de antinicotina, antiovoalbúmina antipéptido M2e y antipéptido L2 (EC<sub>50</sub>) como se midieron mediante ELISA contra polilisina-nicotina, proteína de ovoalbúmina, péptido M2e y péptido L2 (figura 3). También se muestran las valoraciones para los ratones sin inmunizar de control. Los resultados demuestran que los ratones inmunizados con una combinación de dos nanovehículos de antígenos bivalentes (NC-Nic-OVA y NC-M2e-L2) generan anticuerpos para los cuatro antígenos.

**Ejemplo 8: La inmunización con dos nanovehículos de antígenos peptídicos monovalentes conduce a la respuesta inmune a ambos antígenos peptídicos**

Se midieron las valoraciones de anticuerpo de antipéptido M2e y antipéptido L2 en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-M2e y NC-L2 (como se preparó en el ejemplo 4) (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada nanovehículo por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas). Las valoraciones para el día 33 después de la inmunización con el nanovehículo se muestran en la figura 4 (ELISA contra PLA-PEG-péptido M2e o PLA-PEG-péptido L2) (grupo 1: sin inmunizar; grupo 2: inmunizado con NC-M2e y NC-L2).

Los ratones se inyectaron con 100 µg de NC-M2e (nanovehículo que presenta el péptido M2e de la influenza (aa2-27) sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) y 100 µg de NC-L2 (nanovehículo que presenta el péptido L2 del HPV (aa17-36) sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) (subcutáneamente, patas traseras) en intervalos de 3 semanas (días 0 y 21). Se midieron las valoraciones de los anticuerpos de antipéptido M2e y antipéptido L2 en suero en el día 33 después de la inmunización con el nanovehículo. Se muestran las valoraciones del anticuerpo del antipéptido M2e y del antipéptido L2 (EC<sub>50</sub>) como se midieron mediante ELISA contra el péptido M2e y el péptido L2 (figura 4). También se muestran las valoraciones para los ratones sin inmunizar de control. Los resultados demuestran que los ratones inmunizados con una combinación de dos nanovehículos de antígenos de péptidos monovalentes (NC-M2e y NC-L2) generan anticuerpos para ambos antígenos peptídicos.

**Ejemplo 9: La inmunización con dos nanovehículos de antígenos proteínicos monovalentes conduce a la respuesta inmune a ambos antígenos proteínicos**

Se midieron las valoraciones de anticuerpo de antiproteína HA5 y antiproteína de ovoalbúmina en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-HA5 y NC-OVA (como se preparó en el ejemplo 4) (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada NC por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas). Las valoraciones para el día 33 después de la inmunización con el nanovehículo se muestran en la figura 5 (ELISA contra proteína HA de H5N1 o proteína de ovoalbúmina) (grupo 1: sin inmunizar; grupo 2: inmunizado con NC-HA5 y NC-OVA).

Los ratones se inyectaron con 100 µg de NC-proteína HA5 (nanovehículo que presenta la proteína HA de H5N1 sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) y 100 µg de NC-OVA (nanovehículo que presenta ovoalbúmina sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) (subcutáneamente, patas traseras) en intervalos de 3 semanas (días 0 y 21). Se midieron las valoraciones de los anticuerpos de anti-HA5 y antiovoalbúmina en suero en el día 33 después de la inmunización con el nanovehículo. Se muestran las valoraciones de los anticuerpos de anti-HA5 y antiovoalbúmina (EC<sub>50</sub>) como se midieron mediante ELISA contra la proteína HA de H5N1 o proteína de ovoalbúmina (figura 5). También se muestran las valoraciones para los ratones sin inmunizar de control. Los resultados demuestran que los ratones inmunizados con una combinación de dos nanovehículos de antígenos proteínicos monovalentes (NC-HA5 y NC-OVA) generan anticuerpos para ambos antígenos proteínicos.

**Ejemplo 10: La inmunización con dos nanovehículos de antígenos monovalentes y uno bivalente conduce a la respuesta inmune a los cuatro antígenos**

Se midieron las valoraciones de anticuerpo Anti-HA, antiovoalbúmina, antipéptido M2e y antipéptido L2 en ratones sin inmunizar y ratones a los que se inyectó NC-HA5, NC-OVA, y NC-M2e-L2 (como se preparó en el ejemplo 4) (5 animales/grupo; subcutáneamente, 100 µg de cada NC por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas). Las valoraciones para el día 33 después de la inmunización con NC se muestran en la figura 6 (ELISA contra la proteína HA, proteína de ovoalbúmina, PLA-PEG-péptido M2e o PLA-PEG-péptido L2) (grupo 1: sin inmunizar; grupo 2: inmunizado con NC-HA5, NC-OVA y NC-M2e-L2).

Los ratones se inyectaron con 100 µg de NC-proteína HA5 (nanovehículo que presenta la proteína HA de la influenza H5N1 sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC), 100 µg de NC-OVA (nanovehículo que presenta ovoalbúmina sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar OP-II y el adyuvante R848 en el NC) y 100 µg de NC-M2e-L2 (nanovehículo que presenta el péptido M2e de la influenza (aa2-27) y el péptido L2 del HPV (aa17-36) sobre la superficie externa y que contiene el péptido auxiliar

OP-II y el adyuvante R848 en el NC) (subcutáneamente, patas traseras) en intervalos de 3 semanas (días 0 y 21). Se midieron las valoraciones de los anticuerpos anti-HA, antiovoalbúmina, antipéptido M2e y antipéptido L2 en suero en el día 33 después de la inmunización con el nanovehículo. Se muestran las valoraciones de los anticuerpos anti-HA, antiovoalbúmina, antipéptido M2e y antipéptido L2 ( $EC_{50}$ ) como se midieron mediante ELISA contra la proteína HA, proteína de ovoalbúmina, péptido M2e y péptido L2 (figura 6). También se muestran las valoraciones para los ratones sin inmunizar de control. Los resultados demuestran que los ratones inmunizados con una combinación de dos nanovehículos de antígenos monovalentes y uno bivalente (NC-HA5, NC-OVA y NC-M2e-L2) generan anticuerpos para los cuatro antígenos.

**Ejemplo 11: La inmunización con dos nanovehículos de antígenos monovalentes y uno bivalente conduce a la respuesta inmune a los cuatro antígenos**

Se midieron las valoraciones de anticuerpos en los ratones inmunizados con una combinación de NC-M2e, NC-péptido L2 y NC-nicotina-ovoalbúmina (como se preparó en el ejemplo 4). El NC-M2e y el NC-péptido L2 contenía el péptido auxiliar T OP-II (2,0% y 2,4%, correspondientemente) y el adyuvante R848 (3,6% y 4,3%, correspondientemente); la NC-nicotina-ovoalbúmina contenía el adyuvante R848 (4,2%). Cada barra de la figura 7 representa la valoración contra el antígeno. Se inmunizaron cinco animales por grupo subcutáneamente con 120  $\mu$ g de cada nanovehículo por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas. Se muestran las valoraciones para el día 33 después de la primera inmunización (ELISA realizado contra PLA-PEG-M2e, PLA-PEG-L2, ovoalbúmina y polilisina-nicotina, correspondientemente).

Estos resultados demuestran que la inmunización con una combinación de dos nanovehículos que tienen antígenos peptídicos diferentes junto con un nanovehículo que presenta otros dos antígenos resulta en la generación de anticuerpos para los cuatro antígenos contenidos en el nanovehículo. Cuando se utilizaron cantidades idénticas de tres nanovehículos, el primero que contenía el péptido M2e de superficie del virus de la gripe A (ectodominio de proteínas de la matriz M2, aminoácidos 2-27), el segundo que contenía el péptido L2 de superficie del virus del HPV (aminoácidos 17-36 de la proteína de la cápside L2 del HPV-16), y el tercero que contenía nicotina y proteína de ovoalbúmina de superficie, para la inmunización animal, se indujo una respuesta humoral fuerte en todos los animales contra los cuatro antígenos acoplados al nanovehículo (figura 7). No se detectó reactividad en el suero de los ratones preinmunes.

**Ejemplo 12: La inmunización con dos nanovehículos monovalentes con a**

**ntígenos en diferentes orientaciones estéricas conduce a una respuesta inmune para ambas orientaciones**

**Preparación de NC-3'-Nicotina**

La sal de acetato de amida del péptido de ovoalbúmina 323-339 se compró a Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505. Código de producto 4065609). El PLGA-R848, poli-D/L-lactida-coglicolida, 4-amino-2-(etoximetil)- $\alpha$ , $\alpha$ -dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanolamida de aproximadamente 7.000 Da preparado a partir de PLGA con una proporción 3:1 de lactida con respecto a glicolida y que presentaba un contenido de aproximadamente un 8,5% p/p de resiquimod conjugado se fabricó de forma personalizada en Princeton Global Synthesis (300 George Patterson Drive #206, Bristol, PA 19007). La PLA-PEG-Nicotina (S-642), poli-D/L lactida-bloque-poli(etilenglicol)-( $\pm$ )-trans-3'-hidroximetilnicotina éter con bloque PEG de aproximadamente 5.000 Da y bloque PLA de aproximadamente 21.000 Da se fabricó de forma personalizada en Princeton Global Synthesis (300 George Patterson Drive #206, Bristol, PA 19007.) El alcohol polivinílico PhEur, USP (85 a 89% hidrolizado, con una viscosidad de 3,4 a 4,6 mPa.s) se compró en EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027. número 4-88).

Las soluciones se prepararon en la siguiente forma:

Solución 1: El péptido de ovoalbúmina 323-339 a 20mg/mL se preparó en HCl 0,13N a temperatura ambiente.

Solución 2: El PLGA-R848 a 50 mg/mL, la PLA-PEG-Nicotina a 25 mg/mL, y el PLA a 25 mg/mL en diclorometano se prepararon mediante la disolución de cada polímero separadamente en diclorometano a 100 mg/mL y la posterior combinación de la solución de 2 partes de PLGA-R848 en 1 parte cada solución de PLA-PEG-Nicotina y solución de PLA.

Solución 3: Alcohol polivinílico a 50 mg/mL en 100 mM en 100 mM de solución amortiguadora de fosfato, pH 8.

Solución 4: Solución amortiguadora de fosfato 70 mM, pH 8.

Primero se creó una emulsión primaria (W1/O) mediante el uso de la solución 1 y la solución 2. La solución 1 (0,2 mL) y la solución 2 (1,0 mL) se combinaron en un tubo de vidrio pequeño a presión y se sonicaron a un 50% de amplitud durante 40 segundos mediante el uso de un sonicador Branson Digital Sonifier 250. A continuación se formó una emulsión secundaria (W1/O/W2) mediante la adición de la solución 3 (2,0 mL) a la emulsión primaria, con agitación excéntrica para crear una dispersión de rumbo, y después se sonicó a un 30% de amplitud durante 40 segundos mediante el uso de un sonicador Branson Digital Sonifier 250.

La emulsión secundaria se agregó a un vaso de precipitación abierto de 50 mL que contenía 70 mM de solución amortiguadora de fosfato (30 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evaporara y que los nanovehículos se formaran en suspensión. Una porción de los nanovehículos suspendidos se lavó mediante la transferencia de la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrifuga, la centrifugación a 21.000 rcf durante 45 minutos, la extracción del sobrenadante y la resuspensión del sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Este procedimiento de lavado se repitió y después el sedimento se volvió a suspender en solución salina tamponada con fosfato para lograr una suspensión de nanovehículos que tuviera una concentración nominal de 10 mg/mL en una base de polímeros. La suspensión de nanovehículos se almacenó bajo congelación a -20°C hasta su uso adicional.

10 Tabla 8: Caracterización de NC-3'-Nicotina

Nanovehículo	Diámetro eficaz (nm)	Agonista de receptores tipo Toll, % p/p	Agonista de linfocitos T, % p/p
NC-3'-Nicotina	193	R848, 4,2	Péptido de ova 323-339, 2,1

#### Preparación de NC-1'-Nicotina

La sal de acetato de amida del péptido de ovoalbúmina 323-339 se compró a Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505. Código de producto 4065609). El PLGA-R848, poli-D/L-lactida-coglicolida, 4-amino-2-(etoximetil)- $\alpha,\alpha$ -dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanolamida de aproximadamente 7.000 Da preparado a partir de PLGA con una proporción 3:1 de lactida con respecto a glicolida y que presentaba un contenido de aproximadamente un 8,5% p/p de resiquimod conjugado se fabricó de forma personalizada en Princeton Global Synthesis (300 George Patterson Drive #206, Bristol, PA 19007). El PLA-PEG-1'-Nic, un copolímero en bloque que consistía en un bloque de poli-D/L-lactida (PLA) de aproximadamente 23000 Da y un bloque de polietilenglicol (PEG) de aproximadamente 2000 Da conjugado con la nicotina mediante un enlace de 4 carbonos al grupo amino 1' sobre la nicotina, se sintetizó. En resumen, la nicotina con un enlace de alcohol butílico en la posición 1' se preparó en HO-PEG-1'-Nic mediante la polimerización con óxido de etileno y a continuación se generó la extensión de PLA mediante la polimerización de apertura de anillos de HO-PEG-1'-Nic con dl-lactida. El PLA con una viscosidad inherente de 0,22 dL/g se compró en SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211. Código de producto 100 DL 2A). El alcohol polivinílico PhEur, USP (85 a 89% hidrolizado, con una viscosidad de 3,4 a 4,6 mPa.s) se compró en EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027. número 4-88).

Las soluciones se prepararon en la siguiente forma:

Solución 1: El péptido de ovoalbúmina 323-339 a 20mg/mL se preparó en HCl 0,13N a temperatura ambiente.

Solución 2: El PLGA-R848 a 50 mg/mL, PLA-PEG-1'-Nic a 25 mg/mL, y PLA a 25 mg/mL en diclorometano se prepararon mediante la disolución de cada polímero separadamente en diclorometano a 100 mg/mL y la posterior combinación de la solución de 2 partes de PLGA-R848 en 1 parte cada solución de PLA-PEG-1'-Nic y solución de PLA.

Solución 3: Alcohol polivinílico a 50 mg/mL en 100 mM en 100 mM de solución amortiguadora de fosfato, pH 8.

Solución 4: Solución amortiguadora de fosfato 70 mM, pH 8.

Primero se creó una emulsión primaria (W1/O) mediante el uso de la solución 1 y la solución 2. La solución 1 (0,2 mL) y la solución 2 (1,0 mL) se combinaron en un tubo de vidrio pequeño a presión y se sonicaron a un 50% de amplitud durante 40 segundos en un sonificador Branson Digital Sonifier 250. A continuación se formó una emulsión secundaria (W1/O/W2) mediante la adición de la solución 3 (2,0 mL) a la emulsión primaria, con agitación excéntrica para crear una dispersión de rumbo, y después se sonicó a un 30% de amplitud durante 60 segundos mediante el uso de un sonificador Branson Digital Sonifier 250.

La emulsión secundaria se agregó a un vaso de precipitación de 50 mL que contenía 70 mM de solución amortiguadora de fosfato (30 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que el diclorometano se evaporara y que los nanovehículos se formaran en suspensión. Una porción de los nanovehículos suspendidos se lavó mediante la transferencia de la suspensión de nanovehículos a un tubo de centrifuga, la centrifugación a 21.000 rcf durante 45 minutos, la extracción del sobrenadante y la resuspensión del sedimento en solución salina tamponada con fosfato. Este procedimiento de lavado se repitió y después el sedimento se volvió a suspender en solución salina tamponada con fosfato para lograr una suspensión de nanovehículos que tuviera una concentración nominal de 10 mg/mL en una base de polímeros. La suspensión de nanovehículos se almacenó bajo congelación a -20°C hasta su uso adicional.

Tabla 9: Caracterización de NC-1'-Nicotina

Nanovehículo	Diámetro eficaz (nm)	Agonista de receptores tipo Toll, % p/p	Agonista de linfocitos T, % p/p
NC-1'-Nicotina	238	R848, 3,9	Péptido de ova 323-339, 2,8

### Inmunización y resultados

Se midieron las valoraciones de anticuerpo en ratones inmunizados con una combinación de NC-3'-nicotina y NC-1'-nicotina. El NC-3'-nicotina y el NC-1'-nicotina contenían el péptido auxiliar T OP-II (2,1%) y el adyuvante R848 (4,2%). Cada barra de la figura 8 representa la valoración contra el antígeno. Se inmunizaron cinco animales por grupo subcutáneamente con 120 µg de cada nanovehículo por inyección, 2 veces en intervalos de 3 semanas. Se muestran las valoraciones para el día 33 después de la primera inmunización (ELISA realizado contra polilisina-nicotina, respectivamente).

Estos resultados muestran que la inmunización con una combinación de dos nanovehículos, donde cada uno presenta el mismo antígeno pero en diferentes orientaciones estéricas resulta en la generación de anticuerpos contra ambas de estas orientaciones diferentes del mismo antígeno. Cuando se utilizaron cantidades idénticas de dos nanovehículos, el primero que contenía nicotina unida al nanovehículo en la posición 3' y el segundo unido al nanovehículo en la posición 1', para la inmunización animal, se indujo una respuesta humoral fuerte en todos los animales contra ambas orientaciones de nicotina (figura 8). No se detectó reactividad en el suero de los ratones preinmunes.

### Ejemplo 13: Preparaciones de polímeros y nanovehículos

#### Preparación de PLGA-R848

El PLGA-R848 se preparó mediante la reacción del polímero de PLGA que contenía un grupo terminal ácido con R848 en la presencia de un agente de acoplamiento como HBTU en la siguiente forma. Una mezcla de PLGA (Lakeshores Polymers, peso molecular ~5000, 7525DLG1A, número de ácido 0,7 mmol/g, 10 g, 7,0 mmol) y HBTU (5,3 g, 14 mmol) en EtOAc anhidro (160 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 50 minutos. Se agregó el compuesto R848 (2,2 g, 7 mmol), seguido de diisopropiletamina (DIPEA) (5 mL, 28 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas y después a 50-55°C durante la noche (aproximadamente 16 horas). Después del enfriamiento la mezcla se diluyó con EtOAc (200 mL) y se lavó con una solución de NH<sub>4</sub>Cl saturada (2 x 40 mL), agua (40 mL) y salmuera (40 mL). La solución se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 g) y se concentró en un residuo en forma de gel. A continuación se agregó alcohol isopropílico (IPA) (300 mL) y el conjugado de polímeros se precipitó de la solución. A continuación el polímero se lavó con IPA (4 x 50 mL) para extraer los reactivos residuales y se secó al vacío a 35-40°C durante 3 días como un polvo blanco (10,26 g, el peso molecular por cromatografía de permeación (GPC) es 5200, la carga de R848 es de un 12% por HPLC).

En una forma similar, el PLA-R848 se preparó mediante la reacción de PLA-CO<sub>2</sub>H (polilactida con un grupo terminal ácido) con R848.

#### Preparación de PLA-PEG-CO<sub>2</sub>H

Una mezcla de HO-PEG-CO<sub>2</sub>H (peso molecular: 2000, 1,0 g, 0,5 mmol), dl-lactida (10,8 g, 75 mmol) y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (15 g) en un matraz de fondo redondo de 100 mL, se secó al vacío a 60°C durante 2 días. Se agregó tolueno anhidro (30 mL) y la mezcla se calentó a reflujo bajo argón. Se agregó Sn(Oct)<sub>2</sub> (0,162 mL, 0,5 mmol). La mezcla se sometió a reflujo bajo argón durante la noche y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) y se filtró a través de una almohadilla de celite. El filtrado se concentró en un residuo denso pegajoso. Se agregó MeOH al 10% en éter de dietilo (200 mL) para precipitar el polímero con agitación vigorosa. El polímero se lavó de forma adicional con MeOH al 10% en éter (100 mL) y se secó al vacío a 30°C para proporcionar el copolímero de PLA-PEG-CO<sub>2</sub>H como un sólido espumoso blancuzco (10,0 g, H NMR en CDCl<sub>3</sub> mostró que el polímero tenía un peso molecular de 21000).

#### Preparación de PLA-PEG-NH<sub>2</sub>

Una mezcla de HO-PEG-NH<sub>2</sub>.HCl (peso molecular: 3500, 1,0 g, 0,28 mmol), dl-lactida (6,1 g, 42 mmol) y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 g) en un matraz de fondo redondo de 100 mL, se secó al vacío a 60°C durante 1 día. Se agregó tolueno anhidro (30 mL) y la mezcla se calentó a reflujo a 90°C bajo argón. Se agregó Sn(Oct)<sub>2</sub> (0,1 mL, 0,28 mmol). La mezcla se sometió a reflujo bajo argón durante la noche y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (200 mL) y se filtró a través de una almohadilla de celite. El filtrado se concentró en un residuo denso pegajoso. Se agregó MeOH al 10% en t-butil metil éter (MTBE) (200 mL) para precipitar el polímero con agitación vigorosa. El polímero se lavó de forma adicional con MeOH al 5% en MTBE (50 mL) y el MTBE (50 mL) se secó

bajo vacío a 30°C para proporcionar el copolímero de PLA-PEG-NH<sub>2</sub>.HCl como un sólido espumoso blancuzco (5,0 g, H NMR en CDCl<sub>3</sub> mostró que el polímero tenía un peso molecular de 18000).

### Preparación de PLA-PEG-PEG3-N3

5 El polímero PLA-PEG-N3 se preparó mediante la polimerización de apertura de anillos de HO-PEG-azida con dl-lactida en la presencia de un catalizador como Sn(Oct)<sub>2</sub> en la siguiente forma. El HO-PEG-CO<sub>2</sub>H (peso molecular 3500, 1,33 g, 0,38 mmol) se trató con NH<sub>2</sub>-PEG3-N3 (peso molecular 218,2, 0,1 g, 0,458 mmol) en la presencia de DCC (peso molecular 206, 0,117 g, 0,57 mmol) y NHS (peso molecular 115, 0,066 g, 0,57 mmol) en DCM seco (10 mL) durante la noche. Después de la filtración para extraer el subproducto insoluble (DCC-urea), la solución se concentró y después se diluyó con éter para precipitar el polímero HO-PEG-PEG3-N3 (1,17 g). Después del secado, el HO-PEG-PEG3-N3 (peso molecular 3700, 1,17 g, 0,32 mmol) se mezcló con dl-lactida (recristalizado a partir de EtOAc, peso molecular 144, 6,83 g, 47,4 mmol) y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 g) en un matraz de 100 mL. La mezcla sólida se secó al vacío a 45°C durante la noche y se agregó tolueno seco (30 mL). La suspensión resultante se calentó a 110°C bajo argón y se agregó Sn(Oct)<sub>2</sub> (peso molecular 405, 0,1 mL, 0,32 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 18 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con DCM (50 mL) y se filtró. Después de la concentración en un residuo oleoso, se agregó MTBE (200 mL) para precipitar el polímero que se lavó una vez con 100 mL de MeOH al 10% en MTBE y 50 mL de MTBE. Después del secado

### Preparación de PLA-PEG-C6-N3

20 El HO-PEG-CO<sub>2</sub>H (peso molecular 3500, 1,00 g, 0,29 mmol) se trató con 6-azido-1-hexilamina (H<sub>2</sub>N-C<sub>6</sub>-N<sub>3</sub>) (peso molecular 142, 0,081 g, 0,57 mmol) en la presencia de DCC (peso molecular 206, 0,118 g, 0,57 mmol) y NHS (peso molecular 115, 0,066 g, 0,57 mmol) en DCM seco (10 mL) durante la noche. Después de la filtración para extraer el subproducto insoluble (DCC-urea), la solución se concentró y después se diluyó con MTBE para precipitar el polímero que después se lavó dos veces con MTBE y se secó al vacío a 30°C durante la noche para proporcionar el polímero HO-PEG-C<sub>6</sub>-N<sub>3</sub> (1,1g). El polímero HO-PEG-C<sub>6</sub>-N<sub>3</sub> (1,1 g, 0,29 mmol) y dl-lactida (6,5 g, 45 mmol) se mezclaron en tolueno seco (60 mL). La mezcla se calentó a reflujo mientras que se extrajeron 30 mL de tolueno mediante destilación azeotrópica. La solución resultante se enfrió a 100°C y se agregó Sn(Oct)<sub>2</sub> (0,095 mL, 0,29 mmol). La solución se calentó a reflujo bajo argón durante la noche y se enfrió a temperatura ambiente. A continuación la solución se agregó a 150 mL de 2-propanol para precipitar el polímero que se lavó con 2-propanol (100mL) y se secó al vacío a 30°C durante 2 días para proporcionar el copolímero PLA-PEG-C<sub>6</sub>-N<sub>3</sub> como un sólido blancuzco (6,8 g, el peso molecular por cromatografía de permeación en gel (GPC) es 27000 con puntos por pulgada (DPI) de 1,5).

### Preparación de PLA-PEG-(5K)-CONH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>

35 Una mezcla de HO-PEG(5k)-CO<sub>2</sub>H (JenKem Technology, EE.UU.) (peso molecular: 5000, 1,0 g, 0,2 mmol), terc-butyl carbazato (Boc-hidrazida) (peso molecular: 132, 0,053 g, 0,4 mmol), DCC (peso molecular 206, 0,083 g, 0,4 mmol) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (peso molecular 115, 0,05 g, 0,4 mmol) en DCM seco (15 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 25 horas. La DCC-urea insoluble se extrajo mediante filtración y el filtrado se concentró. El residuo se agregó a 50 mL de MTBE para precipitar el polímero que se lavó dos veces con 40 mL de MTBE y se secó al vacío durante 2 días para proporcionar HO-PEG(5k)-CONHNHtBoc como un polvo blanco (1,07 g). El polímero HO-PEG(5k)-CONHNHtBoc (1,07 g, 0,20 mmol) y la dl-lactida (4,32 g, 30 mmol) se mezclaron en tolueno seco (70 mL). La mezcla se calentó a reflujo mientras que se extrajeron 50 mL de tolueno mediante destilación azeotrópica. La solución resultante se enfrió a 100°C y se agregó Sn(Oct)<sub>2</sub> (0,065 mL, 0,20 mmol). La solución se calentó a reflujo bajo argón durante 22 horas y se enfrió a temperatura ambiente. A continuación la solución se agregó a 150 mL de 2-propanol para precipitar el polímero que se lavó con 2-propanol (60 mL) y se secó al vacío a 30°C durante 2 días para proporcionar el copolímero PLA-PEG(5k)-CONHNHtBoc como un trozo sólido blanco. El polímero se disolvió en 50 mL de DCM seco y se enfrió con agua helada. Se agregó ácido trifluoroacético (TFA) (15 mL) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución amarillenta se concentró a sequedad. El residuo se agregó a 200 mL de 2-propanol para precipitar el polímero que se lavó con 100 mL de 2-propanol. El polímero se secó a 30°C al vacío para proporcionar el polímero deseado como PLA-PEG(5k)-CONHNH<sub>2</sub> (3,4 g, peso molecular por NMR: 24000).

### Preparación de PLA-PEG-MAL

50 La HO-PEG(3K)-maleimida (HO-PEG-MAL) (Laysan Bio, Inc) (peso molecular 3000, 0,6g, 0,2 mmol) se mezcló con dl-lactida (recristalizada a partir de EtOAc, peso molecular 144, 4,32 g, 30 mmol) y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 g) en un matraz de 100 mL. La mezcla sólida se secó al vacío a 60°C durante la noche y se agregó tolueno seco (20 mL). La suspensión resultante se calentó a 110°C bajo argón y se agregó Sn(Oct)<sub>2</sub> (peso molecular 405, 0,065 mL, 0,2 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 20 horas y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con DCM (50 mL) y se filtró. Después de la concentración en un residuo oleoso, se agregó MeOH al 10% en éter de etilo (80 mL) para precipitar el polímero que se lavó una vez con 80 mL de MeOH al 10% en éter y 60 mL de éter. Después del secado a 30°C al vacío durante la noche, se obtuvo el PLA-PEG(3K)-MAL como una espuma blanca (3,26 g, peso molecular promedio: 24.000 por H NMR).



**Preparación de PLA-PEG-SH (Predicción)**

El copolímero PLA-PEG-SH se preparó de conformidad con la bibliografía (Nisha C. Kalarickal, et al; *Macromolecules* 2007, 40:1874-1880). En resumen, se llevaron a cabo las siguientes etapas.

5 Etapa 1. Preparación de tBuS-PEG: En un matraz de fondo redondo de 100 mL sellado se cargó THF anhidro (22 mL), naftaleno de potasio (solución 0,2 M en THF, 12 mL), y tBu-SH (0,54 mL, 4,8 mmol). Los componentes se agitaron durante al menos 15 minutos para asegurar la formación de tiolatos, en cuyo punto se agregó óxido de etileno líquido (EO) (11,5 mL, 0,230 mol) mediante el uso de una aguja de dos cabezas. La reacción de polimerización se llevó a cabo durante 48 horas, y el producto se recuperó mediante precipitación en éter de dietilo frío. El peso molecular del polímero mediante GPC fue de aproximadamente 2100.

10 Etapa 2. Preparación de (PEG-S)2: El tBu-S-PEG de la etapa 1 (1,0 g) se disolvió en DMSO (19 mL) seguido de la adición de TFA (106 mL, 15/85 p/p) a una concentración final de polímero de 8 mg/mL. La reacción se agitó durante 20 minutos, después de lo cual el TFA se extrajo mediante evaporación giratoria. El residuo a continuación se precipitó dos veces en éter de dietilo frío para recuperar el disulfuro de PEG crudo. El (PEG-S)2 crudo se purificó de forma adicional mediante precipitación fraccionaria. Por consiguiente, el polímero (1,0g) se disolvió en diclorometano (100 mL), y después se agregó éter de dietilo frío en etapas con agitación hasta la aparición de un precipitado. La solución se agitó durante 30 minutos adicionales y la masa precipitada se aisló mediante filtración y se secó al vacío. El rendimiento de recuperación de disulfuro de PEG, (PEG-S)2, al final de las dos a tres precipitaciones fraccionarias se encontró en el intervalo de un 55 y un 60%.###

20 Etapa 3. Preparación de (PLA-b-PEG-S)2 mediante polimerización de apertura de anillos de dl-lactida: (PEG-S)2 (0,4 g, 0,10 mmol) y dl-lactida (4,32 g, 30 mmol) se mezclaron en tolueno seco (70 mL). La mezcla se calentó a reflujo mientras que se extrajeron 50 mL de tolueno mediante destilación azeotrópica. La solución resultante se enfrió a 100°C y se agregó Sn(Oct)2 (0,065 mL, 0,20 mmol). La solución se calentó a reflujo bajo argón durante 18 a 20 horas y se enfrió a temperatura ambiente. A continuación la solución se agregó a 150 mL de 2-propanol para precipitar el polímero que se lavó con 2-propanol (60 mL) y éter (60 mL) y se secó al vacío a 30°C durante 2 días para proporcionar (PLA-PEG-S)2 (aproximadamente 4,0 g, peso molecular: 46000).

25 Etapa 4. Preparación de PLA-PEG-SH mediante la reducción de (PLA-PEG-S)2: El (PLA-PEG-S)2 de la etapa 3 (3,2 g, 0,07 mmol) se disolvió en THF desoxigenado (25 mL) y se agregó Bu3P (1,7 mL, 7,0 mmol, 100 equiv con respecto a las unidades de disulfuro). La mezcla de reacción se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante la noche. El polímero tiolado reducido se recuperó mediante precipitación en éter de dietilo frío seguido de la filtración bajo una atmósfera de argón y se secó de forma adicional al vacío para proporcionar PLA-PEG-SH como un sólido grueso blancuzco (aproximadamente 3,0, peso molecular: 23000).

**Preparación de nanovehículos con PEG-X de superficie que contienen el péptido de Ova encapsulado**

35 Los nanovehículos que comprendían PLGA-R848, PLA-PEG-X (donde X= grupo de ácido carboxílico (CO2H), amina (NH2), C6-azida (C6-N3) o PEG3-azida (PEG3-N3), hidrazida (CONHNH2), maleimida (MAL), tiol (SH) y ácido nitrilotriacético (NTA)) que contenían el péptido de ovoalbúmina se prepararon mediante un método de doble emulsión donde el péptido de ovoalbúmina se encontraba encapsulado en los nanovehículos. El alcohol polivinílico (peso molecular = 11 KD -31 KD, parcialmente hidrolizado en un 87 a un 89%) se compró a JT Baker. El péptido de ovoalbúmina 323-339, (secuencia: H-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-NH2, sal de acetato, Lote # B06395) se obtuvo en Bachem Americas Inc. (3132 Kashiwa Street, Torrance CA 90505), el PLA con un grupo terminal ácido (100DL2A) se obtuvo en SurModics Pharmaceuticals (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211); los conjugados PLGA-R848 y PLA-PEG-X se prepararon como se describe anteriormente en este mismo ejemplo.

Los materiales que anteceden se utilizaron para preparar las siguientes soluciones:

1. Conjugado PLGA-R848 en cloruro de metileno a 100 mg/mL,
- 45 2. PLA-PEG-X en cloruro de metileno a 100 mg/mL,
3. PLA (100DL2A) en cloruro de metileno a 100 mg/mL,
4. Péptido de ovoalbúmina 323 – 339 en HCl 0,13N a 70 mg/mL, y
5. Alcohol polivinílico en solución amortiguadora de fosfato 100mM a pH 8 a 50 mg/mL.

50 La solución #1 (0,50 mL), la solución #2 (0,25 mL) y la solución #3 (0,25 mL) se combinaron y la solución #4 en HCl 0,13N (0,1mL) se agregó en un recipiente pequeño y la mezcla se sonicó a un 50% de amplitud durante 40 segundos mediante el uso de un sonicador Branson Digital Sonifier 250. A esta emulsión se le agregó la solución # 5 (2,0 mL) y se llevó a cabo la sonicación a un 30% de amplitud durante 40 segundos mediante el uso de un sonicador Branson Digital Sonifier 250, en la segunda emulsión. A continuación esta se agregó a un vaso de

precipitación que contenía una solución amortiguadora de fosfato 70mM a pH 8 (30 mL) y esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas para formar los nanovehículos.

5 Para lavar los nanovehículos, una porción de la dispersión de nanovehículos (26,5 mL) se transfirió a un tubo de centrífuga de 50mL y se centrifugó a 9500rpm (13.800g) durante una hora a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y el sedimento se volvió a suspender en 26,5 mL de solución salina tamponada con fosfato. El procedimiento de centrifugación se repitió y el sedimento se volvió a suspender en 8,3g de solución salina tamponada con fosfato para obtener una dispersión final de nanovehículos de aproximadamente 10 mg/mL que contenía el péptido de ovoalbúmina encapsulado.

#### **Preparación de nanovehículos con PEG-X de superficie sin el péptido de ovoalbúmina encapsulado**

10 En una forma similar al procedimiento descrito anteriormente, los nanovehículos sin el péptido de ovoalbúmina se prepararon y la solución #4 se eliminó en la preparación.

#### **Ejemplo 14: Nanovehículos con antígeno obtenido contra derivado (Predicción)**

15 Nanovehículos con PTH: Los nanovehículos con grupos hidrazida PEG-CONHNH<sub>2</sub> de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13. La proteína de PTH (hormona paratiroidea) se aciló mediante el grupo amino de lisina con ácido 4-formil-benzoico en la presencia de EDC. El HCl y la NHS se utilizaron para generar la PTH que contenía grupos benzaldehído. Después de la purificación mediante la diafiltración con un filtro MWCO 1K, la PTH modificada se conjugó con los nanovehículos que contenían hidrazida sobre la superficie en la solución amortiguadora de PBS (pH 8-9). Después de la purificación mediante el lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, la PTH modificada por nanovehículo resultante se suspendió en solución amortiguadora a pH 7,4.

25 Nanovehículos con PTH modificada: Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar. La PTH modificada disuelta en la misma solución amortiguadora de PBS, a continuación se agregó a la suspensión de nanovehículos resultante. La conjugación se dejó proceder a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, la PTH modificada por nanovehículo resultante se suspendió en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

30 Se combinaron porciones iguales de los dos nanovehículos para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

#### **Ejemplo 15: Nanovehículos monovalentes y bivalentes con antígenos del mismo género de agente infeccioso (Predicción)**

35 Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. A continuación, el trímero de proteínas de HA del virus de la gripe A humana y la proteína M2e de HA disuelta en solución amortiguadora a pH 6,0 se agregaron a la suspensión de nanovehículos resultante. La conjugación se dejó proceder a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, el conjugado nanovehículo-trímero de proteínas de HA/ proteína M2e se suspendió en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

De la misma forma, el conjugado de nanovehículo-proteína monomérica de HA se preparó mediante el uso de la proteína de HA del virus de la gripe A humana.

45 A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

#### **Ejemplo 16: Nanovehículos monovalentes y bivalentes con antígenos de un género diferente de agente infeccioso (Predicción)**

50 Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. A continuación, el trímero de proteínas de HA del virus de la gripe A humana y la proteína M2e de HA disuelta en solución amortiguadora a pH 6,0 se agregaron a la suspensión de nanovehículos resultante. La conjugación se dejó proceder a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución

amortiguadora de PBS, el conjugado nanovehículo-trímero de proteínas de HA/ proteína M2e se suspendió en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

De la misma forma, el conjugado de nanovehículo-virus de la anemia infecciosa del salmón se preparó mediante el uso del virus de la anemia infecciosa del salmón inactivado.

- 5 A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

**Ejemplo 17: Nanovehículos monovalentes con antígenos de la misma especie de agente infeccioso (Predicción)**

10 Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. El antígeno de hemaglutinina del sarampión (un fragmento recombinante que contiene las regiones inmunodominantes de la hemaglutinina del sarampión, aminoácidos 106 a 114 y 519 a 550) se disolvió en solución amortiguadora a pH 6,0 y después se agregó a la suspensión de nanovehículos resultante. La conjugación se dejó proceder a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, el conjugado de nanovehículo – hemaglutinina del sarampión resultante se suspendió en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

20 De la misma forma, el conjugado de nanovehículo-antígeno de fusión del sarampión se preparó mediante el uso de un fragmento de la proteína de fusión del sarampión (un fragmento recombinante que corresponde a los aminoácidos 399 a 525 de la proteína de fusión de gran tamaño del sarampión).

A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

25 **Ejemplo 18: Nanovehículos monovalentes con antígenos de especies diferentes de agente infeccioso (Predicción)**

Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. A continuación, el trímero de proteínas de HA del virus de la gripe A humana disuelto en solución amortiguadora a pH 6,0 se agregó a la suspensión de nanovehículos resultante. La conjugación se dejó proceder a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, el conjugado nanovehículo-trímero de proteínas de HA se suspendió en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4 para el análisis adicional.

35 El polisacárido de *Streptococcus pneumonia* (PnPs) 6B se seleccionó como un serotipo de PnPs representativo. El PnPs-6B nativo purificado (es decir, sin reducción de tamaño después de la purificación) se disolvió en NaCl 2M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/PnPs: 1,0 mg/mg). El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución de PnPs-6B activada resultante se agregó a los nanovehículos con grupos PEG-CONHNH<sub>2</sub> (PEG-hidrazida) de superficie preparados como se describe anteriormente en el ejemplo 13 en solución amortiguadora a pH 9. Los nanovehículos y la suspensión resultante se agitaron durante 1 hora con solución de glicina 2M. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, el conjugado de NC-PnPs-6B resultante se suspendió en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

45 A continuación los nanovehículos pueden combinarse para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

**Ejemplo 19: Nanovehículos monovalentes con antígenos de la misma cepa de agente infeccioso (Predicción)**

Los nanovehículos con PEG-X en su superficie se prepararon de la siguiente forma. Los nanovehículos PRINT monodispersos (PRINT NC) que comprenden PLGA-R848, PLA-PEG-X (donde X= ácido carboxílico (CO<sub>2</sub>H), amina (NH<sub>2</sub>), C<sub>6</sub>-azida (C<sub>6</sub>-N<sub>3</sub>) o PEG<sub>3</sub>-azida (PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>), hidrazida (CONHNH<sub>2</sub>), maleimida (MAL) y tiol (SH)) que contiene el péptido de ovoalbúmina se prepararon mediante el método de "Particle Replication in Non-wetting Templates" (PRINT) réplica de partículas en plantillas no humectantes como se describe en la bibliografía ((1) "Direct Fabrication and Harvesting of Monodisperse, Shape Specific Nano-Biomaterials"; Rolland, J. P.; Maynor, B. W.; Euliss, L. E.; Exner, A. E.; Denison, G. M.; DeSimone, J. M J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 10096; (2) "The Complex Role of Multivalency in Nanoparticles Targeting the Transferrin Receptor for Cancer Therapies" Jin Wang, Shaomin Tian, Robby A. Petros, Mary E. Napier y Joseph M. DeSimone; J. Am. Chem. Soc., 2010, 132 (32), págs. 11306–11313). Los PRINT-NC con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución

amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. La proteína A de superficie neumocócica (PspA) se disolvió en solución amortiguadora a pH 6,0 y a continuación se agregó a la suspensión de nanovehículos resultante. La conjugación se dejó proceder a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, el conjugado de NC-PsPA resultante se suspendió en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

El PnPs-6B nativo purificado se disolvió en NaCl 2 M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/PnPs: 1,0 mg/mg). El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución de PnPs-6B activada resultante se agregó a los nanovehículos PRINT con grupos PEG-CONHNH<sub>2</sub> (PEG-hidrazida) de superficie preparados como se describe anteriormente en solución amortiguadora a pH 9. Los nanovehículos y la suspensión de PnPs-6B resultantes se agitaron durante 1 hora y se inactivaron con solución de glicina 2M. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de NC-PnPs-6B resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

#### **Ejemplo 20: Nanovehículos monovalentes con antígenos de cepas diferentes de agente infeccioso (Predicción)**

El PnPs-6B nativo purificado se disolvió en NaCl 2 M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/PnPs: 1,0 mg/mg). El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución de PnPs-6B activada se agregó a los nanovehículos con grupos PEG-CONHNH<sub>2</sub> (PEG-hidrazida) de superficie preparados como se describe anteriormente en el ejemplo 13 en solución amortiguadora a pH 9. Los nanovehículos y la suspensión de PnPs-6B resultantes se agitaron durante 1 hora y se inactivaron con solución de glicina 2M. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de NC-PnPs-6B resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

El PnPs14 nativo purificado se disolvió en NaCl 2 M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/PnPs: 1,0 mg/mg). El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución de PnPs14 activada resultante se agregó a los nanovehículos PRINT con grupos PEG-CONHNH<sub>2</sub> (PEG-hidrazida) de superficie preparados como se describe anteriormente en solución amortiguadora a pH 9. Los nanovehículos PRINT y la suspensión de PnPs14 resultantes se agitaron durante 1 hora y se inactivaron con solución de glicina 2M. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de PRINT NC-PnPs14 resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

Los nanovehículos de oro con PEG-X de superficie (donde X= ácido carboxílico (CO<sub>2</sub>H), amina (NH<sub>2</sub>), azida (N<sub>3</sub>), hidrazida (CONHNH<sub>2</sub>) y aldehído (CHO)) se prepararon de la siguiente forma.

**Etapas 1. Formación de nanovehículos de oro (AuNC):** Una solución acuosa de 500 mL de HAuCl<sub>4</sub> 1 mM se calentó a reflujo durante 10 minutos con agitación vigorosa en un matraz de fondo redondo de 1 L equipado con un condensador. A continuación se agregó rápidamente una solución de 50 mL of 40 mM de citrato de trisodio a la solución en agitación. La solución de vino tinto intensa resultante se mantuvo a reflujo durante 25 a 30 minutos y se retiró el calor y la solución se enfrió a temperatura ambiente. La solución a continuación se filtró a través de un filtro de membrana de 0,8 µm para proporcionar la solución de AuNC. Los AuNC se caracterizan mediante el uso de espectroscopía visible y microscopía electrónica de transmisión. Los AuNC presentan un diámetro de aproximadamente 20 nm cubiertos por citrato con un pico de absorción a 520 nm.

**Etapas 2. AuNC funcionalizados con PEG-X mediante el uso de HS-PEG-X:** Los AuNC se funcionalizaron con HS-PEG-X (intervalo de peso molecular: 1500-5000) (donde X= ácido carboxílico (CO<sub>2</sub>H), amina (NH<sub>2</sub>), azida (N<sub>3</sub>), hidrazida (CONHNH<sub>2</sub>) y aldehído (CHO)) de la siguiente forma. Se agregó una solución de 150 µl de HS-PEG-X (10 µM en solución amortiguadora de carbonato 10 mM a pH 9,0) a 1 mL de nanovehículos de oro cubiertos con citrato con un diámetro de 20 nm (1,16 nM) para producir una proporción molar de tiol con respecto a oro de 2500:1. La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 1 hora para permitir el intercambio completo de tiol con citrato en los nanovehículos de oro. Los AuNC con PEG-X en su superficie a continuación se purificaron mediante centrifugación a 12.000g durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento que contenía AuNC-PEG-X se volvió a suspender en solución amortiguadora de PBS adecuada para la bioconjugación adicional con biomoléculas. El PnPs-19F nativo purificado se disolvió en NaCl 2 M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/PnPs: 1,0 mg/mg). El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución de PnPs-19F activada resultante se agregó a los AuNC con grupos PEG-CONHNH<sub>2</sub> (PEG-hidrazida) de superficie preparados como se describe anteriormente en solución amortiguadora a pH 9. Los AuNC y

la suspensión de PnPs-19F resultantes se agitaron durante 1 hora y se inactivaron con solución de glicina 2M. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados AuNC-PnPs-19F resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

5 A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

**Ejemplo 21: Nanovehículos monovalentes con el mismo antígeno pero diferente orientación (Predicción)**

10 os nanovehículos PRINT con análogo de nicotina de superficie unido a través de la posición 3' se prepararon a partir del copolímero PLA-PEG-3-HO-MeNic derivado de trans-3'-hidroximetilnicotina (3-HO-MeNic), PLGA-R848 y péptido de ovoalbúmina como se describe anteriormente. Los nanovehículos PRINT resultantes que contenían el análogo de nicotina de superficie sustituido en 3' se suspendieron en solución amortiguadora a pH 7,4.

De forma similar, los nanovehículos PRINT con análogo de nicotina de superficie unido a través de la posición 1' se prepararon a partir del copolímero PLA-PEG-1-butyl-Nic derivado de 1'-butil nicotina (1-butyl-Nic), PLGA-R848 y péptido de ovoalbúmina como se describe anteriormente. Los nanovehículos PRINT resultantes que contenían el análogo de nicotina de superficie sustituido en 1' se suspendieron en solución amortiguadora a pH 7,4.

15 A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

**Ejemplo 22: Nanovehículos monovalentes con el mismo antígeno pero diferente conformación (Predicción)**

20 Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. El epítipo lazo de hemaglutinina del virus del sarampión (HNE, H379-410, disulfuro intacto) disuelto en solución amortiguadora a pH 6,0 a continuación se agregó a la suspensión de nanovehículos resultante. La conjugación se dejó proceder a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de NC-HNE resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

25 El epítipo lazo de hemaglutinina altamente conservado (HNE, H379-410) del virus del sarampión contiene tres residuos de cisteína, dos de los cuales (Cys386 y Cys394) forman un puente de disulfuro. El péptido del HNE que contiene el puente de disulfuro se redujo mediante el uso de ditiotreitól (DTT) en solución amortiguadora de PBS para proporcionar un HNE reducido. Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. El HNE reducido disuelto en solución amortiguadora a pH 6,0 a continuación se agregó a la suspensión de nanovehículos resultante bajo argón en la presencia de DTT. La conjugación se dejó proceder a 4°C durante la noche bajo argón. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de NC-HNE reducido resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

40 A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

**Ejemplo 23: Nanovehículos monovalentes y bivalentes con antígenos de moléculas pequeñas de estructura diferente (Predicción)**

45 Los AuNC con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe anteriormente. A continuación los AuNC se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. La trans-3'-aminometilnicotina preparada a partir de ácido 4-cotininacarboxílico (solicitud de los Estados Unidos: US2007/0129551 A1) en solución amortiguadora a pH 6,0 se agregó a los AuNC activados. La conjugación se dejó proceder a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de AuNC-nicotina resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

55 Las partículas similares a virus (VLP) con grupos funcionales de superficie como azida o alquino para la química click de CuAAC se prepararon como se describe en la bibliografía ("Surface Functionalization of Virus-Like Particles by Direct Conjugation Using Azide-Alkyne Click Chemistry", Kedar G. Patel and James R. Swartz; Bioconjugate Chem., 2011, 22 (3), páginas 376–387). El análogo de cocaína que contenía un enlace alquino o azida y el análogo de metanfetamina que contenía un enlace alquino o azida se preparó de conformidad con los procedimientos de la bibliografía como epítopos de antígenos de células B de superficie. Una mezcla igual a nivel molar de análogo de

cocaína y análogo de metanfetamina con enlace azida se trató con VLP que contenían un grupo alquino de superficie en condiciones estándar de CuAAC para proporcionar conjugados de VLP-cocaína-metanfetamina.

A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

#### 5 **Ejemplo 24: Nanovehículos bivalentes con antígenos de oligosacáridos de diferente estructura (Predicción)**

El PnPs-6B purificado se redujo en tamaño con ácido diluido o mediante sonicación para proporcionar PnPs-6B oligomérico que se disolvió en NaCl 2 M. De forma similar, el PnPs-3 purificado se redujo en tamaño con ácido diluido o mediante sonicación para proporcionar PnPs-3 oligomérico que se disolvió en NaCl 2 M. La solución mezclada en una proporción molar igual de PnPs-6B oligomérico y PnPs-3 se preparó a partir de estas soluciones. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/PnPs: 1,5 mg/mg) a la solución de PnPs mezclado. El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución de PnPs-6B oligomérico/PnPs-3 activada resultante se agregó a los AuNC con grupos PEG-CONHNH<sub>2</sub> (PEG-hidrazida) de superficie preparados como se describe anteriormente en solución amortiguadora a pH 9. Los AuNC resultantes y la suspensión de PnPs-6B/PnPs-3 activada se agitaron durante 1 hora y se inactivaron con solución de glicina 2M. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de AuNC-PnPs-6B/3 resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

Las VLP que contenían grupos de ácido carboxílico (CO<sub>2</sub>H) en su superficie se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de las VLP activadas con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. El PnPs-4 purificado se redujo en tamaño con ácido diluido o mediante sonicación para proporcionar PnPs-4 oligomérico que se disolvió en NaCl 2 M. De forma similar, el PnPs-19F purificado se redujo en tamaño con ácido diluido o mediante sonicación para proporcionar PnPs-19F oligomérico que se disolvió en NaCl 2 M. La solución mezclada en una proporción molar igual de PnPs-4 y PnPs-19F se preparó a partir de estas soluciones. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/PnPs: 1,5 mg/mg) a la solución de PnPs mezclado. El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución del enlace de ácido adípico dihidrazida (ADH) en solución amortiguadora a pH 9 se agregó a la solución mezclada y activada de PnPs-4/19F. La solución resultante se mezcló durante 1 hora y se inactivó con una solución de glicina 2M y se purificó mediante diálisis. A continuación, el PnPs-4/19F oligomérico purificado con enlace ADH en solución amortiguadora a pH 6,0 se agregó a las VLP activadas en solución amortiguadora a pH 6,0 y la suspensión resultante se mezcló a 4°C durante la noche y se purificó mediante diálisis o lavado de los sedimentos para proporcionar conjugados de VLP-PnPs-4/19F para el análisis adicional.

A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

#### 35 **Ejemplo 25: Nanovehículos bivalentes con antígenos de polisacáridos de diferente estructura (Predicción)**

El PnPs-6B nativo purificado se disolvió en NaCl 2 M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/PnPs: 1,0 mg/mg). El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución del enlace de ácido adípico dihidrazida (ADH) en solución amortiguadora a pH 9 se agregó a la solución activada de PnPs-6B. La solución resultante se mezcló durante 1 hora y se purificó mediante diálisis. El PnPs-6B purificado con enlace de ADH se disolvió en solución amortiguadora a pH 6,0 para la conjugación del nanovehículo.

El polisacárido de *N. meningitidis meningococcal* purificado del serogrupo A (NmA) se disolvió en NaCl 1M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/ NmA: 1,5 mg/mg). El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución del enlace de ácido adípico dihidrazida (ADH) en solución amortiguadora a pH 9 se agregó a la solución activada de NmA. La solución resultante se mezcló durante 1 a 2 horas y se purificó mediante diálisis. El NmA purificado con enlace de ADH se disolvió en solución amortiguadora a pH 6,0 para la conjugación del nanovehículo.

Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. La solución mezclada en una proporción molar igual de PnPs-6B con enlace de ADH y NmA con enlace de ADH en solución amortiguadora a pH 6,0 se agregó a la solución activada de nanovehículos, y la suspensión resultante se mezcló a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de NC-PnPs6B/NmA resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

El PnPs-19F nativo purificado se disolvió en NaCl 2 M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/PnPs: 1,0 mg/mg). El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución del enlace de ácido adípico dihidrazida (ADH) en solución amortiguadora a pH 9 se agregó a la solución activada de PnPs-19F. La solución resultante se mezcló durante 1 hora y se purificó mediante diálisis. El PnPs-19F purificado con enlace de ADH se disolvió en solución amortiguadora a pH 6,0 para la conjugación del nanovehículo.

El polisacárido de *N. meningitidis meningococcal* purificado del serogrupo C (NmC) se disolvió en NaCl 1M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/ NmC: 1,5 mg/mg). El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución del enlace de ácido adípico dihidrazida (ADH) en solución amortiguadora a pH 9 se agregó a la solución activada de NmC. La solución resultante se mezcló durante 1 a 2 horas y se purificó mediante diálisis. El NmC purificado con enlace de ADH se disolvió en solución amortiguadora a pH 6,0 para la conjugación del nanovehículo.

Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. La solución mezclada en una proporción molar igual de PnPs-19F con enlace de ADH y NmC con enlace de ADH en solución amortiguadora a pH 6,0 se agregó a la solución activada de nanovehículos, y la suspensión resultante se mezcló a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de NC-PnPs-19F/NmC resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

#### **Ejemplo 26: Nanovehículos monovalentes y bivalentes con antígenos de moléculas pequeñas en diferentes orientaciones (Predicción)**

Los nanovehículos con PEG-CONHNH<sub>2</sub> (PEG-hidrazida) de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13 y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0 a 4°C. El análogo de cocaína GNC (ácido 6-(2R,3S)-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo [3.2.1] octano-2-carboniloxi-hexanoico) se preparó de conformidad con un procedimiento informado ("Cocaine Analog Coupled to Disrupted Adenovirus: A Vaccine Strategy to Evoke High-titer Immunity Against Addictive Drugs" Martin J Hicks, et al, Mol Ther 2011, 19: 612-619). Este compuesto se activó con EDC/NHS en DMF y el éster de GNC-NHS activado se aisló y purificó para la conjugación de los nanovehículos. Otro análogo de cocaína, A11 se preparó de conformidad con un procedimiento informado ("Positional linker effects in haptens for cocaine immunopharmacotherapy", Akira Ino, Tobin J. Dickerson, and Kim D. Janda; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 17 (2007) 4280–4283) y se activó con EDC/NHS como se indicó anteriormente. Una porción molar igual de cada análogo de cocaína activado en exceso al PEG-hidrazida de superficie del nanovehículo se mezcló con los nanovehículos en solución amortiguadora a pH 6,0. La suspensión resultante se mezcló a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de cocaína NC-GNC/A11 resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

La norcocaína se trató con anhídrido succínico para proporcionar cocaína que contenía enlace de ácido succínico y después se activó con EDC/NHS de conformidad con el procedimiento informado (Fox BS, Kantak KM, Edwards MA et al. Efficacy of a therapeutic cocaine vaccine in rodent models. Nat. Med. 2(10), 1129–1132 (1996). Los nanovehículos con PEG-CONHNH<sub>2</sub> (PEG-hidrazida) de superficie se prepararon como se describe anteriormente en el ejemplo 13 y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0 a 4°C. Las cantidades en exceso de análogo de cocaína activado, SNC, se agregaron a los nanovehículos. La suspensión resultante se mezcló a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de NC-SNC resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

#### **Ejemplo 27: Nanovehículos bivalentes y monovalentes con antígenos peptídicos con diferentes enlaces (Predicción)**

Los nanovehículos con PEG-azida (PEG-N<sub>3</sub>) de superficie se prepararon de conformidad con el ejemplo 13 y se suspendieron en solución amortiguadora desgasificada a pH 7 con argón. El péptido de ovoalbúmina (325-336) con un grupo amida de propargilo C Terminal (un grupo C-alquino) se preparó mediante síntesis de péptidos en fase sólida estándar y el péptido de ovoalbúmina (325-336)-C-alquino resultante se disolvió en solución amortiguadora a pH 7 bajo argón. El péptido de ovoalbúmina (325-336) con un grupo amina N terminal acilado con ácido 5-hexinoico (un grupo alquino N-terminal) se preparó mediante síntesis de péptidos en fase sólida estándar y el péptido de

5 ovoalbúmina (325-336)-N-alquino purificado resultante se disolvió en solución amortiguadora a pH 7 bajo argón. Los nanovehículos con PEG-N3 de superficie se mezclaron con una cantidad molar igual de cada péptido de ovoalbúmina C-alquino y N-alquino en solución amortiguadora a pH 7 bajo argón, y la suspensión resultante se sometió a la reacción click de CuAAC de conformidad con el protocolo informado (“Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation”, Hong V, Presolski SI, Ma C, Finn MG.; Angew Chem Int Ed, Inglaterra. 2009;48(52):9879-83). Los conjugados de nanovehículo-péptido de ovoalbúmina-unido por C/ péptido de ovoalbúmina-unido por N resultantes se purificaron mediante el lavado de sedimentos con solución amortiguadora a pH 7 y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 7.

10 Las partículas similares a virus (VLP) recombinantes se prepararon de conformidad con el procedimiento estándar. En particular, las VLP del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo se prepararon y conjugaron con el péptido de ovoalbúmina (323-339) mediante un enlace heterobifuncional como 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-SMCC) como lo describe Matthew Peacey, et al. ((1) Peacey M, Wilson S, Baird MA, Ward VK. “Versatile RHDV virus-like particles: incorporation of antigens by genetic modification and chemical conjugation” Biotechnol Bioeng; 2007; 98:968–77; (2) Peacey M, Wilson S, Perret R, Ronchese F, Ward VK, Young V, Young S, Baird, MA. “Virus-like particles from rabbit hemorrhagic disease virus can induce an anti-tumor response” Vaccine; 2008; 26:5334–5337). Los conjugados de VLP-péptido de ovoalbúmina se purificaron y suspendieron en solución amortiguadora a pH 7.

A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

20 **Ejemplo 28: Nanovehículos monovalentes con antígenos proteínicos unidos en diferentes puntos de unión en la proteína (activado contra marcador de proteínas) (Predicción)**

25 Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. La proteína hemaglutinina del sarampión (MHP) se disolvió en solución amortiguadora a pH 6,0 y a continuación se agregó a la suspensión de nanovehículos resultante. La conjugación se dejó proceder a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, el conjugado de NC-MHP resultante se suspendió en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

30 Los nanovehículos con el grupo PEG-NTA de superficie para la complejación del marcador Ni-His se prepararon como se describe en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se trataron con una solución de NiCl<sub>2</sub> en una solución amortiguadora de unión (sistema de solución amortiguadora de fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) para formar los nanovehículos con el complejo de NTA-Ni de superficie. Después del lavado de sedimentos con la solución amortiguadora de PBS, los nanovehículos resultantes se suspendieron en la solución amortiguadora de unión bajo argón. La solución de proteína hemaglutinina del sarampión recombinante marcada por His6 en la solución amortiguadora de unión se agregó a la suspensión de nanovehículos y la suspensión se incubó a 4°C durante la noche bajo argón. Los sedimentos de los conjugados de NC-NTA-His6-MHP se lavaron con solución amortiguadora a pH 7 y se suspendieron en solución amortiguadora de PBS.

40 A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

**Ejemplo 29: Nanovehículos monovalentes con antígenos de oligosacáridos unidos en puntos de unión diferentes (grupo hidroxilo activado contra enlace) (Predicción)**

45 Los nanovehículos con grupos PEG-CONHNH<sub>2</sub> (PEG-hidrazida) de superficie se prepararon como se describe en el ejemplo 13 y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 9 bajo argón. El PnPs-6B purificado se redujo en tamaño con ácido diluido o mediante sonicación para proporcionar PnPs-6B oligomérico que se disolvió en NaCl 2 M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/PnPs: 1,5 mg/mg) a la solución de PnPs-6B. El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución oligomérica de PnPs-6B activada se agregó a los nanovehículos con grupos PEG-CONHNH<sub>2</sub> (PEG-hidrazida) de superficie. Los nanovehículos resultantes y la suspensión de PnPs-6B activada se agitaron durante 1 hora y se inactivaron con solución de glicina 2M. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados NC-PnPs-6B resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

55 Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación se lavaron los sedimentos de los nanovehículos activados con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. El oligo PnPs-6B con un enlace de 3-aminopropil se preparó de conformidad con el método informado (“Synthetic 6B Di-, Tri-, and Tetrasaccharide-Protein Conjugates Contain Pneumococcal Type 6A and 6B Common



and 6B-Specific Epitopes That Elicit Protective Antibodies in Mice”, Jansen WTM, et al. Infect Immun. 2001; 69(2): 787–793). La PnPs-6B-3-propilamina oligomérica en solución amortiguadora a pH 6 se agregó a los nanovehículos activados. La suspensión resultante se mezcló a 4°C durante la noche bajo argón. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de NC-PnPs-6B se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

**Ejemplo 30: Nanovehículos monovalentes con antígenos de polisacáridos unidos en puntos de unión diferentes en el polisacárido (Predicción)**

El NmA se unió a los nanovehículos con múltiples puntos de unión a través de los grupos hidroxilo activados por CDAP. El polisacárido de *N. meningitidis meningococcal* purificado del serogrupo A (NmA) se disolvió en NaCl 1M. Se agregó una solución de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) en CH<sub>3</sub>CN (100 mg /mL) (proporción de CDAP/ NmA: 1,5 mg/mg). El pH de la solución resultante se ajustó a 9 con Et<sub>3</sub>N 0,2 M acuoso o solución de NaOH diluida. Después de 3 a 4 minutos, la solución del enlace de ácido adípico dihidrazida (ADH) en solución amortiguadora a pH 9 se agregó a la solución activada de NmA. La solución resultante se mezcló durante 1 a 2 horas y se purificó mediante diálisis. El NmA purificado con enlace de ADH se disolvió en solución amortiguadora a pH 6,0 para la conjugación del nanovehículo.

Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación los sedimentos de los nanovehículos activados se lavaron con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. Una solución de NmA con enlaces de ADH en solución amortiguadora a pH 6,0 se agregó a la solución de nanovehículos activada, y la suspensión resultante se mezcló a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de NC-NmA resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

El NmA se unió a los nanovehículos a través del grupo amino terminal. Los nanovehículos con grupos PEG-CO<sub>2</sub>H de superficie se prepararon como se describe en el ejemplo 13. A continuación los nanovehículos se activaron con el exceso de EDC/NHS en solución amortiguadora de PBS a pH 6 a 4°C durante 1 a 2 horas. A continuación los sedimentos de los nanovehículos activados se lavaron con solución amortiguadora a pH 6,0 para extraer el EDC/NHS sin reaccionar y se suspendieron en solución amortiguadora a pH 6,0. El NmA purificado se sometió a aminación reductiva con NH<sub>4</sub>Cl y cianoborohidruro de sodio (NaCNBH<sub>3</sub>) en solución amortiguadora a pH 7 para proporcionar el amino-NmA de conformidad con un procedimiento informado (“Development and phase 1 clinical testing of a conjugate vaccine against meningococcus A and C”, Costantino P, Viti S, Podda A, Velmonte MA, Nencioni L, Rappuoli R. Vaccine. 1992;10(10):691-8). A continuación el amino-NmA se agregó a la suspensión de nanovehículos activada y la suspensión resultante se mezcló a 4°C durante la noche. Después del lavado de sedimentos con solución amortiguadora de PBS, los conjugados de NC-NmA resultantes se suspendieron en solución amortiguadora de PBS a pH 7,4.

A continuación los nanovehículos se combinaron para formar una suspensión de nanovehículos para el análisis adicional.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Selecta Biosciences, Inc.  
<120> VACUNAS MULTIVALENTES DE NANOVEHÍCULOS SINTÉTICOS  
<130> S1681.70014WO00  
5 <150> US 61/348,713  
<151> 2010-05-26  
  
<150> US 61/348,717  
<151> 2010-05-26  
10 <150> US 61/348,728  
<151> 2010-05-26  
  
<150> US 61/358,635  
<151> 2010-06-25  
  
<160> 1  
<170> PatentIn versión 3.5  
15 <210> 1  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> G. gallus  
  
<400> 1  
20 Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly  
1 5 10 15  
Arg

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

una forma de dosificación que comprende:

una primera población de nanovehículos sintéticos poliméricos que comprende un primer conjunto de antígenos de superficie;

una segunda población de nanovehículos sintéticos poliméricos que comprende un segundo conjunto de antígenos de superficie; y

un excipiente farmacéuticamente aceptable;

donde la primera población de nanovehículos sintéticos y la segunda población de nanovehículos sintéticos se combinan en la forma de dosificación para formar una vacuna multivalente para la administración y donde el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie son estructural e inmunológicamente diferentes.

2. La composición de la reivindicación 1, donde la primera población de nanovehículos sintéticos y la segunda población de nanovehículos sintéticos cada una independientemente no comprende una superficie con grupos hidroxilo que activan complementos y tienen una dimensión mínima igual o menor que 100 nm.

3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el primer conjunto de antígenos de superficie comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más tipos de antígenos y/o el segundo conjunto de antígenos de superficie comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más tipos de antígenos.

4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el primer conjunto de antígenos de superficie comprende antígenos obtenidos o derivados de un primer género, especie o cepa infeccioso y el segundo conjunto de antígenos de superficie comprende antígenos obtenidos o derivados de un segundo género, especie o cepa infeccioso, donde opcionalmente el primer género, especie o cepa infeccioso y el segundo género, especie o cepa infeccioso, son iguales.

5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el primer conjunto de antígenos de superficie y/o el segundo conjunto de antígenos de superficie comprende los antígenos obtenidos o derivados de:

(a) un virus de la familia *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae*, *Flaviviridae*, *Retroviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Papillomaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae* o *Paroviridae*, que se obtienen o derivan opcionalmente de adenovirus, virus de Coxsackie, virus de hepatitis A, poliovirus, rinovirus, virus del herpes simple, virus varicela-zóster, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus humano, virus del herpes humano, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo occidental, VIH, virus de la gripe, virus del sarampión, virus de paperas, virus de la gripe, virus sincitial respiratoria, metaneumovirus humano, virus del papiloma humano, virus de la rabia, virus de la rubeola, bocavirus humano o parvovirus humano o B19, por ejemplo que se obtienen o derivan de VI, VII, E1A, E3-19K, 52K, VP1, antígeno de superficie, proteína 3A, proteína de la cápside, nucleocápside, proyección superficial, proteínas transmembranales, UL6, UL18, UL35, UL38, UL19, antígeno prematuro, antígeno de la cápside, Pp65, gB, p52, antígeno nuclear latente-1, NS3, proteína envolvente, dominio E2 de proteína envolvente, gp120, p24, lipopéptidos Gag (17-35), Gag (253-284), Nef (66-97), Nef (116-145), Pol (325-355), neuraminidasa, proteína de la nucleocápside, proteína de matriz, fosfoproteína, proteína de fusión, hemaglutinina, hemaglutinina-neuraminidasa, glicoproteína, E6, E7, lipoproteína envolvente o proteína no estructural (NS); y/o

(b) bacteria del género *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia* y *Chlamydomphila*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema* *Vibrio* o *Yersinia*, que se obtienen o derivan opcionalmente de *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomphila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae* o *Yersinia pestis*, por ejemplo que se obtienen o derivan de la toxina Pertussis (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina (PRN), fimbrias (FIM 2/3), VlsE; DbpA, OspA, Hia, PrpA, MltA, L7/L12, D15, 0187, VirJ, Mdh, AfuA, L7/L12, proteína de la membrana exterior, LPS, antígeno tipo A, antígeno tipo B, antígeno tipo C, antígeno tipo D, antígeno tipo E, FliC, FliD, Cwp84, alfa-toxina, teta-toxina, fructosa 1,6-bifosfato-aldolasa (FBA), gliceraldehidos-3-fosfato dehidrogenasa (GPD),

piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), factor de elongación-G (EF-G), proteína hipotética (HP), toxina T, antígeno toxoide, polisacárido capsular, proteína D, Mip, nucleoproteína (NP), RD1, PE35, PPE68, EsxA, EsxB, RD9, EsxV, Hsp70, lipopolisacárido, antígeno de superficie, Sp1, Sp2, Sp3, glicerofosfodiéster fosfodiesterasa, proteína de la membrana exterior, proteína Chaperone-Usher, proteína capsular (F1) o proteína V; y/o

5 (c) un hongo del género *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* o *Stachybotrys*, que se obtienen o derivan opcionalmente de *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus gattii*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis jirovecii* o *Stachybotrys chartarum*, por ejemplo que se obtienen o derivan de un antígeno de superficie, glicoproteína capsular, Yps3P, Hsp60, proteína principal de superficie, MsgC1, MsgC3, MsgC8, MsgC9 o SchS34.

6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además uno o más adyuvantes, opcionalmente donde la primera población de nanovehículos sintéticos y/o la segunda población de nanovehículos sintéticos comprende además un adyuvante acoplado a nanovehículos sintéticos.

7. La composición de la reivindicación 6, donde (a) los adyuvantes son diferentes; y/o (b) el adyuvante acoplado a la primera población de nanovehículos sintéticos y/o el adyuvante acoplado a la segunda población de nanovehículos sintéticos comprende un agonista TLR-2, -3, -4, -7, -8 o -9; y/o (c) el adyuvante acoplado a la primera población de nanovehículos sintéticos y/o el adyuvante acoplado a la segunda población de nanovehículos sintéticos comprende un ácido nucleico inmunoestimulador, imidazoquinolina, oxoadenina, MPL, imiquimod o resiquimod; y/o (d) la composición comprende uno o más adyuvantes mezclados, opcionalmente donde el adyuvante mezclado es un ácido nucleico inmunoestimulador que comprende CpG, AS01, AS02, AS04, AS15, QS-21, una saponina, alumbre o MPL; y/o (e) cada uno de los uno o más adyuvantes comprende una sal mineral, alumbre, alumbre combinado con monofosforil lípido (MPL) A de Enterobacteria, MPL® (AS04), AS15, una saponina, QS-21, Quil-A, ISCOMs, ISCOMATRIX™, MF59™, Montanide® ISA 51, Montanide® ISA 720, AS02, un liposoma o formulación liposomal, AS01, AS15, micropartículas y microvehículos sintetizados o preparados específicamente, vesículas fuera de la membrana derivadas de bacterias de *N. gonorrhoeae* o *Chlamydia trachomatis*, partículas de quitosano, un agente formador de depósitos, copolímeros bloqueadores Pluronic®, péptidos modificados o preparados específicamente, muramil dipéptido, un aminoalquil glucosaminida 4-fosfato, RC529, un toxoide bacteriano, un fragmento de toxina, un agonista de los receptores tipo Toll 2, 3, 4, 5, 7, 8 o 9, un derivado de adenina, un ADN inmunoestimulador, un ARN inmunoestimulador, una amina imidazoquinolina, una amina imidazopiridina, una amina cicloalquilimidazopiridina fusionada en 6,7, una amina imidazoquinolina puenteada en 1,2, imiquimod, resiquimod, un agonista para la molécula de superficie CD40, un interferón tipo I, poli I:C, un lipopolisacárido bacteriano (LPS), VSV-G, HMGB-1, flagelina o sus porciones o derivados, una molécula de ADN inmunoestimuladora que comprende CpG, estímulos proinflamatorios liberados por las células necróticas, cristales de urato, un componente activado de la cascada complementaria, un componente activado de los complejos inmunes, un agonista del receptor complementario, una citocina, o un agonista del receptor de citocina.

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la primera y segunda población de nanovehículos sintéticos se encuentran presentes en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmune al primer conjunto de antígenos de superficie y al segundo conjunto de antígenos de superficie en el individuo, opcionalmente donde la respuesta inmune es la generación de valores de anticuerpos específicos para el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie.

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una o más poblaciones adicionales de nanovehículos sintéticos, donde cada población adicional de nanovehículo sintético comprende un conjunto de antígenos de superficie estructural o inmunológicamente diferentes de los otros conjuntos de antígenos de superficie en la composición, opcionalmente donde al menos una de las una o más poblaciones adicionales de nanovehículos sintéticos comprende además un adyuvante acoplado a estas, por ejemplo donde el adyuvante acoplado a la al menos una o más poblaciones adicionales de nanovehículos sintéticos es diferente a los otros adyuvantes en la composición.

10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde cada conjunto de antígenos de superficie es un conjunto monovalente u oligovalente de antígenos de superficie.

11. La composición de las reivindicaciones 9 o 10, donde las poblaciones de nanovehículos sintéticos se encuentran presentes en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmune a cada conjunto de antígenos de superficie, donde la respuesta inmune es opcionalmente la generación de valores de anticuerpos específicos para cada conjunto de antígenos de superficie.

12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la primera y/o segunda población de nanovehículos sintéticos comprende además un antígeno de linfocitos T universales acoplado, opcionalmente mediante encapsulación, a estas, donde el antígeno de linfocitos T universales opcionalmente comprende antígeno de linfocitos T colaboradores, por ejemplo que comprende un péptido obtenido o derivado de ovoalbúmina, p. ej. que comprende la secuencia como se expresa en la SEQ ID NO: 1.

13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie son estructural e inmunológicamente diferentes y el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie comprenden antígenos obtenidos o derivados de una sustancia adictiva o de abuso, opcionalmente cocaína o nicotina.
- 5 14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde: (a) el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie comprenden los mismos antígenos, y donde al menos uno de los mismos antígenos en el primer conjunto de antígenos de superficie se presenta en una orientación diferente que la presentada en el segundo conjunto de antígenos de superficie; o (b) el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie comprenden los mismos antígenos, y donde al menos uno de los mismos antígenos en el primer conjunto de antígenos de superficie se presenta en una conformación diferente que la presentada en el segundo conjunto de antígenos de superficie; o (c) la estructura molecular del primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie son diferentes.
- 10 15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde: (a) el primer conjunto de antígenos de superficie comprende antígenos de superficie que comprenden péptidos, proteínas, oligosacáridos y/o polisacáridos; y/o (b) el segundo conjunto de antígenos de superficie comprende antígenos de superficie que comprenden péptidos, proteínas, oligosacáridos y/o polisacáridos; y/o (c) al menos un antígeno de superficie del primer conjunto de antígenos de superficie y/o al menos un antígeno de superficie del segundo conjunto de antígenos de superficie tiene un peso molecular menor que 10 000 kDa.
- 15 16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende un conservante, una solución amortiguadora, una solución salina, una solución salina tamponada con fosfato, un colorante o un estabilizador.
- 20 17. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los nanovehículos sintéticos de cada una de las poblaciones de nanovehículos sintéticos comprenden dendrímeros, partículas similares a virus, partículas a base de péptidos o proteínas, nanopartículas de nanopartículas poliméricas lipídicas, nanopartículas esféricas, nanopartículas cuboidales, nanopartículas piramidales, nanopartículas oblongas, nanopartículas cilíndricas o nanopartículas toroidales.
- 25 18. La composición de la reivindicación 17, donde cada una de las poblaciones de nanovehículos sintéticos comprende uno o más polímeros, donde: (a) los uno o más polímeros comprenden un poliéster; y/o (b) el uno o más polímeros comprenden o comprenden además un poliéster acoplado a un polímero hidrófilo, por ejemplo donde el poliéster comprende un ácido poliláctico, un ácido poliglicólico, un ácido poliláctico coglicólico o policaprolactona y/o el polímero hidrófilo comprende un poliéter (p.ej. que comprende polietilenglicol).
- 30 19. La composición de la reivindicación 1 donde el primer y el segundo conjunto de antígenos de superficie cada uno comprende antígenos de superficie monovalentes.
- 35 20. La composición de la reivindicación 1 donde el primer y el segundo conjunto de antígenos de superficie cada uno comprende antígenos de superficie oligovalentes.
21. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en terapia o profilaxis, por ejemplo, para su uso en un método: (a) para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa o infección; (b) tratar o prevenir un cáncer; y/o (c) tratar o prevenir una adicción a una sustancia adictiva o de abuso.
- 40 22. Un proceso para producir una forma de dosificación de la reivindicación 1, comprendiendo el proceso, preparar una primera población de nanovehículos sintéticos que comprende un primer conjunto de antígenos de superficie;
- preparar una segunda población de nanovehículos sintéticos que comprende un segundo conjunto de antígenos de superficie; y
- combinar la primera y la segunda población de nanovehículos sintéticos en una forma de dosificación;
- 45 donde el primer conjunto de antígenos de superficie y el segundo conjunto de antígenos de superficie son estructural e inmunológicamente diferentes.

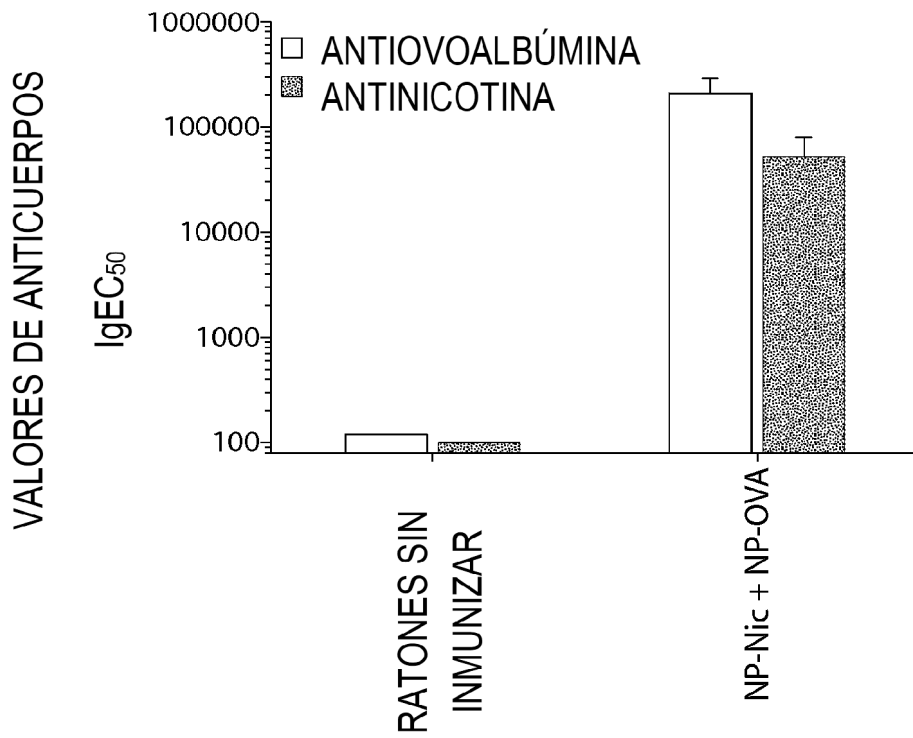


Fig. 1

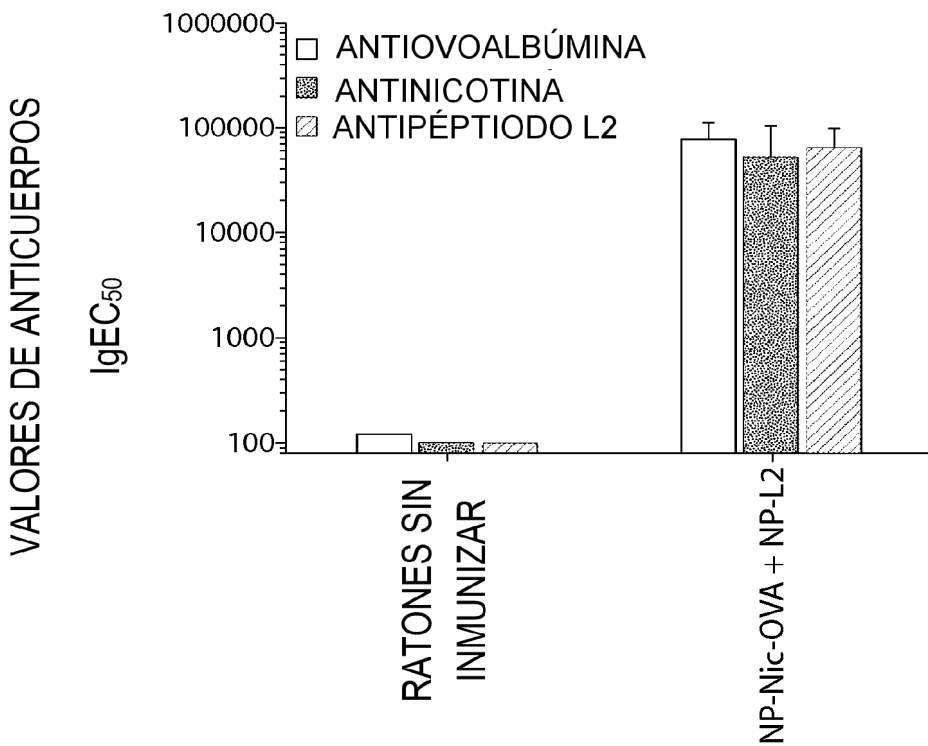


Fig. 2

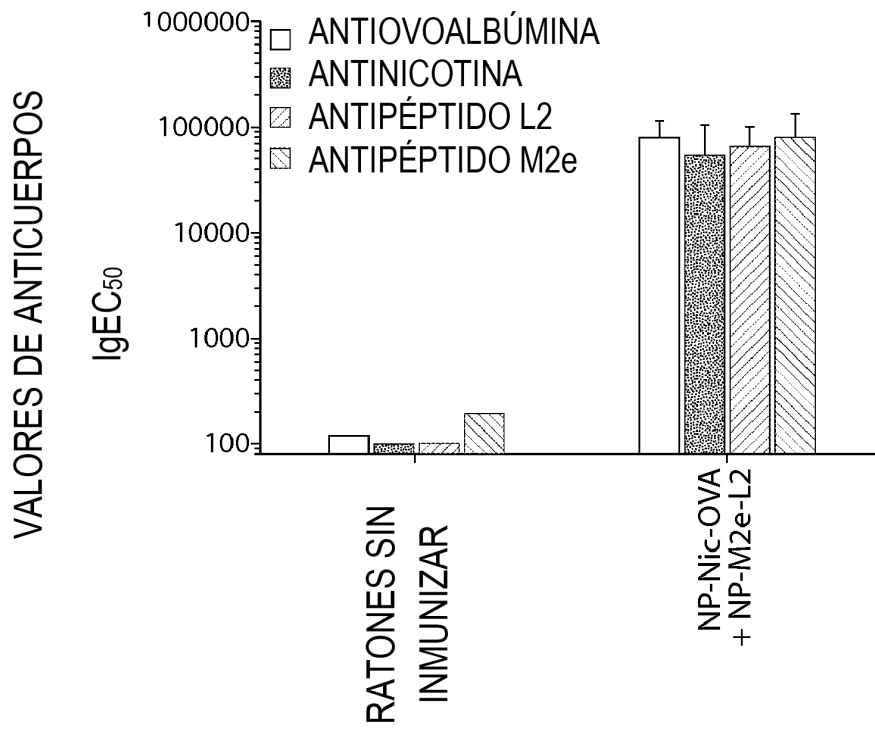


Fig. 3

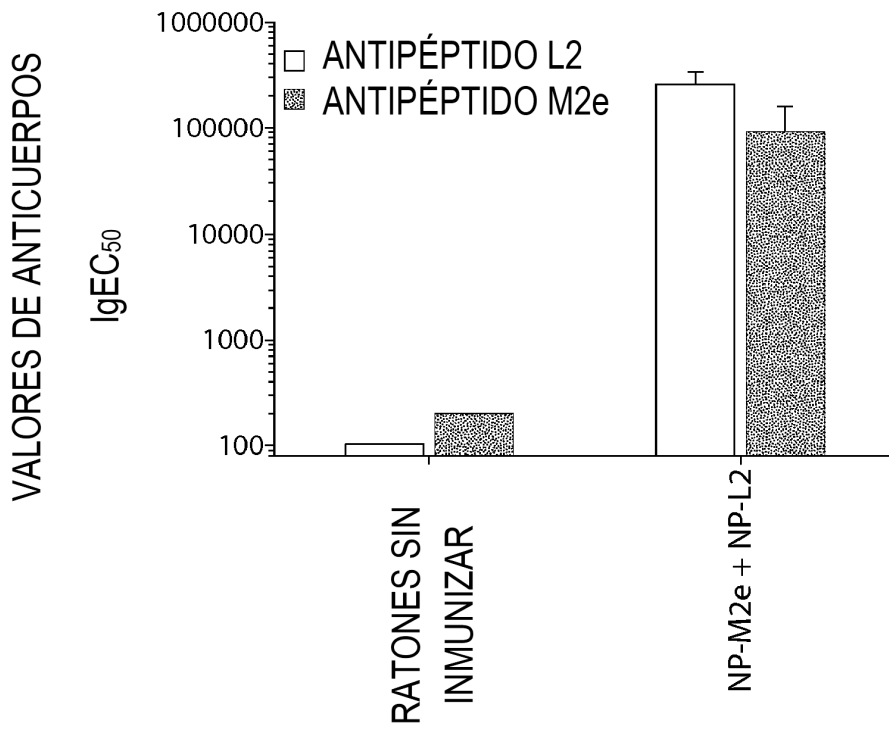


Fig. 4

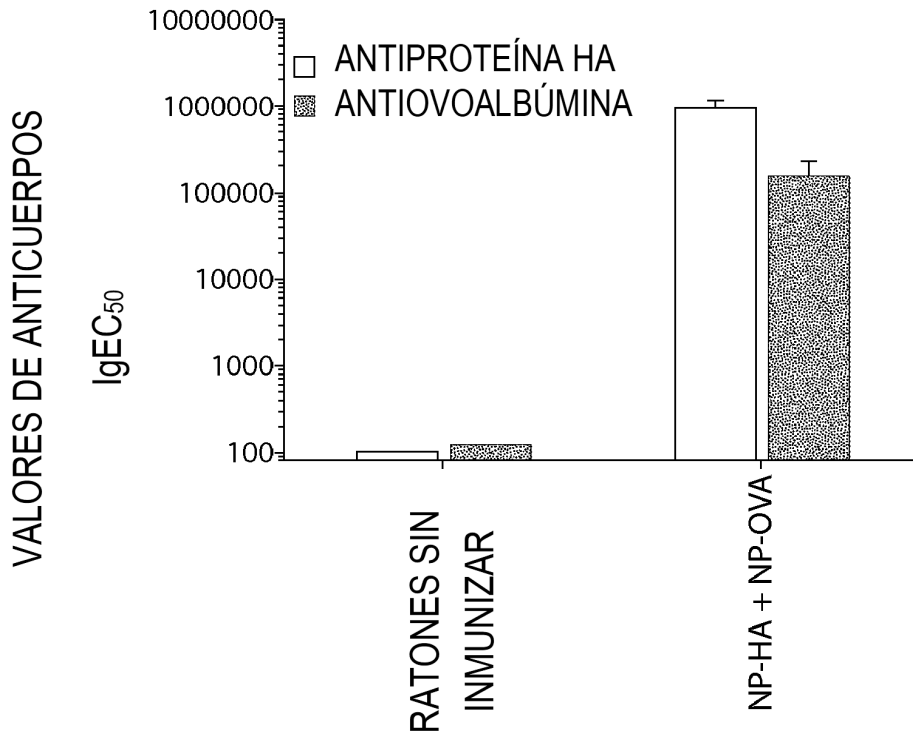


Fig. 5

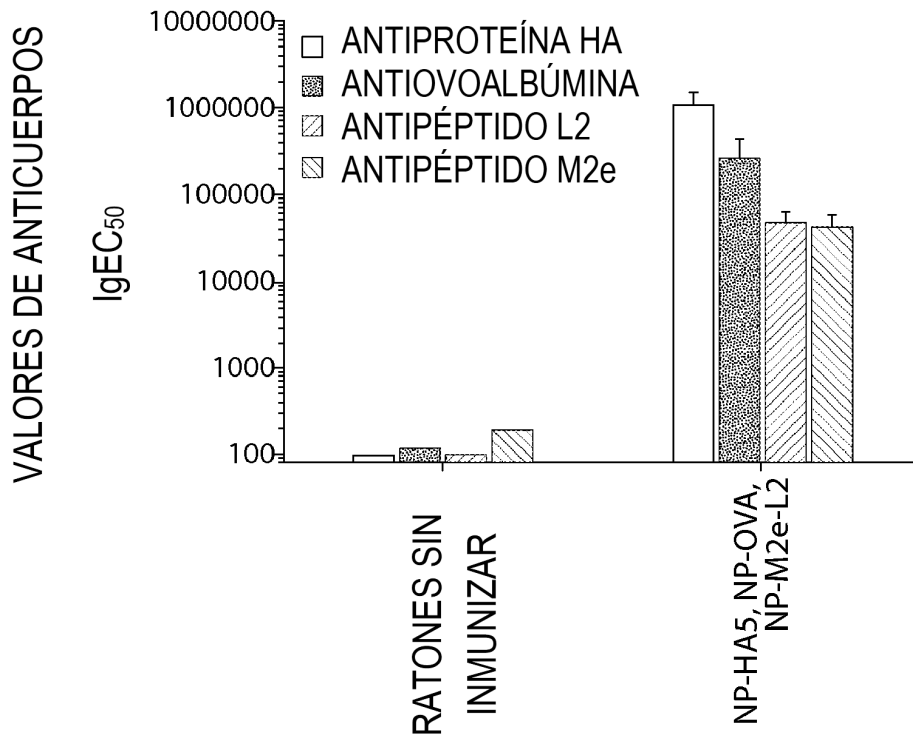


Fig. 6



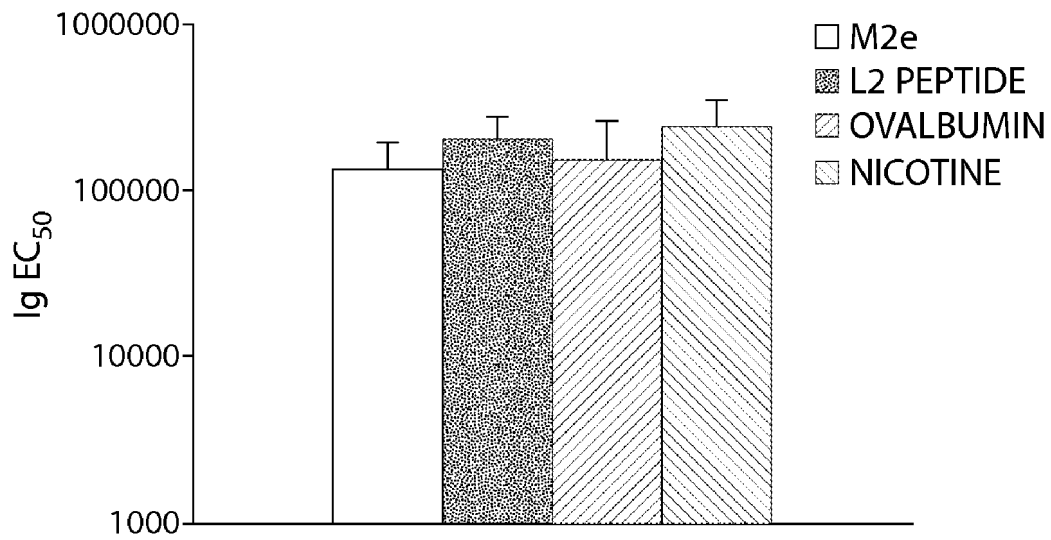


Fig. 7

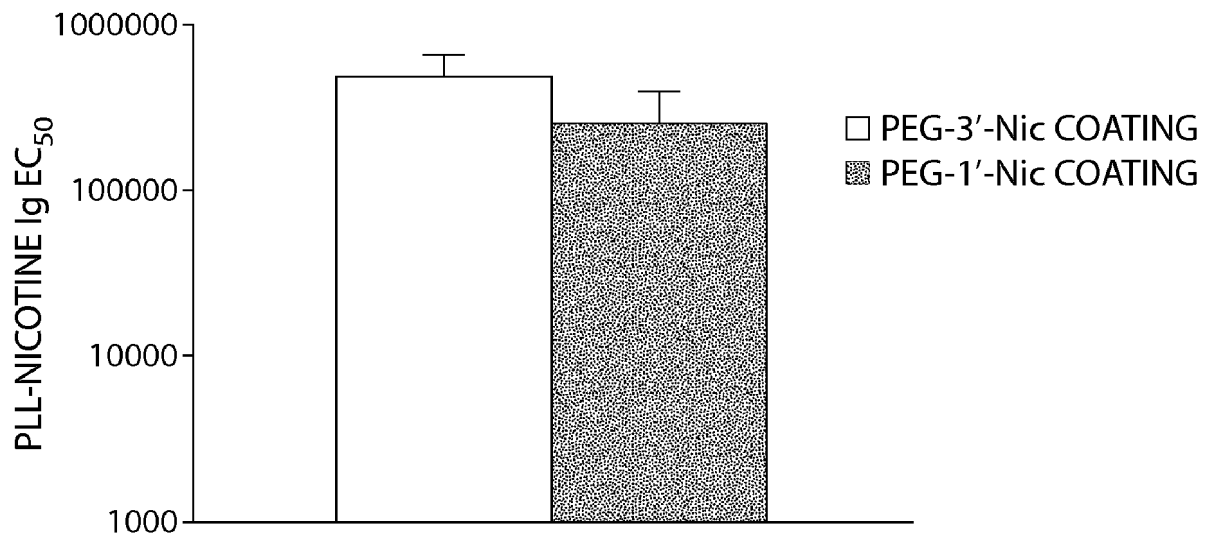


Fig. 8