

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 993**

51 Int. Cl.:

A61K 39/155 (2006.01)
C07K 17/06 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C07K 17/14 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 47/69 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2011 PCT/US2011/043136**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12006395**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2011 E 11731610 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2590675**

54 Título: **Composiciones antigénicas y métodos para el virus respiratorio sincicial**

30 Prioridad:

07.07.2010 US 362029 P
13.05.2011 US 201161485669 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

POWELL, THOMAS, J. y
BOYD, JAMES, GORHAM

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 688 993 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones antigénicas y métodos para el virus respiratorio sincicial

5 Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a composiciones y métodos para la prevención de la infección por el virus respiratorio sincicial, específicamente composiciones de película multicapa que contienen epítomos antigénicos de la proteína M2 de RSV y la proteína G de RSV.

10

Antecedentes

El virus respiratorio sincicial (RSV, forma siglada del inglés *respiratory syncytial virus*) es la causa más importante de las enfermedades graves de las vías respiratorias bajas en bebés y niños pequeños en todo el mundo, y también es una amenaza para los ancianos y los pacientes inmunocomprometidos. En Estados Unidos, las infecciones por RSV dan como resultado hasta 126.000 hospitalizaciones de bebés y hasta 60.000 hospitalizaciones de adultos ancianos por año. Dado que la infección natural por RSV no induce una inmunidad duradera a largo plazo, los pacientes son susceptibles a la reinfección con las mismas y distintas cepas de virus durante toda la vida. El RSV se asocia con infecciones secundarias tales como la otitis media y puede predisponer a los niños pequeños a enfermedades relacionadas con el asma más adelante en la vida.

15

20

Murata, Y., 2009, *Clinical Laboratory Medicine*, Vol. 29(4), 725-739, proporcionan una revisión del desarrollo de la vacuna frente al virus respiratorio sincicial.

25

Después de más de 40 años de esfuerzo, no existe una vacuna segura y eficaz frente al RSV. De hecho, los primeros intentos de desarrollar una vacuna para el RSV precipitada con alumbre e inactivada con formol (RSV-IF) en la década de 1960 parecían predisponer a los niños vacunados a una enfermedad más grave e incluso a la muerte durante una infección natural posterior. El mecanismo exacto de esta respuesta no se ha caracterizado completamente, pero parece depender de un sesgo de la respuesta inmunitaria hacia un fenotipo inflamatorio Th2 dominante caracterizado por la activación inadecuada de las rutas de citocinas y quimiocinas.

30

Dado el impacto económico de la enfermedad provocada por el RSV, estimado en casi 594,8 millones de € (700 millones de USD) por año en los EE. UU. en 2004, y las complicaciones potencialmente mortales que pueden ser el resultado de la infección por RSV en bebés, ancianos y pacientes inmunodeprimidos, el desarrollo de vacunas seguras y eficaces para el RSV es una prioridad alta.

35

Existe una necesidad de composiciones antigénicas mejoradas adecuadas para la estimulación de una respuesta inmunitaria frente al RSV.

40

Sumario

En un aspecto, la invención proporciona una película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca, en donde dicha película multicapa comprende un epítomo de la proteína M2 de RSV y un epítomo de la proteína G de RSV, consistiendo dichos epítomos en 3 a 120 aminoácidos, como parte de uno o más polipéptidos diseñados, en donde un polipéptido diseñado es un polipéptido que consiste en una o más regiones de absorción a superficie cargadas de al menos 8 aminoácidos unidos covalentemente al epítomo de la proteína M2 de RSV, el epítomo de la proteína G de RSV, o ambos, que tienen carga suficiente para la unión estable a una superficie cargada de forma opuesta, y en donde el polipéptido diseñado y las una o más regiones de absorción a superficie cargadas en el mismo están cargadas de forma positiva o cargadas de forma negativa, en donde dicha película multicapa comprende dos o más capas de polielectrolitos, en donde las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de forma opuesta, en donde al menos un polielectrolito de la película multicapa es dicho uno o más polipéptidos diseñados y en donde un polielectrolito que no es un polipéptido diseñado comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular de más de 1.000 y al menos 5 cargas por molécula.

50

55

Además se describe en el presente documento una composición que comprende un primer epítomo polipeptídico del RSV y un segundo epítomo polipeptídico del RSV, en donde los primero y segundo epítomos polipeptídicos están unidos covalentemente a uno o más polielectrolitos, en donde los uno o más polielectrolitos están en una o más películas multicapa, en donde las una o más películas multicapa comprenden dos o más capas de polielectrolitos, en donde las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de forma opuesta, y en donde el polielectrolito comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular de más de 1.000 y al menos 5 cargas por molécula, y en donde el primer epítomo polipeptídico del RSV y el segundo epítomo polipeptídico del RSV están presentes en la misma película multicapa o en una distinta.

60

65

Además se describe en el presente documento una composición que comprende un primer epítipo polipeptídico del RSV y un segundo epítipo polipeptídico del RSV, en donde los primero y segundo epítipos polipeptídicos están en forma de una o más películas multicapa, en donde las una o más películas multicapa comprenden dos o más capas de polielectrolitos, en donde las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de forma opuesta, y donde al menos un polielectrolito de la película multicapa comprende un polipéptido diseñado, en donde el polipéptido diseñado tiene carga suficiente para una unión estable a una superficie cargada de forma opuesta, y en donde el polipéptido diseñado comprende el primer epítipo polipeptídico de RSV, el segundo epítipo polipeptídico de RSV, o ambos, en donde un polielectrolito que no es un polipéptido diseñado comprende un material policationico o un material polianiónico que tiene un peso molecular de más de 1.000 y al menos 5 cargas por molécula, y en donde el primer epítipo polipeptídico del RSV y el segundo epítipo polipeptídico del RSV están presentes en la misma película multicapa o en una distinta.

Además se describe en el presente documento una composición que comprende un epítipo polipeptídico de G de RSV unido covalentemente a uno o más polielectrolitos, en donde los uno o más polielectrolitos están en una o más películas multicapa, en donde las una o más películas multicapa comprenden dos o más capas de polielectrolitos, en donde las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de forma opuesta, y en donde el polielectrolito comprende un material policationico o un material polianiónico que tiene un peso molecular de más de 1.000 y al menos 5 cargas por molécula.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Espectro de masas de FT-ICR expandido para el estado de carga de MH_6^{+6} de ACT-2044 intacto (SEQ ID NO: 8). M/z monoisotópica esperada para el péptido completamente oxidado = 1015,43, encontrada = 1015,6008. Este resultado es totalmente congruente con dos disulfuros intramoleculares en ACT-2044.

Figura 2: Espectro de masas FT-ICR para ACT-2086 (SEQ ID NO: 13). El pico monoisotópico MH_9^{+9} tiene una m/z de 867,1571, que corresponde a una masa monoisotópica de 7795,344 amu, lo que está muy cerca de la masa monoisotópica calculada de 7795,33 amu. Este resultado es totalmente congruente con la presencia de dos enlaces disulfuro en ACT-2086.

Figura 3: Potencial de superficie (zeta) de las nanopartículas medido después de cada etapa de la formación de capas por ELBL. Las partículas no recubiertas (EP) tienen un valor zeta positivo. El recubrimiento con una única capa de PGA imparte un valor zeta negativo. Las etapas posteriores de formación de capas con el péptido diseñado ACT-2031, los polipéptidos PGA y PLL, o el péptido diseñado ACT-2044 provocan cambios positivos o negativos alternos en el potencial zeta, lo que indica etapas del ECPC satisfactorias.

Figura 4: Inmunización de ratones BALB/c tres veces con nanopartículas de ACT-1042 (SEQ ID NO: 8; G de RSV₁₆₄₋₁₉₁) a través de inyección en la almohadilla plantar; se recogieron los sueros y analizaron por ELISA. Los sueros reconocieron el péptido epitópico conformacional CX3C de G de RSV ACT-2044 (SEQ ID NO: 8).

Figura 5: Inmunización de ratones BALB/c tres veces con nanopartículas de ACT-1042 (SEQ ID NO: 8; G de RSV₁₆₄₋₁₉₁) a través de inyección en la almohadilla plantar; se recogieron los sueros y analizaron por ELISA. Los sueros no reconocieron una versión del mismo péptido (ACT-2054; SEQ ID NO: 9) que se linealizó protegiendo los restos de cisteína.

Figura 6: Inmunización de ratones BALB/c tres veces con nanopartículas de ACT-1042 (SEQ ID NO: 8; G de RSV₁₆₄₋₁₉₁) a través de inyección en la almohadilla plantar; se recogieron los sueros y analizaron por ELISA. Los sueros reconocieron también la proteína G de RSV nativa.

Figura 7: Inmunización de ratones BALB/c tres veces con nanopartículas de ACT-1042 (SEQ ID NO: 8; G de RSV₁₆₄₋₁₉₁) a través de inyección en la almohadilla plantar; se recogieron los sueros y analizaron en un ensayo de unión bioquímico que mide la inhibición de la unión de G de RSV al receptor de quimiocina CX3CR1. La actividad biológica de la respuesta de anticuerpos suscitada por ACT-1042 se confirmó mediante la inhibición de la unión de G de RSV al receptor de quimiocinas.

Figura 8: Inmunización de ratones BALB/c tres veces con nanopartículas de ACT-1042 (SEQ ID NO: 8; G de RSV₁₆₄₋₁₉₁) a través de inyección en la almohadilla plantar; se recogieron los sueros y se analizaron en un ensayo de migración celular. La actividad biológica de la respuesta de anticuerpos suscitada por ACT-1042 se confirmó mediante la inhibición de la migración de CMSP humanas hacia G de RSV purificada.

Figura 9: Respuestas de linfocitos T específicos para M2 de RSV después de la inmunización con ACT-1023 (SEQ ID NO: 12; M2 de RSV₈₁₋₉₈) a través de administración s.c., i.p., i.n. y en la almohadilla plantar. Se recogieron esplenocitos de los ratones el día 14 posinmunización y se reestimularon en placas de ELISPOT de IL-4 o IFN γ con ACT-2019 (SEQ ID NO: 7), el péptido de M2 de RSV. Los resultados reflejan el número de linfocitos T específicos de antígeno/ 10^6 células en animales individuales sin tratamiento previo o inmunizados.

Figura 10: Inmunogenicidad de una vacuna multivalente de un cóctel de nanopartículas de RSV. Se inmunizaron ratones BALB/c (5/grupo, 5-6 semanas de edad) en los días 0 y 21. Respuestas de anticuerpos frente a G de RSV: Se recogieron sueros el día 28 y se midieron los títulos de anticuerpos IgG específicos para G de RSV mediante ELISA. Los datos se representan como la media \pm DT de 5 ratones por grupo.

Figura 11: Inmunogenicidad de una vacuna multivalente de un cóctel de nanopartículas de RSV. Se inmunizaron ratones BALB/c (5/grupo, 5-6 semanas de edad) en los días 0 y 21. Respuestas de linfocitos T frente a M2 de RSV: Se recogieron células de bazo el día 28 y se reestimularon con el péptido de M2 de RSV (ACT-2031; SEQ

ID NO: 12) en placas ELISPOT de IFN γ o IL-4. Los datos se representan como la media \pm DT de 5 ratones por grupo.

Figura 12: Inducción de actividad CTL *in vivo* mediante inmunización con nanopartículas de RSV. Se inmunizaron ratones BALB/c como se muestra y se expusieron 7 días después por inyección i.v. de células de bazo singénicas pulsadas con ACT-2031 (M2 de RSV; SEQ ID NO: 12) y marcadas con una dosis alta de indicador fluorescente CFSE (picos azules) mezcladas con células de bazo singénicas marcadas con una dosis baja de CFSE y sin péptido diana (picos rojos). Al día siguiente, se analizaron los bazos de los ratones inmunizados por citometría de flujo para detectar la supervivencia de las células diana donantes marcadas de forma diferencial. Cada histograma muestra los resultados de un único ratón inmunizado del grupo de tratamiento.

Figura 13: Inducción de actividad CTL *in vivo* mediante inmunización con nanopartículas de RSV. Los resultados muestran el porcentaje de destrucción específica de células diana marcadas con M2 de RSV de la Figura 12, calculado comparando el número relativo de células en cada pico dentro de un histograma.

Las Figuras 14 y 15 muestran la respuesta de anticuerpos después de la sensibilización (14) y el refuerzo (15), tras la inmunización con partículas de RSV usando construcciones de un único epítipo y de múltiples epítipos.

La Figura 16 es un gráfico de barras de los resultados mostrados en las Figuras 14 y 15.

La Figura 17 muestra los resultados de una exposición a RSV vivo de ratones inmunizados con nanopartículas de RSV que contienen G de RSV, M2 de RSV o una combinación. Los datos se muestran como un ensayo de placas y un ensayo de qPCR.

Figura 18: Inducción de actividad CTL *in vivo* mediante inmunización con nanopartículas de RSV. Se inmunizaron ratones BALB/c como se muestra y se expusieron 7 días después por inyección i.v. de células de bazo singénicas pulsadas con ACT-2031 (M2 de RSV; SEQ ID NO: 12) y marcadas con una dosis alta de indicador fluorescente CFSE (picos azules) mezcladas con células de bazo singénicas marcadas con una dosis baja de CFSE y sin péptido diana (picos rojos). Al día siguiente, se analizaron los bazos de los ratones inmunizados por citometría de flujo para detectar la supervivencia de las células diana donantes marcadas de forma diferencial. Cada histograma muestra los resultados de un único ratón inmunizado del grupo de tratamiento.

Figura 19: Inducción de actividad CTL *in vivo* mediante inmunización con nanopartículas de RSV. Los resultados muestran el porcentaje de destrucción específica de células diana marcadas con M2 de RSV en la Figura 18, calculado comparando el número relativo de células en cada pico dentro de un histograma.

Figuras 20 y 21: Respuestas de anticuerpos específicos para G de RSV. Se inmunizaron ratones BALB/c en los días 0 y 21. Se midieron por ELISA los títulos de anticuerpos IgG específicos para G de RSV en los sueros posrefuerzo. (20) valores de DO de sueros individuales a dilución 1:50. cóctel = ACT-1023 + 1042. Las barras horizontales representan el promedio de los valores individuales dentro de un grupo. (21) Promedio de 5 sueros por grupo en titulaciones en serie.

Los expertos en la materia apreciarán y comprenderán las características descritas anteriormente y otras a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones adjuntas.

40 Descripción detallada

En el presente documento se divulgan películas multicapa que comprenden epítipos polipeptídicos de RSV, en donde las películas multicapa tienen la capacidad de suscitar en un hospedador una respuesta inmunitaria tras la administración al hospedador. Las películas multicapa comprenden dos epítipos polipeptídicos de RSV, específicamente un epítipo que suscita una respuesta de linfocitos T específica, tal como una respuesta de linfocitos T citotóxicos, y un epítipo que suscita una respuesta de anticuerpos específica. Los inventores han demostrado inesperadamente en el presente documento que combinando un epítipo que suscita una respuesta de linfocitos T específica y un epítipo que suscita una respuesta de anticuerpos específica, la potencia inmunitaria, medida como la respuesta de linfocitos T, se mejora inesperadamente en comparación con la administración de solo un componente. Específicamente, una combinación de epítipos de G de RSV (respuesta de anticuerpos específica) y de M2 de RSV (respuesta de linfocitos T específica) en forma de una o más películas multicapa, suscita una respuesta de linfocitos T sustancialmente mejorada en comparación con una película multicapa que contiene un epítipo de M2 de RSV solo.

En un primer aspecto la invención proporciona una película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca, en donde dicha película multicapa comprende un epítipo de la proteína M2 de RSV y un epítipo de la proteína G de RSV, consistiendo dichos epítipos en 3 a 120 aminoácidos, como parte de uno o más polipéptidos diseñados, en donde un polipéptido diseñado es un polipéptido que consiste en una o más regiones de absorción a superficie cargadas de al menos 8 aminoácidos unidos covalentemente al epítipo de la proteína M2 de RSV, el epítipo de la proteína G de RSV, o ambos, que tienen carga suficiente para la unión estable a una superficie cargada de forma opuesta, y en donde el polipéptido diseñado y las una o más regiones de absorción a superficie cargadas en el mismo están cargadas de forma positiva o cargadas de forma negativa, en donde dicha película multicapa comprende dos o más capas de polielectrolitos, en donde las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de forma opuesta,

en donde al menos un polielectrolito de la película multicapa es dicho uno o más polipéptidos diseñados y en donde un polielectrolito que no es un polipéptido diseñado comprende un material policationico o un material polianiónico que tiene un peso molecular de más de 1.000 y al menos 5 cargas por molécula.

- 5 Los primero y segundo epítomos polipeptídicos de RSV pueden estar presentes en el mismo polipéptido diseñado o en un distinto. En una realización, los primero y segundo epítomos polipeptídicos de RSV están presentes en el mismo polipéptido diseñado. En otra realización, los primero y segundo polipéptidos de RSV están presentes en distintos polipéptidos diseñados, pero están depositados en capas dentro de la misma película multicapa.
- 10 La proteína G de RSV (unión) se ha asociado con muchas aberraciones que incluyen la expresión alterada de ARNm de las citoquinas CC y CXC y respuestas de citocinas Th2 que parecen sustentar resultados inmunitarios inadecuados y una enfermedad potenciada. La región central rica en cisteínas conservada de la proteína G de RSV contiene un motivo de quimiocina CX3C en las posiciones de aminoácidos 182-186 que se une a CX3CR1, el receptor de fractalquina (CX3CL1). Se ha demostrado que el mimetismo con CX3CL1 de G de RSV facilita la infección por RSV e interfiere con las respuestas inmunitarias adaptativas normales frente al virus. La inmunización activa con péptidos que abarcan el motivo CX3C de G de RSV protege a los ratones de la infección por RSV y de la inflamación pulmonar. Hasta ahora, estos péptidos de G de RSV no se han utilizado en una vacuna segura y efectiva.
- 15 Además de la proteína G del RSV, son posibles candidatas para vacunas las proteínas F de RSV (fusión) y M2 de RSV (matriz). Los intentos de desarrollar vacunas monovalentes frente al RSV que contengan solo uno de los principales determinantes antigénicos se han visto obstaculizados por la protección incompleta frente a la infección y la enfermedad inflamatoria, sugiriendo que un enfoque multivalente podría ser más exitoso. De hecho, la inmunización de ratones con vacunas multivalentes que suscitaban respuestas tanto de anticuerpo como de linfocitos T CD8+ dio como resultado una disminución de la respuesta Th2 y un aumento en la Th1/CD8, que se correlacionaba con una mayor protección frente a la infección por virus y menos patología pulmonar inflamatoria. Estos resultados sugieren que el diseño ideal de vacuna frente a RSV incluiría epítomos de dos o más proteínas víricas y suscitara tanto anticuerpos como linfocitos T CD8+ que secretan IFN γ .
- 20 Inesperadamente, se descubrió que los ratones inmunizados con nanopartículas que contienen un epítomo CX3C de G de RSV estaban protegidos frente a la exposición a RSV vivo. Curiosamente, un epítomo de M2 de RSV no proporcionó protección frente a la exposición a RSV en vivo y una vacuna de combinación con G de RSV y M2 de RSV no proporcionó una protección mejorada en comparación con G de RSV solo. Sin quedar vinculado a teoría alguna, se cree que la alta concentración de nanopartículas utilizada en estos experimentos puede haber enmascarado los posibles beneficios de las nanopartículas de combinación.
- 25
- 30
- 35

En una realización, la película multicapa se deposita sobre una partícula núcleo, tal como una nanopartícula de CaCO₃, una partícula de látex o una partícula de hierro. Son particularmente útiles los tamaños de partícula del orden de 5 nanómetros (nm) a 50 micrómetros (um) de diámetro. También pueden usarse como núcleos las partículas fabricadas de otros materiales, siempre y cuando sean biocompatibles, tengan una distribución de tamaños que se pueda controlar y tengan una carga superficial suficiente (ya sea positiva o negativa) para unirse a los péptidos polielectrolito. Los ejemplos incluyen nanopartículas y micropartículas fabricadas de materiales tales como ácido poliláctico (PLA), copolímero de ácido poliláctico ácido glicólico (PLGA), polietilenglicol (PEG), quitosano, ácido hialurónico, gelatina o combinaciones de los mismos. Las partículas núcleo también podrían fabricarse de materiales que se cree que son inadecuados para el uso humano, siempre y cuando puedan disolverse y separarse de la película multicapa después de la fabricación de la película. Los ejemplos de las sustancias del núcleo molde incluyen polímeros orgánicos tales como látex o materiales inorgánicos tales como sílice.

40

45

Las películas multicapa de polielectrolitos son películas finas (por ejemplo, de unos pocos nanómetros a micrómetros de espesor) compuestas de capas alternas de polielectrolitos cargados de forma opuesta. Dichas películas pueden formarse por ensamblaje capa por capa sobre un sustrato adecuado. En el autoensamblaje electrostático capa por capa ("ECPC"), la base física de la asociación de los polielectrolitos es la atracción electrostática. La acumulación de película es posible debido a que el signo de la densidad de carga superficial de la película se invierte al depositar las capas sucesivas. La generalidad y la relativa simplicidad del procedimiento de película por ECPC permiten la deposición de muchos tipos distintos de polielectrolitos en muchos tipos distintos de superficie. Las películas polipeptídicas multicapa son un subconjunto de películas multicapa de polielectrolitos, que comprenden al menos una capa que comprende un polipéptido cargado, denominado en el presente documento polipéptido diseñado. Una ventaja clave de las películas polipeptídicas multicapa sobre las películas fabricadas a partir de otros polímeros es su biocompatibilidad. Las películas ECPC también se pueden usar para encapsulación. Las aplicaciones de películas polipeptídicas y microcápsulas incluyen, por ejemplo, nanorreactores, biosensores, células artificiales y vehículos para suministro de fármacos.

50

55

60

El término "polielectrolito" incluye materiales policationicos y polianiónicos que tienen un peso molecular de más de 1.000 y al menos 5 cargas por molécula. Los materiales policationicos adecuados incluyen, por ejemplo, polipéptidos y poliaminas. Las poliaminas incluyen, por ejemplo, un polipéptido tal como poli-L-lisina (PLL) o poli-L-ornitina,

65

5 polivinilamina, poli(aminoestireno), poli(aminoacrilato), poli (N-metil aminoacrilato), poli (N-etilaminoacrilato), poli(N,N-dimetil aminoacrilato), poli(N,N-dietilaminoacrilato), poli(aminometacrilato), poli(N-metil aminometacrilato), poli(N-etil aminometacrilato), poli(N,N-dimetil aminometacrilato), poli(N,N-dietil aminometacrilato), poli(etilenimina), poli (cloruro de dialil dimetil amonio), poli(cloruro de N,N,N-trimetilaminoacrilato), poli(cloruro de metiacrilamidopropiltrimetil amonio), quitosano y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales policatiónicos anteriores. Los materiales polianiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, un polipéptido tal como ácido poli-L-glutámico (PGA) y ácido poli-L-aspártico, un ácido nucleico tal como ADN y ARN, alginato, carragenano, fulcelarán, pectina, xantana, ácido hialurónico, heparina, heparán sulfato, sulfato de condroitina, dermatán sulfato, sulfato de dextrano, poli(ácido metacrílico), celulosa oxidada, carboximetilcelulosa, polisacáridos ácidos y croscarmelosa, polímeros y copolímeros sintéticos que contienen grupos carboxilo colgantes, y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales polianiónicos anteriores. En una realización, el epítipo de RSV y el polielectrolito tienen el mismo signo de carga.

15 En una realización, una o más capas de polielectrolito de la película, incluyendo el polielectrolito que comprende el epítipo de RSV, son un polipéptido diseñado. En una realización, los principios de diseño para polipéptidos adecuados para deposición electrostática capa por capa se elucidan en la Publicación de patente de Estados Unidos N.º 2005/0069950,

20 que enseña películas polipeptídicas multicapa. Brevemente, los problemas principales del diseño son la longitud y la carga del polipéptido. La electrostática es el problema de diseño más importante debido a que es la base del ECPC. Sin propiedades de carga adecuadas, un polipéptido puede no ser sustancialmente soluble en solución acuosa a pH 4 a 10 y no puede usarse fácilmente para la fabricación de una película multicapa mediante ECPC. Otros problemas de diseño incluyen la estructura física de los polipéptidos, la estabilidad física de las películas formadas a partir de los polipéptidos y la biocompatibilidad y bioactividad de las películas y los polipéptidos constituyentes.

25 Un polipéptido diseñado significa un polipéptido que tiene carga suficiente para una unión estable a una superficie cargada de forma opuesta, es decir, un polipéptido que puede depositarse en una capa de una película multicapa en donde la fuerza impulsora para la formación de la película es la electrostática. Una película corta estable es una película que, una vez formada, retiene más de la mitad de sus componentes tras la incubación en PBS a 37 °C durante 24 horas. En realizaciones específicas, un polipéptido diseñado es al menos de 15 aminoácidos de longitud y la magnitud de la carga neta por resto del polipéptido es mayor o igual a 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 a pH 7,0. Los aminoácidos de origen natural cargados de forma positiva (básicos) a pH 7,0 son arginina (Arg), histidina (His), ornitina (Orn) y lisina (Lys). Los restos de aminoácido de origen natural cargados de forma negativa (ácidos) a pH 7,0 son ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp). Se puede emplear una mezcla de restos de aminoácido de carga opuesta siempre que la relación neta global de carga cumpla los criterios especificados. En una realización, un polipéptido diseñado no es un homopolímero. En otra realización, un polipéptido diseñado es no ramificado.

40 Un problema del diseño es el control de la estabilidad de las películas polipeptídicas ECPC. Los enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones hidrófobas, contribuyen a la estabilidad de las películas multicapa. Además, los enlaces disulfuro covalentes formados entre los aminoácidos que contienen sulfhidrilos de los polipéptidos, dentro de la misma capa o en capas adyacentes, pueden aumentar la resistencia estructural. Los aminoácidos que contienen sulfhidrilos incluyen cisteína y homocisteína, y estos restos pueden incorporarse fácilmente en péptidos sintéticos diseñados. Además, los grupos sulfhidrilo se pueden incorporar en homopolímeros de polielectrolito tales como poli-L-lisina o ácido poli-L-glutámico por métodos bien descritos en la bibliografía. Los aminoácidos que contienen sulfhidrilos pueden usarse para "bloquear" (unir entre sí) y "desbloquear" capas de una película polipeptídica multicapa mediante un cambio en el potencial de oxidación. Además, la incorporación de un aminoácido que contiene sulfhidrilo en un polipéptido diseñado permite el uso de péptidos relativamente cortos en la fabricación de una película fina, en virtud de la formación de enlaces disulfuro intermoleculares.

50 En una realización, los polipéptidos diseñados que contienen sulfhidrilos, ya sea sintetizados químicamente o producidos en un organismo hospedador, se ensamblan mediante ECPC en presencia de un agente reductor para impedir la formación prematura de enlaces disulfuro. Después del ensamblaje de la película, se elimina el agente reductor y se añade un agente oxidante. En presencia del agente oxidante se forman enlaces disulfuro entre los grupos sulfhidrilos, "bloqueando" de esta forma entre sí los polipéptidos dentro de las capas y entre las capas donde están presentes los grupos tiol. Los agentes reductores adecuados incluyen ditiotreitól (DTT), 2-mercaptoetanol (BME), glutatión reducido, clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y combinaciones de más de uno de estos productos químicos. Los agentes de oxidación adecuados incluyen glutatión oxidado, *tert*-butilhidroperóxido (t-BHP), timerosal, diamida, 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitro-benzoico) (DTNB), 4,4'-ditiopiridina, bromato de sodio, peróxido de hidrógeno, tetrionato de sodio, porfirindina, ortoyodosobenzoato de sodio y combinaciones de más de uno de estos productos químicos.

60 Como alternativa a los enlaces disulfuro, se pueden usar para estabilizar películas ECPC las químicas que producen otros enlaces covalentes. Para películas compuestas de polipéptidos, son particularmente útiles las químicas que producen enlaces amida. En presencia de reactivos de acoplamiento apropiados, los aminoácidos ácidos (aquellos con cadenas laterales que contienen grupos ácido carboxílico tales como el ácido aspártico y el ácido glutámico)

reaccionarán con aminoácidos cuyas cadenas laterales contienen grupos amina (tales como la lisina y la ornitina) para formar enlaces amida. En condiciones biológicas los enlaces amida son más estables que los enlaces disulfuro y no sufrirán reacciones de intercambio. Se pueden usar muchos reactivos para activar cadenas laterales de los polipéptidos para el enlazamiento de amida. Los reactivos de carbodiimida, tales como la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) soluble en agua, reaccionarán con ácido aspártico o ácido glutámico a un pH ligeramente ácido, formando un producto intermedio que reaccionará de forma irreversible con una amina para producir un enlace amida. A menudo se añaden a la reacción aditivos tales como N-hidroxisuccinimida, para acelerar la velocidad y la eficacia de la formación de amidas. Después de la reacción, los reactivos solubles se eliminan de las nanopartículas o micropartículas mediante centrifugación y aspiración. Los ejemplos de otros reactivos de acoplamiento incluyen diisopropilcarbodiimida, HBTU, HATU, HCTU, TBTU y PyBOP. Los ejemplos de otros aditivos incluyen sulfo-N-hidroxisuccinimida, 1-hidroxibenzotriazol y 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol. El grado de reticulación de amidas puede controlarse modulando la estequiometría de los reactivos de acoplamiento, el tiempo de reacción o la temperatura de la reacción, y puede controlarse mediante técnicas tales como la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

Las películas por ECPC reticuladas covalentemente tienen propiedades convenientes tales como una estabilidad aumentada. Una mayor estabilidad permite utilizar condiciones más rigurosas durante la fabricación de nanopartículas, micropartículas, nanocápsulas o microcápsulas. Los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen altas temperaturas, bajas temperaturas, temperaturas criogénicas, altas velocidades de centrifugación, tampones de alta sal, tampones de alto pH, tampones de bajo pH, filtración y almacenamiento a largo plazo.

Un método de fabricación de una película de polielectrolitos multicapa comprende depositar una pluralidad de capas de especies químicas cargadas de forma opuesta sobre un sustrato. Al menos una capa comprende un polipéptido diseñado. Los polielectrolitos depositados sucesivamente tendrán cargas netas opuestas. En una realización, la deposición de un polielectrolito comprende exponer el sustrato a una solución acuosa que comprende un polielectrolito a un pH en el que tiene una carga neta adecuada para el ECPC. En otras realizaciones, la deposición de un polielectrolito sobre el sustrato se consigue mediante pulverización secuencial de soluciones de polipéptidos cargados de forma opuesta. En otras realizaciones más, la deposición sobre el sustrato es mediante pulverización simultánea de soluciones de polielectrolitos cargados de forma opuesta.

En el método de ECPC para la formación de una película multicapa, las cargas opuestas de las capas adyacentes proporcionan la fuerza impulsora para el ensamblaje. No es crítico que los polielectrolitos en capas opuestas tengan la misma densidad de carga lineal neta, solo que las capas opuestas tengan cargas opuestas. Un procedimiento convencional de ensamblaje de películas por deposición incluye la formación de soluciones acuosas de los polielectrolitos a un pH en el que están ionizados (es decir, pH 4-10), la provisión de un sustrato que porte una carga superficial y la inmersión alterna del sustrato en las soluciones de polielectrolitos cargados. Opcionalmente, el sustrato se lava entre la deposición de la capa alterna.

La concentración de polielectrolito adecuada para la deposición del polielectrolito puede determinarla fácilmente un experto en la materia. Una concentración ejemplar es de 0,1 a 10 mg/ml. Para polielectrolitos no polipeptídicos típicos, tal como poli(ácido acrílico) y poli(clorhidrato de alilamina), los grosores de capa típicos son de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 Å, dependiendo de la fuerza iónica de la solución. Normalmente, los polielectrolitos cortos forman capas más finas que los polielectrolitos largos. Con respecto al grosor de la película, el grosor de la película de polielectrolitos depende de la humedad, así como del número de capas y de la composición de la película. Por ejemplo, las películas de PLL/PGA con un grosor de 50 nm se contraen a 1,6 nm al secarse con nitrógeno. En general, se pueden formar películas de 1 nm a 100 nm o más de grosor, dependiendo del estado de hidratación de la película y del peso molecular de los polielectrolitos empleados en el ensamblaje.

Además, el número de capas necesarias para formar una película de polielectrolitos multicapa estable dependerá de los polielectrolitos en la película. Para las películas que comprenden solo capas de polipéptidos de bajo peso molecular, una película tendrá normalmente 4 o más bicapas de polipéptidos cargados de forma opuesta. Para películas que comprenden polielectrolitos de alto peso molecular, tales como poli(ácido acrílico) y poli(clorhidrato de alilamina), pueden ser estables las películas que comprenden una única bicapa de polielectrolito cargado de forma opuesta. Los estudios han demostrado que las películas de polielectrolitos son dinámicas. Los polielectrolitos contenidos en una película pueden migrar entre las capas y pueden intercambiarse con polielectrolitos solubles de carga similar cuando se suspenden en una solución de polielectrolitos. Además, las películas de polielectrolitos pueden desmontarse o disolverse en respuesta a un cambio en el entorno, tal como la temperatura, el pH, la fuerza iónica o el potencial de oxidación del tampón de suspensión. Por lo tanto, algunos polielectrolitos, y en particular los polielectrolitos peptídicos, presentan estabilidad transitoria. La estabilidad de las películas de polielectrolitos peptídicos se puede controlar suspendiendo las películas en un tampón adecuado en condiciones controladas, durante un periodo de tiempo fijo, y midiendo después las cantidades de los péptidos dentro de la película con un ensayo adecuado, tal como el análisis de aminoácidos, ensayo de HPLC, o ensayo de fluorescencia. Las películas de polielectrolitos peptídicos son más estables en condiciones que son importantes para su almacenamiento y el uso como vacunas, por ejemplo en tampones neutros y a temperaturas ambiente, tales como de 4 °C a 37 °C. En estas

condiciones, las películas de polielectrolitos peptídicos estables conservarán la mayoría de sus péptidos componentes durante al menos 24 horas y a menudo hasta 14 días y más.

5 En conformidad con la invención, un polipéptido diseñado es un polipéptido que consiste en una o más regiones de absorción a superficie cargadas de al menos 8 aminoácidos unidas covalentemente al epítipo de la proteína M2 de RSV, el epítipo de la proteína G de RSV, o ambos, que tiene carga suficiente para la unión estable a una superficie cargada de forma opuesta, y en donde el polipéptido diseñado y las una o más regiones de absorción a superficie cargadas en el mismo están cargadas de forma positiva o cargadas de forma negativa. En una realización, las una o más regiones de adsorción a superficie y el uno o más epítipos de RSV tienen la misma polaridad neta. En otra
10 realización, la solubilidad del polipéptido diseñado a pH 4 a 10 es mayor que o igual a aproximadamente 0,1 mg/ml.

En otra realización, la solubilidad del polipéptido diseñado a pH 4 a 10 es mayor que o igual a aproximadamente 1 mg/ml. La solubilidad es una limitación práctica para facilitar la deposición de los polipéptidos a partir de una solución acuosa. Un límite superior práctico del grado de polimerización de un polipéptido antigénico es de aproximadamente
15 1.000 restos. Es concebible, sin embargo, que los polipéptidos compuestos más largos podrían realizarse mediante un método apropiado de síntesis.

En una realización, un polipéptido diseñado comprende un único epítipo antigénico de RSV flanqueado por dos regiones de adsorción a superficie, una región de adsorción de superficie N-terminal y una región de adsorción a superficie C-terminal. En otra realización, un polipéptido diseñado comprende un único epítipo antigénico de RSV flanqueado por una región de adsorción a superficie unida al extremo N del epítipo de RSV. En otra realización, un polipéptido diseñado comprende un único epítipo antigénico de RSV flanqueado por una de las regiones de adsorción a superficie unida al extremo C del epítipo de RSV.

25 Cada una de las regiones independientes (por ejemplo, epítipos de RSV y regiones de adsorción a superficie) del polipéptido diseñado puede sintetizarse por separado mediante síntesis peptídica en fase en solución, síntesis peptídica en fase sólida o ingeniería genética de un organismo hospedador adecuado. La síntesis de péptidos en fase en solución es el método utilizado para producción de la mayoría de los productos farmacéuticos peptídicos aprobados actualmente en el mercado. Para sintetizar péptidos relativamente largos e incluso proteínas pequeñas se puede usar una combinación de métodos en fase en solución y en fase sólida. Las empresas de síntesis de péptidos tienen la competencia técnica y la experiencia para sintetizar péptidos difíciles sobre una base de tarifa por servicio. Las síntesis se realizan en condiciones de prácticas correctas de fabricación (GMP, forma siglada de *good manufacturing practice*) y en una escala adecuada para ensayos clínicos y lanzamiento comercial de fármacos.

35 Como alternativa, las diversas regiones independientes se pueden sintetizar juntas como una única cadena polipeptídica mediante síntesis peptídica en fase de solución, síntesis peptídica en fase sólida o ingeniería genética de un organismo hospedador adecuado. En cualquier caso particular la elección del enfoque será una cuestión de conveniencia o economía.

40 Si los diversos epítipos de RSV y las regiones de adsorción a superficie se sintetizan por separado, una vez purificados, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, se unen mediante síntesis de enlaces peptídicos. Es decir, el extremo N de la región de adsorción a superficie y el extremo C del epítipo de RSV están unidos covalentemente para producir el polipéptido diseñado. Como alternativa, el extremo C de la región de adsorción a superficie y el extremo N del epítipo de RSV están unidos covalentemente para producir el polipéptido diseñado. Los fragmentos individuales pueden sintetizarse por métodos en fase sólida y obtenerse como segmentos completamente protegidos, completamente desprotegidos o parcialmente protegidos. Los segmentos se pueden unir covalentemente en una reacción en fase en solución o reacción en fase sólida. Si un fragmento polipeptídico contiene una cisteína como resto N-terminal y el otro fragmento polipeptídico contiene un tioéster o un precursor tioéster en su resto C-terminal, los dos fragmentos se acoplarán espontáneamente en solución mediante una reacción específica comúnmente conocida (para los expertos en el arte) como Ligación Nativa. La Ligación Nativa es una opción particularmente atractiva para la síntesis de péptidos diseñados debido a que puede realizarse con fragmentos peptídicos completamente desprotegidos o parcialmente protegidos en solución acuosa y en concentraciones diluidas.

55 En una realización, los epítipos de RSV y/o las regiones de adsorción a superficie se unen por enlaces peptídicos o no peptídicos como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 7.723.294, que enseña el uso de enlaces no peptídicos para unir segmentos de polipéptidos para su uso en películas multicapa. Los enlazadores no peptídicos adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores alquílicos tales como $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_s-\text{C}(\text{O})-$, en donde $s=2-20$. Opcionalmente, los enlazadores alquílicos están sustituidos por un grupo no obstaculizador desde el punto de vista estérico, tal como un alquilo inferior (por ejemplo, C_1-C_6), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH_2 , fenilo y similares. Otro enlazador no peptídico ejemplar es un enlazador de polietilenglicol tal como $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{C}(\text{O})-$ en donde n es tal que el enlazador tiene un peso molecular de 100 a 5000 Da, específicamente de 100 a 500 Da. Muchos de los enlazadores descritos en el presente documento están disponibles en proveedores comerciales en una forma adecuada para su uso en la síntesis de péptidos en fase sólida.

65

En una realización, uno o más epítopos polipeptídicos de RSV están unidos covalentemente a uno o más de los polielectrolitos, tales como un polipéptido u otro polielectrolito, a través de enlaces covalentes. Los ejemplos de enlaces covalentes adecuados incluyen amidas, ésteres, éteres, tioéteres y disulfuros. Un experto en la materia puede aprovechar una serie de grupos funcionales encontrados dentro del péptido epitópico para diseñar técnicamente un enlace a un electrolito adecuado. Por ejemplo, un ácido carboxílico en el péptido epitópico puede encontrarse en la cadena C-terminal o en la cadena lateral de los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico. Los ácidos carboxílicos se pueden activar con reactivos de acoplamiento de péptidos adecuados tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para la reacción con aminas primarias o secundarias que se encuentran en los polielectrolitos peptídicos tales como poli-L-lisina. El enlace amida resultante es estable bajo condiciones ambientales. Por el contrario, los grupos ácidos en un polielectrolito peptídico se pueden activar con EDC, para la reacción con grupos amina en el péptido epitópico. Los grupos amina útiles se pueden encontrar en el extremo N-terminal del péptido epitópico o en la cadena lateral de restos lisina.

Los péptidos epitópicos también se pueden unir a polielectrolitos a través de enlaces disulfuro. Los polielectrolitos tales como PGA o PLL pueden modificarse químicamente de modo que una fracción de sus cadenas laterales contenga grupos sulfhidrilo. En presencia de un oxidante adecuado, los sulfhidrilos reaccionarán con el grupo sulfhidrilo de un resto cisteína contenido dentro del péptido epitópico. La cisteína puede ser una cisteína nativa de la secuencia de la proteína de un patógeno tal como RSV o puede ser una cisteína no nativa que se incorporó manera intencionada en el epítipo durante la síntesis peptídica. Los oxidantes adecuados incluyen DTNB, 2,2'-ditiopiridina, peróxido de hidrógeno, cistina y glutatión oxidado. La unión de péptidos epitópicos a polielectrolitos a través de enlaces disulfuro es particularmente útil. Los disulfuros son estables en condiciones normales de fabricación y almacenamiento de películas, pero se escinden fácilmente mediante agentes reductores que se encuentran naturalmente en las células, lo que libera el péptido epitópico para el procesamiento inmunitario.

Los péptidos epitópicos también se pueden unir a polielectrolitos a través de enlaces tioéter. Los péptidos epitópicos sintéticos pueden sintetizarse con electrófilos apropiados tales como grupos haloacetilo que reaccionan específicamente con los sulfhidrilos. Por ejemplo, un péptido epitópico que contiene un cloroacetilo en su N-terminal formará un enlace estable con polielectrolitos que portan sulfhidrilos, tales como PGA-SH descrito anteriormente.

Los péptidos epitópicos también se pueden unir covalentemente a polielectrolitos a través de moléculas enlazadoras bifuncionales. Los enlazadores bifuncionales contienen habitualmente dos grupos electrófilos que pueden reaccionar con nucleófilos presentes en el péptido epitópico o con la molécula de polielectrolito. Se venden comercialmente dos clases de moléculas enlazadoras, los enlazadores homobifuncionales y los enlazadores heterobifuncionales. Los enlazadores homobifuncionales contienen dos copias de un grupo electrófilo unido por un espaciador no reactivo. A menudo los electrófilos son ésteres activos, tal como ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) o ésteres de sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo NHS) que reaccionan con aminas nucleófilas. Los ejemplos de ésteres de NHS homobifuncionales incluyen bis(sulfosuccinimidil) suberato, disuccinimidil glutarato, ditiobis(succinimidil) propionato, disuccinimidil suberato, disuccinimidil tartrato. En ocasiones los electrófilos son grupos aldehído que forman imidas con aminas nucleófilas en el epítipo y las moléculas de polielectrolito. Los enlaces imida son transitoriamente estables pero pueden convertirse en estructuras estables con agentes reductores tales como borohidruro de sodio o hidrogenación catalítica. El enlazador de aldehído homobifuncional más comúnmente utilizado es el glutaraldehído.

Otros enlazadores homobifuncionales usados comúnmente contienen electrófilos que reaccionan específicamente con tioles nucleófilos, los cuales pueden usarse para unir péptidos epitópicos que contienen cisteínas a polielectrolitos que contienen sulfhidrilos como se describe anteriormente. Los ejemplos de enlazadores homobifuncionales específicos de sulfhidrilo incluyen 1,4-bismaleimidobutano, 1,4 bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano, vbismaleimidohexano, bis-maleimidoetano, 1,4-Di-[3'-(2'piridilditio)-propionamido] butano, ditiobismaleimidoetano, 1,6-hexano-bis-vinilsulfona.

Los miembros de la clase heterobifuncional de reactivos de reticulación contienen dos grupos de reactividad distintos, a menudo, pero no siempre, electrófilos, que reaccionan específicamente con distintos grupos funcionales de las moléculas sustrato. Son particularmente útiles los enlazadores que contienen un grupo electrófilo que es específico para un sulfhidrilo y otro electrófilo que es específico para una amina. Los ejemplos de estos reactivos incluyen *N*-sulfosuccinimidil[4-yodoacetil]aminobenzoato, *N*-succinimidil[4-yodoacetil]aminobenzoato, succinimidil 3-[bromoacetamido]propionato, *N*-succinimidil iodoacetato, sulfosuccinimidil 4-[*N*-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato, succinimidil 4-[*N*-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato, (éster de [*N*-maleimidocaproiloxi]sulfosuccinimida, éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisulfosuccinimida, *N*-succinimidil 3-(2-piridilditio)-propionato, succinimidil 6-(3'-(2-piridilditio)propionamido)hexanoato, 4-succinimidiloxycarbonil-metil-*a*-(2-piridilditio)tolueno.

La amplia variedad de funcionalidad que está normalmente presente tanto en los péptidos epitópicos como en los polielectrolitos o que puede instalarse fácilmente en cualquiera de las moléculas permite escoger la estrategia de unión que mejor se adapte a los sustratos de interés. Un ejemplo plausible es la unión de un péptido epitópico que contiene cisteínas a PLL.

Los segmentos polipeptídicos se pueden unir de una diversidad de modos, dependiendo de la química del enlazador no peptídico. Por ejemplo, el extremo N del primer segmento polipeptídico se une al extremo C del segundo segmento polipeptídico; el extremo N del primer segmento polipeptídico se une al extremo N del segundo segmento polipeptídico; el extremo C del primer segmento polipeptídico se une al extremo C del segundo segmento polipeptídico; el extremo C del primer segmento polipeptídico se une al extremo N del segundo segmento polipeptídico; el extremo C o el extremo N del primer segmento polipeptídico se une a una cadena lateral colgante del segundo segmento polipeptídico; o el extremo C o el extremo N del segundo segmento polipeptídico se une a una cadena lateral colgante del primer segmento polipeptídico. Independientemente del punto de unión, sin embargo, los segmentos primero y segundo están unidos covalentemente mediante un enlazador no peptídico.

En una realización, un polipéptido diseñado es una combinación exclusiva de una o más regiones de adsorción a superficie unidas covalentemente y uno o más epítomos de RSV. Los epítomos de RSV pueden ser epítomos lineales o conformacionales. En conformidad con la invención, los epítomos de RSV consisten en de 3 a 120 aminoácidos.

En una realización, un polipéptido diseñado comprende un epítomo de RSV y una región de adsorción de superficie. En otra realización, un polipéptido diseñado comprende un epítomo de RSV y dos regiones de adsorción de superficie, una unida al extremo N del epítomo de RSV y una unida al extremo C del epítomo de RSV. El fin de la región (o regiones) de adsorción a superficie es permitir la adsorción del polipéptido sobre una superficie cargada de forma opuesta para construir una película multicapa.

El número de regiones de adsorción a superficie en un polipéptido diseñado con respecto al número y/o longitud de los epítomos de RSV está relacionado con los requisitos de solubilidad. Por ejemplo, si el epítomo de RSV es una secuencia de aminoácidos corta de, por ejemplo, tres restos de aminoácido, se precisará solo una región de adsorción a superficie de al menos ocho restos de aminoácido para adsorber el polipéptido diseñado sobre una superficie cargada de forma adecuada. Si, por el contrario, el epítomo de RSV es un dominio estructural plegado soluble de una proteína que comprende, por ejemplo, 120 restos de aminoácido, pueden precisarse dos regiones de adsorción a superficie para impartir suficiente carga para que el polipéptido diseñado sea soluble en agua y adecuado para la adsorción. Las regiones de adsorción a superficie podrían ser contiguas y emplazarse en el extremo N del dominio, ser contiguas y emplazarse en el extremo C del dominio, o no ser contiguas estando una en el extremo N y una en el extremo C. De manera adicional, un epítomo de RSV puede contener un segmento cargado (cargado negativamente o cargado positivamente) dentro de su secuencia nativa, que puede servir como una región de adsorción a superficie.

Un polipéptido o antígeno puede contener uno o más determinantes antigénicos distintos. Un determinante antigénico puede referirse a una porción inmunogénica de una proteína de múltiples cadenas.

Los métodos y técnicas para determinar el emplazamiento y la composición de un determinante antigénico o epítomo para un anticuerpo específico son bien conocidos en la técnica. Estas técnicas pueden usarse para identificar y/o caracterizar epítomos para su uso como epítomos de RSV. En una realización, los métodos de mapeo/caracterización de un epítomo para un anticuerpo específico de antígeno pueden determinarse por "*foot-printing*" epitópico usando la modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína antigénica. Un ejemplo de tal técnica de *foot-printing* es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en donde se produce un intercambio de hidrógeno/deuterio de los protones de las amidas de una proteína ligando y un receptor, la unión y un intercambio hacia atrás, en donde los grupos amida del esqueleto que participan en la unión de la proteína están protegido del intercambio hacia atrás y, por lo tanto, permanecerán deuterados. En este punto, las regiones relevantes pueden identificarse por proteólisis con pepsina, separación por cromatografía líquida de alto rendimiento de microcalibre rápida y/o electronebulización-espectrometría de masas.

En otra realización, una técnica de identificación de epítomos adecuada es el mapeo epitópico por resonancia magnética nuclear (RMN), donde normalmente se compara la posición de las señales en los espectros de RMN bidimensional del antígeno libre y el antígeno formando complejo con el péptido de unión al antígeno, tal como un anticuerpo. Normalmente, el antígeno se marca isotópicamente de forma selectiva con ¹⁵N de forma que solo se vean en el espectro de RMN las señales correspondientes al antígeno y no las señales del péptido de unión al antígeno. Las señales del antígeno que se originan a partir de aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión al antígeno normalmente cambiarán de posición en los espectros del complejo en comparación con los espectros del antígeno libre, y de esa manera se pueden identificar los aminoácidos implicados en la unión.

En otra realización, la caracterización/mapeo de epítomos se puede realizar mediante exploración de péptidos. En este enfoque, una serie de péptidos solapantes que abarcan la longitud completa de la cadena polipeptídica de un antígeno se preparan y analizan individualmente con respecto a la inmunogenicidad. El título de anticuerpos del antígeno peptídico correspondiente se determina mediante un método convencional, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Después, los diversos péptidos se pueden clasificar con respecto a la inmunogenicidad, proporcionando una base empírica para la selección del diseño de péptidos para el desarrollo de vacunas.

En otra realización, también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítomos las técnicas de digestión con proteasas. Las regiones/secuencias relevantes del determinante antigénico se pueden determinar mediante digestión con proteasas, por ejemplo mediante el uso de una digestión con tripsina durante una noche (O/N) a 37 °C y pH 7-8, en una relación de aproximadamente 1:50 con respecto a la proteína antigénica, seguido por análisis de espectrometría de masas (MS) para la identificación del péptido. Los péptidos protegidos por la proteína antigénica frente a la escisión con tripsina pueden identificarse posteriormente mediante comparación de muestras sometidas a digestión con tripsina y muestras incubadas con CD38BP, y luego sometidas a digestión con, por ejemplo, tripsina (revelando de este modo la huella para el ligante). También, o alternativamente, se pueden usar en un método de caracterización de epítomos similar otras enzimas como quimiotripsina, pepsina, etc. Además, la digestión con proteasas puede proporcionar un método rápido para determinar el emplazamiento de la secuencia de un posible determinante antigénico dentro de una proteína antigénica conocida usando un anticuerpo conocido. En otra realización, también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítomos las técnicas de digestión con proteasas.

Se divulga adicionalmente en el presente documento una composición inmunogénica, comprendiendo dicha composición inmunogénica una película multicapa que comprende dos o más capas de polielectrolitos, en donde las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de forma opuesta, en donde una capa comprende un epítomo de RSV. Opcionalmente, la composición inmunogénica comprende adicionalmente una o más capas que comprenden un polipéptido diseñado.

La película de polielectrolito multicapa de la invención comprende una pluralidad de epítomos de RSV, en los mismos o en distintos polipéptidos diseñados. La pluralidad de determinantes antigénicos puede ser de los mismos o de distintos agentes infecciosos. En una realización, la película comprende una pluralidad de polielectrolitos antigénicos exclusivos. En otra realización, la película comprende una pluralidad de polielectrolitos inmunogénicos que comprenden múltiples epítomos de RSV dentro de cada polielectrolito. Una ventaja de estas películas es que pueden estar presentes múltiples determinantes antigénicos o múltiples conformaciones de un único determinante antigénico lineal en una única partícula de vacuna sintética. Dichas películas con múltiples determinantes antigénicos pueden potencialmente producir anticuerpos frente a múltiples epítomos, aumentando las probabilidades de que al menos algunos de los anticuerpos generados por el sistema inmunitario del organismo neutralicen al patógeno o a antígenos específicos diana en células cancerosas, por ejemplo.

En una realización, la película multicapa comprende opcionalmente una o más moléculas bioactivas inmunogénicas adicionales. Aunque no es necesario, las una o más moléculas bioactivas inmunogénicas adicionales comprenderán normalmente uno o más determinantes antigénicos adicionales. Las moléculas bioactivas inmunogénicas adecuadas adicionales incluyen, por ejemplo, un fármaco, una proteína, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un lípido, un fosfolípido, un hidrato de carbono, un polisacárido, un lipopolisacárido, una molécula inmunoestimuladora de bajo peso molecular, o una combinación que comprende una o más de las moléculas bioactivas anteriores. Otros tipos de potenciadores inmunitarios adicionales incluyen un fragmento funcional de membrana, una estructura de membrana, un virus, un patógeno, una célula, un agregado de células, un orgánulo o una combinación que comprende una o más de las estructuras bioactivas anteriores.

En una realización, la película multicapa comprende opcionalmente una o más moléculas bioactivas adicionales. Las una o más moléculas bioactivas adicionales pueden ser un fármaco. Como alternativa, un núcleo sobre el que se puede depositar la película comprende una diversidad de encapsulantes distintos, por ejemplo, una o más moléculas bioactivas adicionales, incluido, por ejemplo, un fármaco. Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas diseñadas como se describe en el presente documento también podrían usarse para terapia combinada, por ejemplo, suscitando una respuesta inmunitaria, y para el suministro dirigido de fármacos. Los "núcleos" micrométricos de un material terapéutico adecuado en forma "cristalina" se pueden encapsular por una composición inmunogénica que comprende los polipéptidos antigénicos, y las microcápsulas resultantes podrían usarse para el suministro de fármacos. En algunas condiciones el núcleo puede ser insoluble, por ejemplo, pH alto o baja temperatura, y soluble en las condiciones en las que se producirá una liberación controlada. La carga superficial sobre los cristales se puede determinar mediante mediciones de potencial ζ (utilizado para determinar la carga en unidades electrostáticas sobre partículas coloidales en un medio líquido). La velocidad a la que se liberan los contenidos de microcápsulas desde el interior de la microcápsula al entorno circundante dependerá de una serie de factores, que incluyen el grosor de la cubierta de encapsulación, los polipéptidos antigénicos utilizados en la cubierta, la presencia de enlaces disulfuro, el grado de reticulación de los péptidos, la temperatura, la fuerza iónica y el método usado para ensamblar los péptidos. En general, cuanto más gruesa sea la cápsula, mayor es el tiempo de liberación.

En otra realización, la biomolécula inmunogénica adicional es una secuencia de ácido nucleico que tiene la capacidad de dirigir la síntesis del organismo hospedador de un inmunógeno deseado o de interferir con la expresión de información genética de un patógeno. En el caso anterior, tal secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, se inserta en un vector de expresión adecuado por métodos conocidos por los expertos en la materia. Los vectores de expresión adecuados para producir *in vivo* transferencia génica de alta eficacia incluyen vectores víricos retrovíricos, adenovíricos y del virus de la variolovacuna. Los elementos operativos de tales vectores de expresión incluyen al menos un promotor, al menos un operador, al menos una secuencia líder, al menos un codón de terminación y

cualquier otra secuencia de ADN necesaria o preferente para una transcripción apropiada y la posterior traducción del ácido nucleico del vector. En particular, se contempla que tales vectores contendrán al menos un origen de replicación reconocido por el organismo hospedador junto con al menos un marcador de selección y al menos una secuencia promotora que tenga la capacidad de iniciar la transcripción de la secuencia de ácido nucleico. En este último caso, se prepararán para el suministro múltiples copias de tal secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, mediante la encapsulación de los ácidos nucleicos dentro de una película polipeptídica multicapa en forma de una cápsula para el suministro intravenoso.

En la construcción de un vector de expresión recombinante, debe señalarse adicionalmente que pueden insertarse en cada vector copias múltiples de la secuencia de ácido nucleico de interés y sus elementos operativos asociados. En tal realización, el organismo hospedador produciría mayores cantidades de la proteína deseada por vector. El número de copias múltiples de la secuencia de ácido nucleico que puede insertarse en el vector está limitado solo por la capacidad del vector resultante, debido a su tamaño, de ser transferido y replicarse, y transcribirse en un microorganismo hospedador apropiado.

En una realización adicional, la película de la invención comprende una mezcla de polielectrolitos antigénicos/moléculas bioactivas inmunogénicas. Estos pueden obtenerse del mismo antígeno, pueden ser antígenos distintos del mismo agente infeccioso o enfermedad, o pueden ser de distintos agentes infecciosos o enfermedades. Por lo tanto, el complejo o mezcla producirá una respuesta inmunitaria frente a varios antígenos y posiblemente una serie de agentes infecciosos o enfermedades según lo especificado por los componentes peptídicos/proteicos antigénicos del sistema de suministro.

En una realización, la película multicapa desencadena una respuesta del sistema inmunitario frente a un patógeno. En una realización, una composición de vacuna comprende una película de la invención en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, un método de vacunación frente a una enfermedad patógena comprende la administración a un sujeto que necesita vacunación de una cantidad eficaz de la película de la invención.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, grandes macromoléculas que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, partículas víricas inactivas y similares. Además se pueden usar en la composición sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos o sulfatos, así como las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos. Las composiciones también pueden contener líquidos, tal como agua, solución salina, glicerol y etanol, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes o agentes tamponadores de pH. Se pueden usar liposomas como vehículos.

Un método para suscitar una respuesta inmunitaria frente a una enfermedad o patógeno en un vertebrado (por ejemplo, vacunación) comprende administrar una composición inmunogénica que comprende una película multicapa de la invención. En una realización, el polielectrolito que contiene el epítipo de RSV está en la capa más exterior o expuesta al disolvente de la película multicapa. La composición inmunogénica se puede administrar por vía oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, sublingual, intradérmica, pulmonar o transdérmica, ya sea con o sin una dosis de refuerzo. En general, las composiciones se administran de manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad tal que sean profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces. Las cantidades precisas de composición inmunogénica a administrar dependen del criterio del médico y pueden ser peculiares para cada sujeto. Será evidente para los expertos en la materia que la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunogénica dependerá, entre otros, de la pauta de administración, de la dosis unitaria de antígeno administrado, de si las composiciones se administran en combinación con otros agentes terapéuticos y del estado inmunitario y la salud del receptor. Un especialista sanitario experto en la materia puede determinar una dosificación terapéuticamente eficaz basándose en las características del paciente (edad, peso, sexo, estado, complicaciones, otras enfermedades, etc.), como es bien sabido en la materia. Adicionalmente, a medida que se realizan estudios rutinarios adicionales, irá emergiendo información más específica con respecto a los niveles de dosificación adecuados para el tratamiento de diversas afecciones en diversos pacientes, y el experto en la materia, considerando el contexto terapéutico, la edad y la salud general del receptor, es capaz de determinar la dosificación apropiada.

La composición inmunogénica comprende adicionalmente un adyuvante. En general, los adyuvantes comprenden sustancias que refuerzan la respuesta inmunitaria del hospedador de una manera no específica. La selección de un adyuvante depende del sujeto a vacunar. Preferentemente, se usa un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una vacuna para un ser humano debe evitar los adyuvantes para emulsiones oleosas o hidrocarburo, incluyendo el adyuvante de Freund completo e incompleto. Un ejemplo de un adyuvante adecuado para su uso en seres humanos es el alumbre (gel de alúmina). Una vacuna para un animal, sin embargo, puede contener adyuvantes no apropiados para el uso con seres humanos.

Se contempla que se puede suscitar una respuesta inmunitaria a través de la presentación de cualquier proteína o péptido que tenga la capacidad de suscitar tal respuesta. En una realización, el antígeno es un epítipo clave, que da lugar a una fuerte respuesta inmunitaria frente a un agente de enfermedades infecciosas particular, es decir, un epítipo inmunodominante. Si se desea, para aumentar la probabilidad de una respuesta inmunitaria se puede incluir en la composición inmunogénica más de un antígeno o epítipo.

En conformidad con la invención, se incorporan múltiples epítopos peptídicos o proteicos del RSV en una película de ECPC. Los distintos epítopos pueden sintetizarse o expresarse en una única molécula peptídica diseñada. Se espera que colocar múltiples epítopos dentro de un único péptido diseñado tenga determinadas ventajas. Por ejemplo, debería simplificar el proceso de fabricación por ECPC y aumentar la reproducibilidad. De manera adicional, la colocación de múltiples epítopos dentro de un único péptido diseñado bloqueará las relaciones molares de los distintos epítopos en una relación deseada, por ejemplo 1:1.

Como alternativa, los epítopos se pueden incorporar en péptidos diseñados distintos. Los péptidos diseñados se incorporan en una película de ECPC durante uno o más etapas de formación de capas. La fabricación de películas usando múltiples péptidos diseñados distintos también puede presentar determinadas ventajas. Debería simplificar la síntesis de péptidos diseñados reduciendo los costos. Además permitirá variar y optimizar las dosis relativas de cada péptido diseñado dentro de la película. Si, por ejemplo, los datos biológicos preclínicos o clínicos indicaron que una vacuna óptima debería contener cinco copias de un epítipo por cada copia de un segundo epítipo (relación 5:1), el enfoque de péptidos diseñados con epítopos separados facilitaría la fabricación de tal vacuna.

Los péptidos diseñados se adsorben a la superficie de una película de ECPC en virtud de la atracción electrostática entre la región (o regiones) de adsorción a superficie cargada del péptido diseñado y la superficie cargada de forma opuesta de la película. La eficacia de la adsorción dependerá en gran medida de la composición de la región (o regiones) de adsorción a superficie. De este modo, los péptidos diseñados con distintos epítopos pero una región (o regiones) de adsorción a superficie similar se adsorberán con una eficacia similar. Para fabricar una película con dos péptidos diseñados distintos, cada uno a una relación molar de 1:1, se podrían mezclar los péptidos a esa relación molar y depositarlos simultáneamente en una capa particular. Como alternativa, se podría depositar cada péptido individualmente en capas separadas. La relación molar de los péptidos adsorbidos reflejará en gran medida las concentraciones relativas a las que fueron depositados en capas o el número de etapas de formación de capas durante el cual se incorporaron.

La cantidad de péptidos diseñados incorporados en una película de ECPC puede medirse en una diversidad de formas. El análisis cuantitativo de aminoácidos (AAA) es particularmente adecuado para este propósito. Las películas que contienen péptidos diseñados se descomponen en sus aminoácidos constituyentes mediante tratamiento con ácido clorhídrico concentrado (6 M) y calentamiento, normalmente a 115 °C durante 15 horas. Después, se miden las cantidades de cada aminoácido usando técnicas cromatográficas bien conocidas por los expertos en la materia. Los aminoácidos que están presentes en solo uno de los péptidos diseñados en una película se pueden usar como indicadores de ese péptido. Cuando los péptidos diseñados carecen de aminoácidos exclusivos, durante la síntesis pueden incorporarse aminoácidos no naturales (por ejemplo, aminobutírico u homovalina) en los péptidos diseñados. Estos aminoácidos indicadores se identifican fácilmente durante el experimento de AAA y se pueden usar para cuantificar la cantidad de péptido en la película.

Como se usa en el presente documento, una respuesta de linfocitos T específica es una respuesta que es específica para un epítipo de interés, específicamente un epítipo de RSV tal como un epítipo de M2 de RSV, como se divulga en el presente documento. Una respuesta de linfocitos T específica puede ser una respuesta de linfocitos T citotóxicos o una respuesta de linfocitos T auxiliares, pero que preferentemente será una respuesta de linfocitos T.

Como se usa en el presente documento, una respuesta de anticuerpos específica es una respuesta que es específica para un epítipo de interés, específicamente un epítipo de RSV tal como un epítipo de G de RSV, como se divulga en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "capa" significa un aumento de grosor, por ejemplo, sobre un molde para la formación de película, después de una etapa de adsorción. "Multicapa" significa múltiples aumentos de grosor (es decir, dos o más). Una "película de polielectrolito multicapa" es una película que comprende uno o más aumentos de grosor de polielectrolitos. Después de la deposición, las capas de una película multicapa pueden no permanecer como capas discretas. De hecho, es posible que haya una entremezcla significativa de especies, en particular en las interfaces de los aumentos de grosor. La entremezcla, o la ausencia de la misma, puede controlarse por técnicas analíticas tales como mediciones de los potenciales ζ , la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X y espectrometría de masas de iones secundarios por tiempo de vuelo.

"Aminoácido" significa un componente básico de un polipéptido. Como se usa en el presente documento, "aminoácido" incluye los 20 L-aminoácidos de origen natural comunes, todos los otros aminoácidos naturales, todos los aminoácidos no naturales y todos los miméticos de aminoácido, por ejemplo, los peptoides.

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

5 "Aminoácidos no naturales" significa un aminoácido distinto de cualquiera de los 20 L-aminoácidos de origen natural comunes. Un aminoácido no natural puede tener una estequiometría L o D.

10 "Peptoides", o glicina N-sustituída, significa un análogo del correspondiente monómero de aminoácido, con la misma cadena lateral que el aminoácido correspondiente, pero con la cadena lateral anexa al átomo de nitrógeno del grupo amino en lugar de a los α -carbonos del resto. Por consiguiente, los enlaces químicos entre los monómeros de un polipéptido no son enlaces peptídicos, lo que puede ser útil para limitar la digestión proteolítica.

15 "Secuencia de aminoácidos" y "secuencia" significan un tramo contiguo de una cadena de polipéptido que tiene al menos dos restos de aminoácidos de longitud.

"Resto" significa un aminoácido en un polímero o un oligómero; es el resto del monómero de aminoácido a partir del cual se formó el polímero. La síntesis de polipéptidos implica deshidratación, es decir, al agregar el aminoácido a una cadena polipeptídica se "pierde" una única molécula de agua.

20 Como se usa en el presente documento, "péptido" y "polipéptido" se refieren a una serie de aminoácidos conectados entre sí mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y alfa-carboxilo de aminoácidos adyacentes, y pueden contener o no tener modificaciones tales como glucosilación, oxidación de la cadena lateral o fosforilación, siempre que tales modificaciones, o la falta de las mismas, no destruya la inmunogenicidad. Como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere tanto a un péptido como a un polipéptido o proteína.

25 "Polipéptido diseñado" significa un polipéptido que tiene carga suficiente para una unión estable a una superficie cargada de forma opuesta, es decir, un polipéptido que puede depositarse en una capa de una película multicapa en donde la fuerza impulsora para la formación de la película es la electrostática. En realizaciones específicas, un polipéptido diseñado es al menos de 15 aminoácidos de longitud y la magnitud de la carga neta por resto del polipéptido es mayor o igual a 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 a pH 7,0. En una realización, la relación del número de restos cargados de la misma polaridad menos el número de restos de la polaridad opuesta al número total de restos del polipéptido es mayor o igual a 0,5 a pH 7,0. En otras palabras, la magnitud de la carga neta por resto del polipéptido es mayor o igual a 0,5. Aunque no existe un límite superior absoluto para la longitud del polipéptido, en general, los polipéptidos diseñados adecuados para la deposición de ECPC tienen un límite superior práctico de longitud de 35 1.000 restos. Los polipéptidos diseñados pueden incluir secuencias que se encuentran en la naturaleza, tales como epítomos de RSV, así como regiones que proporcionan funcionalidad a los péptidos, tales como regiones cargadas también denominadas en el presente documento regiones de adsorción a superficie, la cuales permiten que los polipéptidos diseñados se depositen en una película polipeptídica multicapa.

40 "Estructura primaria" significa la secuencia lineal contigua de aminoácidos en una cadena de polipéptido y "estructura secundaria" significa los tipos más o menos regulares de estructura en una cadena polipeptídica estabilizada por interacciones no covalentes, habitualmente enlaces de hidrógeno. Los ejemplos de estructura secundaria incluyen α hélice, lámina β y giro β .

45 "Película polipeptídica multicapa" significa una película que comprende uno o más polipéptidos diseñados como se definió anteriormente. Por ejemplo, una película polipeptídica multicapa comprende una primera capa que comprende un polipéptido diseñado y una segunda capa que comprende un polielectrolito que tiene una carga neta de polaridad opuesta al polipéptido diseñado. Por ejemplo, si la primera capa tiene una carga neta positiva, la segunda capa tiene una carga neta negativa; y si la primera capa tiene una carga neta negativa, la segunda capa 50 tiene una carga neta positiva. La segunda capa comprende otro polipéptido diseñado u otro polielectrolito.

"Sustrato" significa un material sólido con una superficie adecuada para la adsorción de polielectrolitos de una solución acuosa. La superficie de un sustrato puede tener esencialmente cualquier forma, por ejemplo, plana, esférica, en forma de varilla, etc. La superficie del sustrato puede ser regular o irregular. Un sustrato puede ser un 55 cristal. Un sustrato puede ser una molécula bioactiva. Un sustrato varía de tamaño desde la nanoescala a la macroescala. Además, un sustrato comprende opcionalmente varias subpartículas pequeñas. Un sustrato puede estar fabricado de un material orgánico, un material inorgánico, un material bioactivo o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de sustratos incluyen obleas de silicio; partículas coloidales cargadas, por ejemplo, micropartículas de CaCO_3 o melamina formaldehído; células biológicas tales como eritrocitos, hepatocitos, células bacterianas y células de levadura; redes poliméricas orgánicas, por ejemplo, poliestireno o redes de 60 copolímeros de estireno; liposomas; orgánulos; y virus. En una realización, un sustrato es un dispositivo médico tal como un marcapasos artificial, un implante coclear o una endoprótesis vascular.

5 Cuando un sustrato se desintegra o se elimina de otra forma durante o después de la formación de la película, se denomina "un molde" (para la formación de película). Las partículas de molde pueden disolverse en disolventes apropiados o eliminarse mediante tratamiento térmico. Si, por ejemplo, se utilizan partículas de molde de melamina-formaldehído parcialmente reticuladas, el molde se puede desintegrar mediante métodos químicos suaves, por ejemplo, en DMSO, o mediante un cambio del valor del pH. Después de la disolución de las partículas de molde, quedan las cubiertas multicapa huecas que están compuestas de capas de polielectrolito alternas.

10 Una "cápsula" es una película de polielectrolito en forma de una cubierta hueca o un recubrimiento que rodea un núcleo. El núcleo comprende una diversidad de encapsulantes distintos, por ejemplo, una proteína, un fármaco o una combinación de los mismos. Las cápsulas con diámetros inferiores a aproximadamente 1 µm se denominan nanocápsulas. Las cápsulas con diámetros mayores a aproximadamente 1 µm se denominan microcápsulas.

15 "Reticulación" significa la formación de un enlace covalente, o de varios enlaces, o de muchos enlaces entre dos o más moléculas.

20 "Molécula bioactiva" significa una molécula, macromolécula o ensamblaje macromolecular que tiene un efecto biológico. El efecto biológico específico se puede medir en un ensayo adecuado y normalizar por unidad de peso o por molécula de la molécula bioactiva. Una molécula bioactiva puede estar encapsulada, retenida detrás, o encapsulada dentro de una película de polielectrolito. Los ejemplos no limitantes de una molécula bioactiva son un fármaco, un cristal de un fármaco, una proteína, un fragmento funcional de una proteína, un complejo de proteínas, una lipoproteína, un oligopéptido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un ribosoma, un agente terapéutico activo, un fosfolípido, un polisacárido, un lipopolisacárido. Como se usa en el presente documento, "molécula bioactiva" abarca adicionalmente estructuras biológicamente activas, tales como, por ejemplo, un fragmento de membrana funcional, una estructura de membrana, un virus, un patógeno, una célula, un agregado de células y un orgánulo.

25 Los ejemplos de una proteína que puede encapsularse o retenerse detrás de una película polipeptídica son la hemoglobina; enzimas, tales como, por ejemplo, la glucosa oxidasa, la ureasa, la lisozima y similares; proteínas de matriz extracelular, por ejemplo, fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno, y un anticuerpo. Los ejemplos de una célula que puede encapsularse o retenerse detrás de una película polipeptídica son células de los islotes trasplantadas, una célula eucariota, una célula bacteriana, una célula vegetal y una célula de levadura.

30 "Biocompatible" significa que no causa ningún efecto adverso sustancial sobre la salud tras la ingestión oral, aplicación tópica, aplicación transdérmica, una inyección subcutánea, inyección intramuscular, inhalación, implantación o inyección intravenosa. Por ejemplo, las películas biocompatibles incluyen las que no provocan una respuesta inmunitaria sustancial cuando están en contacto con el sistema inmunitario de, por ejemplo, un ser humano.

35 "Respuesta inmunitaria" significa la respuesta del sistema inmunitario celular o humoral frente a la presencia de una sustancia en cualquier parte del cuerpo. Una respuesta inmunitaria se puede caracterizar de varias maneras, por ejemplo, por un aumento en el flujo sanguíneo del número de anticuerpos que reconocen un determinado antígeno. Los anticuerpos son proteínas secretadas por los linfocitos B y un inmunógeno es una entidad que suscita una respuesta inmunitaria. El cuerpo humano combate la infección e inhibe la reinfección al aumentar el número de anticuerpos en el torrente sanguíneo y en otros lugares.

40 "Antígeno" significa una sustancia extraña que suscita una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la producción de moléculas de anticuerpo específicas) cuando se introduce en los tejidos de un organismo vertebrado susceptible. Un antígeno contiene uno o más epítopos. El antígeno puede ser una sustancia pura, una mezcla de sustancias (incluyendo células o fragmentos celulares). El término antígeno incluye un determinante antigénico, autoantígeno, antígeno propio, antígeno que reacciona de forma cruzada, aloantígeno, tolerógeno, alergeno, hapteno e inmunógeno adecuados, o partes de los mismos, y combinaciones de los mismos, y estos términos se usan indistintamente. Generalmente, los antígenos son de alto peso molecular y comúnmente son polipéptidos. Se dice que los antígenos que suscitan respuestas inmunitarias fuertes son fuertemente inmunogénicos. El sitio en un antígeno al que se puede unir específicamente un anticuerpo complementario se denomina epítipo o determinante antigénico.

45 "Antigénico" se refiere a la capacidad de una composición para dar lugar a anticuerpos específicos frente a la composición o para dar lugar a una respuesta inmunitaria mediada por células.

50 Como se usa en el presente documento, los términos "epítipo" y la expresión "determinante antigénico" se usan indistintamente y significan la estructura o secuencia de un antígeno, por ejemplo, una proteína o un péptido diseñado, que reconoce un anticuerpo. Normalmente, un epítipo estará en la superficie de una proteína. Un "epítipo continuo" es uno que implica varios restos de aminoácido contiguos, no uno que implica restos de aminoácido que puedan estar en contacto o en la región limitada de espacio en una proteína plegada. Un "epítipo conformacional" implica restos de aminoácido de distintas porciones de la secuencia lineal de una proteína que entran en contacto en la estructura tridimensional de la proteína. Para que se produzca una interacción eficaz entre

el antígeno y el anticuerpo, el epítipo debe estar fácilmente disponible para la unión. Por lo tanto, el epítipo o los determinantes antigénicos están presentes en el entorno celular nativo del antígeno o solo están expuestos cuando están desnaturalizados. En su forma natural, pueden ser citoplásmicos (solubles), estar asociados a membrana o secretarse. El número, el emplazamiento y el tamaño de los epítipos dependerán de cuanto antígeno se presenta durante el proceso de fabricación del anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, una "composición de vacuna" es una composición que suscita una respuesta inmunitaria en un mamífero al que se administra y que protege el organismo inmunizado frente a la exposición posterior con el agente inmunizante o un agente de reactividad cruzada inmunológicamente. La protección puede ser completa o parcial con respecto a la reducción de los síntomas o la infección, en comparación con un organismo no vacunado. Un agente de reactividad cruzada inmunológicamente puede ser, por ejemplo, la proteína completa (por ejemplo, glucosiltransferasa) a partir de la cual se ha obtenido un péptido de subunidad para su uso como inmunógeno. Como alternativa, un agente de reactividad cruzada inmunológicamente puede ser una proteína distinta, que reconocen en su totalidad o en parte los anticuerpos suscitados por el agente inmunizante.

Como se usa en el presente documento, una "composición inmunogénica" pretende abarcar una composición que suscita una respuesta inmunitaria en un organismo al que se administra y que puede o no proteger al mamífero inmunizado frente a una exposición posterior con el agente inmunizante. En una realización, la composición inmunogénica es una composición de vacuna.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis de polipéptidos diseñados (PD)

Los polipéptidos diseñados se obtuvieron de epítipos que se encuentran en secuencias de las proteínas G de RSV, F de RSV o M2 de RSV. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de longitud completa son las siguientes (los epítipos peptídicos seleccionados incorporados en los polipéptidos diseñados están subrayados).

G de RSV- SEQ ID NO:1

1 MSKNKDQRTA KTLERTWDTL NHLLFISSCL YKLNKLSVAQ ITLSILAMII
STSLIIAAII 60

61 FIASANHKVT PTTAIIQDAT SGIKNTTPTY LTQNPQLGIS PSNPSEITSQ
ITTLASTTP 120

121 GVKSTLQSTT VKTKNTTTTQ TQPSKPTTKQ RQNKPPSKPN
NDFHFEVFNF VPCSICSNNP 180

181 TCWAICKRIP NKKPGKTTT KPTKKPTLKT TKKDPKPQTT
KSKEVPTTKP TEEPTINTTK 240

241 TNIITLLTS NTTGNPELTS QMETFHSTSS EGNPSPSQVS TTSEYPSQPS
SPPNTPRQ 298

F de RSV- SEQ ID NO:2

ES 2 688 993 T3

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
GWYTSVITIE 60

61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST
PPTNNRARRE LPRFMNYTLN 120

121 NAKKTNVTLS KKRKRRLFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL
EGEVNLIKSA LLSTNKAVVS 180

181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IEFQKNNRL
LEITREFSVN 240

241 AGVTTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI
VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV 300

301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTDRG
WYCDNAGSVS FFPQAETCKV 360

361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEIN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL
GAIVSCYGKT 420

421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGMDTV SVGNTLYYVN
KQEGKSLYVK GEPIINFYDP 480

481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI
IIIVILLS 540

541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSN 574

M de RSV- SEQ ID NO:3

1 MSRRNPCKFE IRGHCLNGKR CHFSHNYFEW PPHALLVRQN
 FMLNRLKSM DKSIDTLSEI 60
 61 SGAAELDRTE EYALGVVGVL ESYIGSINNI TKOSACVAMS KLLTELNSSD
 IKKLRDNEEL 120
 121 NSPKIRVYNT VISYIESNRK NNKQTIHLLK RLPADVLLKT IKNTLDIHK
 ITINNPKEST 180
 181 DTNDHAKN NDTT 194

5 Los péptidos diseñados se sintetizaron por síntesis de péptidos en fase sólida por etapas usando un sintetizador automatizado Liberty™ (CEM, Matthews, NC) con control de temperatura por microondas. Los péptidos se sintetizaron en soporte de resina de poliestireno amida de Rink o ácido Wang utilizando aminoácidos Fmoc convencionales, activación por HBTU/DIEA y doble acoplamiento de rutina. Después de la síntesis, las resinas se secaron y los péptidos se escindieron por tratamiento con TFA/triisopropilsilano/fenol/3,6-dioxo-1,8-octandiol/agua (86:4:4:3:3) durante dos horas. Los péptidos en brutos se precipitaron con éter, se centrifugaron y se secaron al vacío. Los péptidos se purificaron mediante HPLC de fase inversa en C₁₈ usando un gradiente de agua (ácido trifluoroacético al 0,1 %)/acetonitrilo. La identidad de cada péptido purificado se confirmó mediante espectrometría de masas con atomización electroestática (ESMS). Los rendimientos finales se calcularon por absorción UV a 280 nm y/o análisis de aminoácidos. Los péptidos se alicuotaron, se liofilizaron y se reservaron hasta su uso a -20 °C como sales de trifluoroacetato.

10 La Tabla 1 muestra los epítomos seleccionados de las proteínas G de RSV, F de RSV y M2 de RSV. Cada epítomo se incorporó en un péptido diseñado (PD) mediante la adición de una cola poliiónica C-terminal Lys₂₀ (K₂₀) o una repetición de Lys-Val-Lys-Ala (KVKA)₄. Habitualmente se incorporó una tirosina C-terminal para facilitar la cuantificación por UV. La secuencia nativa de M2 de RSV contiene una cisteína en la posición 96. En los péptidos epitópicos sintéticos este resto se ha reemplazado por una serina (C96S) para evitar enlaces disulfuro indeseados en esa posición.

25 Tabla 1: Secuencias y características de los epítomos de RSV seleccionados.

Designación	Secuencia del epítomo	SEQ ID NO:	Fundamento o descripción
G ₁₆₄₋₁₉₈	HFEVFNFVPCSI CSNNPT CWAIC KRIPNK	4	secuencia conservada que contiene un motivo de quimiocina asociado con inflamación
F ₅₁₋₆₅	GWYTSVITIELSNIK	5	epítomos CD4+ (Th1) conservados que suscitan respuestas de IFN γ
F ₃₃₈₋₃₅₄	DRGWYSDNAGSVSFFRG	6	epítomos CD4+ (Th1) conservados que suscitan respuestas de IFN γ
ACT-2019	ESYIGSINNITKQSA	7	M2 ₈₁₋₉₅ ; diana de linfocitos T CD8+ que muestra modular las respuestas Th2 frente a G de RSV
ACT-2044	HFEVFNFVPCSI CSNNPT CWAICKRIPNKKKKKKKK KKKKKKKKKKKKKY	8	G de RSV ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y amida
ACT-2054	HFEVFNFVXPXSIXSNNPT XWAIXKRIPNKKKKKKKK KKKKKKKKKKKKKY	9	G de RSV ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y amida con restos de cisteína protegidos C* = carboxamido-metilcisteína
G ₁₇₅₋₁₈₄	cyclo-ICSNNPTCWA	10	G de RSV ₁₇₅₋₁₈₄
ACT-2042	NFVPCSI CSNNPTCWAIC KRIPNKKKKKKKKKKKK KKKKKKKKKY	11	G de RSV ₁₆₉₋₁₉₁ K ₂₁ Y

Designación	Secuencia del epítipo	SEQ ID NO:	Fundamento o descripción
ACT-2031	ESYIGSINNITKQSASVA KVKAKVKAKVKAKVKA	12	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ (KVKA) ₄ amida
ACT-2086	ESYIGSINNITKQSASGS HFEVFNFPVPCSI CSNNPT CWAICKRIPNKKKKKKKK KKKKKKKKKKKKKY	13	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₀ Y amida
ACT-2087	NFVPCSI CSNNPTCWAIC KRIPNKKPGKKT KKKKKK KKKKKKKKKKKKKY	14	G de RSV ₁₆₉₋₁₉₈ K ₂₀ Y amida
ACT-2088	HFEVFNFPVPCSI CSNNPT CWAICKRIPNKKPGKKT KKKKKKKKKKKKKKKK KY	15	G de RSV ₁₆₄₋₁₉₈ K ₂₀ Y amida
ACT-2033	ESYIGSINNITKQSASVA KKKKKKKKKKKKKKKK KKY	16	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ K ₂₀ Y amida

Ejemplo 2: Confirmación del plegamiento y la estructura de polipéptidos diseñados que contienen un epítipo conformacional de la proteína G de RSV:

5 La proteína de unión al RSV (proteína G de RSV) contiene cuatro restos de cisteína conservados que forman dos enlaces disulfuro internos emplazados dentro de los aminoácidos 169-191. Los anticuerpos que reconocen esta región pueden neutralizar el RSV, por lo que los péptidos sintéticos restringidos conformacionalmente obtenidos de este segmento pueden ser componentes de vacuna eficaces. Los investigadores anteriores han utilizado una combinación de digestión proteolítica, HPLC y espectrometría de masas para demostrar que la Cys173 está enlazada a la Cys186, y que la Cys176 está enlazada a la Cys182. Los péptidos que contienen restos 169-191 de la proteína G de RSV se sintetizaron por síntesis de péptidos en fase sólida. A pH neutro, estos péptidos se oxidan fácilmente y los productos resultantes parecen contener dos disulfuros internos según se mide por la pérdida de cuatro protones en el espectro de ESMS así como por la señal negativa en un ensayo de Ellman (DTNB). La facilidad con la que se producen las reacciones de oxidación y la limpieza de las conversiones sugieren fuertemente que se están formando disulfuros nativos. En un experimento típico, se disuelven péptidos de G de RSV reducidos (por ejemplo, SEQ ID NO: 8, 11, 13, 14, 15) a una concentración de 1-5 mg/ml en tampón Tris pH 7,4 que contiene glutatión 2,5 mM y glutatiol 2,5 mM. La reacción de plegamiento se controla por HPLC de fase inversa en C₁₈ dado que el producto oxidado muestra un tiempo de retención ligeramente más corto con respecto al péptido reducido. Por este criterio, la reacción de plegamiento se considera acabada después de 2 horas a temperatura ambiente o después de 18 horas a 4 °C

Se analizó una muestra de ACT-2044 plegado (G de RSV₁₆₄₋₁₉₁K₂₁Y amida) (SEQ ID NO: 8) usando espectrometría de masas de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier - electropulverización (FT-ICR MS). El estado de carga MH₆⁺⁶ proporcionó una señal fuerte y el espectro expandido de los picos MH₆⁺⁶ se muestra en la Figura 1. El pico monoisotópico en masa con respecto a la carga (m/z) 1015,6008 corresponde a una masa monoisotópica de 6087.56 amu, lo que está muy cerca de la masa monoisotópica calculada de 6088,51 amu, y este resultado es totalmente congruente con la presencia de dos enlaces disulfuro en ACT-2044. Asimismo, se analizó una muestra de ACT-2086 plegado (M2 de RSV₈₁₋₉₈G₁₆₄₋₁₉₁ K₂₀Y amida (SEQ ID NO: 13) mediante FT-ICR MS y el espectro se muestra en la Figura 2. Se observaron picos robustos para los estados de carga MH₆⁺⁶ - MH₁₀⁺¹⁰. El pico monoisotópico MH₉⁺⁹ tenía una m/z de 867,1571, que corresponde a una masa monoisotópica de 7795,344 amu, lo que está muy cerca de la masa monoisotópica calculada de 7795,33 amu. De nuevo, este resultado es totalmente congruente con la presencia de dos enlaces disulfuro.

Se sometió a digestión con termolisina una muestra de ACT-2044 (G de RSV₁₆₄₋₁₉₁K₂₁Y) (SEQ ID NO: 8). El análisis por HPLC de la digestión demostró el consumo completo del péptido de partida. El espectro de FT-ICR de este producto contenía una mezcla compleja de productos, pero se encontró un ion dominante en m/z 1106,4. Esta especie corresponde al estado de carga MH⁺¹ para G de RSV₁₇₅₋₁₈₄ (ciclo-ICSNN PTCWA (SEQ ID NO: 10) unido por disulfuro intramolecular, masa MH⁺ esperada = 1106,440, encontrada = 1106,438). Este péptido es diagnóstico del enlace disulfuro nativo entre Cys176 y Cys182. En resumen, los datos de la MS FT-ICR apoyan firmemente la argumentación de que ACT-2044 (y los péptidos estrechamente relacionados ACT-2042, (SEQ ID NO: 11), ACT-2086, (SEQ ID NO: 13), ACT-2087, (SEQ ID NO: 14), ACT-2088, (SEQ ID NO: 15)) contienen dos enlaces disulfuro internos en el patrón correcto (nativo).

Ejemplo 3: Procedimiento general para la fabricación de nanopartículas por ECPC:

Las nanopartículas de CaCO₃ (NPCC-111) se obtuvieron de NanoMaterials Technology (Singapur). Los experimentos de microscopía electrónica de barrido (MEB) mostraron que las partículas tienen una morfología cúbica y son de aproximadamente 50 nm de diámetro. Los polipéptidos poli-1-lisina 15 kDa (PLL, n.º de catálogo P6516), ácido poli-1-glutámico 14,5 kDa (PGA, n.º de catálogo P4636) y solución de tampón HEPES 1 M (n.º de catálogo H-3662) se obtuvieron de Sigma- Aldrich (EE. UU.). Los polipéptidos cargados de forma opuesta se dejaron autoensamblar en una película multicapa sobre núcleos de nanopartículas de CaCO₃ en sucesivas etapas de adsorción. Brevemente, la PLL, el PGA o el polipéptido diseñado (PD, donde se indique) se disolvieron a 1 mg/ml (peso/volumen) en HEPES 10 mM, pH 7,4 y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Los núcleos de nanopartículas de CaCO₃ se lavaron tres veces con sin endotoxinas y se centrifugaron a 16.000 g durante 1 minuto en una microcentrífuga. Los núcleos de nanopartículas se resuspendieron al 6 % (peso/volumen) en PGA 1 mg/ml como la primera capa. A pH neutro, el PGA presenta una carga neta negativa mientras que en las partículas de CaCO₃ son netas positivas, permitiendo así la interacción electrostática y la deposición satisfactoria de la primera capa. La mezcla se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se lavó dos veces con tampón HEPES 10 mM y se centrifugó a 48.700 x g durante 1 minuto (ultracentrífuga TL-100, Beckman). Para la deposición de la segunda capa, las nanopartículas se resuspendieron al 6 % (p/v) en PLL 1 mg/ml (carga positiva) y sometieron a ultrasonidos durante 10 minutos a temperatura ambiente como para la primera capa. Cada capa posterior se depositó por el mismo método, usando PGA, PLL o PD, como se indica en la Tabla 2 o la Tabla 3. Normalmente, los péptidos diseñados se recubrieron a una concentración de 0,5-1,0 mg/ml. Después de la deposición de la capa final, las nanopartículas se lavaron dos veces con HEPES 10 mM, pH 7,4, y las alícuotas se centrifugaron, se aspiraron y se reservaron a 4 °C hasta su uso como sedimentos húmedos. Se produjeron varios diseños usando esencialmente el mismo procedimiento y modificando la secuencia y el emplazamiento del péptido diseñado; todas las nanopartículas contienen un total de ocho capas en la biopelícula polipeptídica. Las nanopartículas diseñadas se resumen en la Tabla 2. La concentración de polipéptido o PD en las nanopartículas se determinó mediante análisis de aminoácidos. El tamaño de las nanopartículas se determinó mediante dispersión dinámica de la luz (Malvern Nano S-90) de suspensiones al 0,06 % (p/v) en HEPES, pH 7,4, sometidas a ultrasonido durante 20 minutos en un baño de agua ultrasónico (Branson 1510, EE. UU.) antes de la medición. Los niveles de endotoxina en las nanopartículas se determinaron por el ensayo de lisado de amebocitos de Limulus, un ensayo cromogénico de punto final (n.º 50-647U, Lonza, Walkersville, MD). Las nanopartículas preparadas se reservaron hasta su uso a 4 °C como un sedimento húmedo.

Tabla 2: Diseños de nanopartículas monovalentes. N.º de ACT de refiere a la designación de los distintos diseños de nanopartículas. N.º de PD se refiere a los distintos péptidos diseñados. Secuencia de PD enumera los epítomos de RSV específicos y la cola poliiónica incluidos en cada PD.

N.º de ACT	Capas	N.º ACT de PD	Secuencia de PD
1023	PGA/PLL/PGA/M2 de RSV/PGA/PLL/PGA/PLL	2031	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ (KVKA) ₄ (SEQ ID NO:12)
1041	PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/G de RSV	2042	G de RSV ₁₆₉₋₁₉₁ K ₂₁ Y (SEQ ID NO: 11)
1042	PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/G de RSV	2044	G de RSV ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y (SEQ ID NO:8)

Ejemplo 4: Fabricación y caracterización de las nanopartículas ACT-1077 por ECPC:

Se siguió el procedimiento convencional descrito en el Ejemplo 3. Se usó una solución del péptido diseñado ACT-2031 (M2 de RSV₈₁₋₉₈(KVKA)₄(SEQ ID NO: 12)) 1,0 mg/ml durante la segunda etapa de recubrimiento por ECPC y una solución de péptido diseñado ACT-2044 (G de RSV₁₆₄₋₁₉₁K₂₁Y (SEQ ID NO: 8)) 1,0 mg/ml durante la octava etapa del ECPC. Después de cada etapa de formación de capas, las nanopartículas se lavaron y resuspendieron al 6 %. Se retiró una alícuota de 10 µl y se diluyó en 1,0 ml de tampón HEPES 10 mM para el análisis del potencial de superficie (zeta). La Figura 3 muestra los potenciales zeta de superficie medidos para las nanopartículas en la etapa de lavado del proceso de ECPC. Antes del recubrimiento, las partículas de CaCO₃ presentaron un potencial de superficie positivo de aproximadamente +28 mV. Después del recubrimiento con una única capa de PGA, se midió un potencial de superficie negativo de -18 mV. El recubrimiento con ACT-2031 (SEQ ID NO: 12) en la segunda capa aumentó el potencial zeta a aproximadamente 0 mV, lo que indica la adsorción del péptido. Después de eso, cada etapa de formación de capas efectuó un cambio negativo o positivo en el potencial zeta, lo que indica una adsorción satisfactoria por ECPC. Después de la fabricación, la cantidad de cada péptido diseñado adsorbida se calculó a partir de la señal procedente de aminoácidos exclusivos en el cromatograma de aminoácidos. La glicina es exclusiva de ACT-2031 y puede usarse para determinar la concentración de ACT-2031, mientras que la arginina, la histidina y la fenilalanina son exclusivas de ACT-2044 y pueden usarse para determinar la concentración de ACT-2044. De cuatro lotes distintos, las cantidades promedio de ACT-2031 y ACT-2044 adsorbidas a una suspensión de partículas de CaCO₃ al 1 % fueron de 21 µg/ml y 53 µg/ml, respectivamente.

Ejemplo 5: Fabricación de nanopartículas por ECPC ACT-1086:

El procedimiento de revestimiento por ECPC descrito en el Ejemplo 3 se usó para recubrir nanopartículas de CaCO_3 de 50 nm con siete capas de PGA y PLL. Se utilizó una solución de 0,5 mg/ml de péptido diseñado ACT-2086 (SEQ ID NO: 13; M2 de RSV₈₁₋₉₈G₁₆₄₋₁₉₁K₂₀Y amida), en tampón HEPES 10 mM para recubrir la capa final. La cantidad de péptido diseñado adsorbido se midió mediante análisis de aminoácidos. De tres lotes distintos, la cantidad promedio de ACT-2086 adsorbida a una suspensión de partículas de CaCO_3 al 1 % fue de 37 $\mu\text{g/ml}$.

Ejemplo 6: Fabricación de nanopartículas por ECPC ACT-1139:

El procedimiento de revestimiento por ECPC descrito en el Ejemplo 3 se usó para recubrir nanopartículas de CaCO_3 de 50 nm con siete capas de PGA y PLL. Se usó una solución HEPES 10 mM de los péptidos diseñados ACT-2033 (SEQ ID NO: 16; M2 de RSV₈₁₋₉₈K₂₀Y amida) y ACT-2044 (SEQ ID NO: 8; G de RSV₁₆₁₋₁₉₁K₂₁Y amida) cada uno a una concentración final de 0,25 mg/ml para recubrir la capa final. Las nanopartículas se lavaron, se centrifugaron y se reservaron como sedimentos húmedos a 4 °C. Las cantidades de cada péptido diseñado adsorbido se calcularon a partir de la señal procedente de aminoácidos exclusivos en el cromatograma de aminoácidos. La glicina es exclusiva de ACT-2033 y puede usarse para determinar la concentración de ACT-2033, mientras que la arginina, la histidina y la fenilalanina son exclusivas de ACT-2044 y pueden usarse para determinar la concentración de ACT-2044. A partir de este análisis, se determinó que una suspensión de partículas al 1 % contenía ACT-2033 25 $\mu\text{g/ml}$ y ACT-2044 24 $\mu\text{g/ml}$.

Ejemplo 7: Fabricación de micropartículas por ECPC ACT-1145:

Se obtuvieron micropartículas de CaCO_3 mesoporosas de 3 μm de PlasmaChem GmbH (Berlín, n.º de catálogo PL-CA3). Las partículas se suspendieron al 6 % (peso/volumen) en HEPES 10 mM. Se usó el procedimiento de recubrimiento por ECPC descrito para las nanopartículas de CaCO_3 en el Ejemplo 3, con las siguientes modificaciones. Las micropartículas de CaCO_3 de 3 μm en suspensión acuosa sedimentan fácilmente en condiciones normales de gravedad, por lo que en lugar de un tratamiento con ultrasonidos durante las etapas de formación de capas, las suspensiones se mezclaron suavemente en un rotador durante 10 minutos. Además, después de las etapas de formación de capas y de lavado se pueden usar velocidades de centrifugación más lentas para sedimentar las micropartículas. De este modo, las suspensiones de micropartículas se centrifugaron a 1500 g durante 1 minuto. Para la fabricación de ACT-1145 se usó una solución de PGA 1,0 mg/ml para recubrir la primera capa y una capa de PLL 1,0 mg/ml marcada con fluoresceína (PLL-FITC, Sigma n.º de catálogo P3543) para la segunda capa. Para las siguientes cinco etapas de formación de capas se usaron PGA y PLL para revestir las micropartículas con un total de siete capas de polipéptido (estas partículas se pueden usar en un experimento de reticulación de amida como se describe en el Ejemplo 8). Se utilizó una solución de ACT-2086 (SEQ ID NO: 13; M2 de RSV₈₁₋₉₈G₁₆₄₋₁₉₁K₂₀Y amida) 0,5 mg/ml para recubrir la capa final. Las micropartículas se lavaron, centrifugaron y reservaron a 4 °C como sedimentos húmedos. La cantidad de ACT-2086 adsorbida a las partículas se calculó mediante análisis de aminoácidos y se encontró que era de 43 $\mu\text{g/ml}$ para una suspensión de partículas al 1 %. Las partículas se examinaron mediante microscopía de fluorescencia y se encontró que eran esféricas con un diámetro de 3,0 (+/- 1,5) μm . Las partículas eran partículas individuales bien dispersas con algunos agregados de dos o tres partículas.

Ejemplo 8: Fabricación de micropartículas por ECPC ACT-1146:

El procedimiento del Ejemplo 7 se usó para fabricar micropartículas de CaCO_3 de 3 μm con siete capas de polipéptidos (PGA/PLL-FITC/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA). Se preparó una solución de tampón de fosfato de sodio 0,2 M pH 6,5 que contenía de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Sigma, n.º de catálogo E6383) 38 mg/ml (0,20 M) y sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS, Sigma n.º de catálogo 56485) 11 mg/ml (0,05 M). Las micropartículas de siete capas se suspendieron en la solución de EDC/ sulfo-NHS para dar una suspensión al 3 %. La suspensión se mezcló suavemente durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego las partículas se centrifugaron y se lavaron tres veces con tampón HEPES 10 mM. Se utilizó una solución de ACT-2086 (SEQ ID NO: 13; M2 de RSV₈₁₋₉₈G₁₆₄₋₁₉₁K₂₀Y amida) 0,5 mg/ml para recubrir la capa final. Las micropartículas se lavaron, centrifugaron y reservaron a 4 °C como sedimentos húmedos. La cantidad de ACT-2086 adsorbida a las partículas se calculó mediante análisis de aminoácidos y se encontró que era de 49 $\mu\text{g/ml}$ para una suspensión de partículas al 1 %.

Ejemplo 9: Fabricación de microcápsulas por ECPC ACT-1147:

Las micropartículas de CaCO_3 ACT-1146 del Ejemplo 8 se suspendieron al 6 % (peso/volumen) en una solución de EDTA de sodio 0,5 M, pH 8,0. Las partículas se mezclaron suavemente a temperatura ambiente durante 30 minutos, se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 g y se aspiró la solución de EDTA. Las microcápsulas resultantes se resuspendieron dos veces en tampón HEPES 10 mM y se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 g para eliminar el exceso de sales. Las microcápsulas de centrifugaron, se aspiraron y reservaron 4 °C como un sedimento húmedo. La cantidad de ACT-2086 adsorbida a las cápsulas se calculó mediante análisis de aminoácidos y se encontró que

era de 41 µg/ml para una suspensión de partículas al 1 %. Las cápsulas se examinaron mediante microscopía de fluorescencia y se encontró que eran esféricas con un diámetro de 3,0 (+/- 1,5) µm. Las cápsulas eran cápsulas individuales bien dispersas con algunos agregados de dos o tres cápsulas.

5 Ejemplo 10: Inmunogenicidad de las nanopartículas monovalentes de G de RSV:

Se inmunizaron ratones BALB/c tres veces con nanopartículas de ACT-1042 (PD SEQ ID NO: 8; G de RSV₁₆₄₋₁₉₁) a través de inyección en la almohadilla plantar, y se recogieron y analizaron sueros mediante ELISA. Los sueros reconocieron el péptido epitópico de CX3C de G de RSV conformacional ACT-1042 (Figura 4), pero no una versión del mismo péptido (ACT-2054) que se linealizó protegiendo los restos de cisteína (Figura 5). Los sueros también reconocieron la proteína G de RSV nativa (Figura 6), lo que sugiere que la inmunización con la nanopartícula por ECPC de G de RSV suscitó respuestas de anticuerpos dependientes de la conformación. La actividad biológica de la respuesta de anticuerpos suscitada por ACT-1042 se confirmó en ensayos que miden la inhibición de la unión de la quimiocina CX3C de G de RSV (Figura 7) y la inhibición de la migración de CMSP humanas hacia G de RSV purificada (Figura 8). Por lo tanto, un nuevo diseño de vacuna de nanopartículas que incorpora un péptido diseñado basado en el epítipo de CX3C de G de RSV restringido conformacionalmente puede suscitar respuestas de anticuerpos biológicamente relevantes.

20 Ejemplo 11: Inmunogenicidad de las nanopartículas monovalentes de M2 de RSV:

Se inmunizaron ratones BALB/c con nanopartículas de ACT-1023 (M2 de RSV₈₁₋₉₈) (PD SEQ ID NO: 12) por vía s.c. (subcutánea), i.p. (intraperitoneal), i.n. (intranasal) o a través de la almohadilla plantar. Se inmunizaron por vía s.c. ratones de control positivo con el péptido ACT-2019 (M2 de RSV₈₁₋₉₅; SEQ ID NO: 7) en adyuvante completo de Freund (ACF) y reestimularon con ACT-2019 en adyuvante incompleto de Freund (AIF); sirvieron como controles negativos ratones sin tratamiento previo. 14 días después de la inmunización se midieron en los bazo las respuestas de linfocitos T en ensayos ELISPOT de IL-4 e IFN γ . Los datos de la Figura 9 muestran que la inmunización con ACT-1023 indujo ELISPOT de IL-4 débiles, como se esperaba para el epítipo CD8 contenido en el PD. Por el contrario, los ratones inmunizados a través de la almohadilla plantar produjeron respuestas vigorosas después de una única inmunización. Los grupos de s.c. e i.p. produjeron respuestas menos potentes que pese a eso eran comparables con el grupo de ACF de control positivo. El suministro intranasal no parece ser inmunogénico en este experimento. La inmunización con péptido solo produjo bajos niveles de respuestas IFN γ . Por lo tanto, los inventores confirmaron que la potencia del péptido de M2 de RSV aumenta significativamente incluyéndolo en una nanopartícula por ECPC.

35 Ejemplo 12: Inmunogenicidad mejorada de las nanopartículas de G de RSV y M2 de RSV cuando se combinan en una vacuna de cóctel multivalente:

La inmunización de ratones con una vacuna de nanopartículas monovalente suscitó las respuestas inmunitarias predichas (véanse las Figuras 4-8 y 9). Es interesante observar que las respuestas de anticuerpos representadas en las Figuras 4-8 precisaron tres inmunizaciones (sensibilización + dos refuerzos) mientras que las respuestas de linfocitos T representadas en la Figura 9 precisaron solamente una única inmunización (cebado). Para determinar si una vacuna de nanopartículas multivalente que contiene tanto G de RSV como M2 de RSV podría mejorar la potencia inmunitaria del componente G de RSV, se inmunizaron ratones con una mezcla de nanopartículas de G de RSV (ACT-1042, 1 µg de PD por dosis) y M2 de RSV (ACT-1023, 5 µg de PD por dosis) suministradas a través de la almohadilla plantar o por vía intranasal. Se midieron por ELISA los títulos de anticuerpos posensibilización y posrefuerzo, y las respuestas de linfocitos T posrefuerzo se controlaron mediante ELISPOT. Ninguno de los ratones que recibió alguna de las construcciones tuvo una respuesta de anticuerpos primaria medible (datos no mostrados). La Figura 10 muestra los resultados del ELISA posrefuerzo que mide las IgG específicas para G de RSV. En los ratones que solo recibieron ACT-1042, solo la administración a través de la almohadilla plantar dio como resultado un título detectable. La adición de la nanopartícula de M2 de RSV en el grupo de la almohadilla plantar produjo títulos de anticuerpos iguales a los inducidos por 5 µg de péptido de G de RSV en ACF. La administración intranasal de la mezcla suscitó títulos casi iguales a los de la inyección en la a.p. (forma siglada de almohadilla plantar) de la nanopartícula de G de RSV sola, mientras que la administración i.n. de nanopartículas de G de RSV solas no suscitó títulos detectables de anticuerpos en el refuerzo. Estos resultados demuestran que la inclusión de la nanopartícula de M2 de RSV parece aumentar la potencia del epítipo para el anticuerpo de G de RSV y que la administración i.n. de nanopartículas puede suscitar una respuesta inmunitaria.

Se midieron mediante ELISPOT las respuestas de linfocitos T de los mismos ratones. La Figura 11 muestra que los ratones inmunizados a través de la a.p. con la nanopartícula que contiene M2 de RSV o el cóctel montaron una respuesta de linfocitos T frente el epítipo de M2 que era casi por completo IFN γ , como cabía esperar. Cuando se administran por vía intranasal, la nanopartícula de M2 de RSV sola (ACT-1023) no logró suscitar una respuesta de linfocitos T. Por el contrario, la coadministración de las nanopartículas de M2 de RSV y G de RSV (mezcla) suscitó una potente respuesta de IFN γ que era comparable a la inducida por la inmunización por la almohadilla plantar con M2 de RSV sola.

65

Las respuestas de los linfocitos T también se examinaron en un ensayo de CTL *in vivo* que mide la actividad de los linfocitos T citotóxicos en el animal hospedador. En la cohorte monovalente, se inmunizaron ratones BALB/c a través de la almohadilla plantar con una única inyección de PBS (control negativo), péptido ACT-2031 (M2 de RSV) en adyuvante incompleto de Freund (AIF) o nanopartícula ACT-1023 (M2 de RSV). En la cohorte multivalente, los ratones se inmunizaron con PBS, péptido ACT-2031 (M2 de RSV) más péptido ACT-2044 (G de RSV) en AIF o ACT-1023 (M2 de RSV) más ACT-1042 (G de RSV). Siete días después, se prepararon células diana para M2 de RSV pulsando con péptido ACT-2031 células del bazo singénicas sin tratamiento previo y marcando con una alta dosis de indicador fluorescente CFSE, mientras que se prepararon células diana de control marcando células del bazo singénicas sin tratamiento previo con una dosis baja de CFSE y sin péptido diana. Las dos poblaciones de células marcadas con CFSE se mezclaron en una relación de 1:1 y se inyectaron i.v. 5×10^6 células en los ratones inmunizados, alojándose en el bazo del huésped. Después de 24 horas, se sacrificaron los ratones inmunizados y se analizaron células del bazo en cuanto a la fluorescencia de CFSE, para controlar la supervivencia de las dos poblaciones de células. En la Figura 12, los picos más a la izquierda de los histogramas representan las células diana de control supervivientes y los picos más a la derecha representan las células diana marcadas con M2 de RSV supervivientes. Como cabía esperar, ambas poblaciones de células sobrevivieron por igual en los ratones no inmunes (PBS). Por el contrario, en los ratones inmunizados con péptido ACT-2031/AIF se destruyó aproximadamente el 18 % de las células diana de M2 de RSV (comparar el tamaño del pico derecho con el tamaño del pico izquierdo en el histograma para ACT-2031/AIF). Se obtuvieron resultados similares en los ratones inmunizados con una dosis alta (75 μg) de nanopartícula ACT-1023, en comparación con la ausencia de destrucción de células diana marcadas en ratones inmunizados con una dosis más baja (10 μg) de ACT-1023. En los ratones inmunizados con una combinación de los dos péptidos o las dos nanopartículas, se observó un mayor grado de destrucción de las células diana marcadas. Específicamente, los ratones inmunizados con el cóctel de nanopartículas (ACT-1023 + ACT-1042 a 10 μg cada una) destruyeron el 35 % de las células diana marcadas con M2 de RSV, lo que es más alto que la respuesta inducida incluso por una alta dosis de inmunización monovalente (ACT-1023/75 μg). El porcentaje de destrucción específica de las células diana marcadas con M2 de RSV se resume en la Figura 13. Estos resultados coinciden con los números de ELISPOT de $\text{IFN}\gamma$ aumentados detectados en ratones inmunizados con el cóctel de nanopartículas G de RSV y M2 de RSV (véase la Figura 10, 11). Estos datos sugieren que la combinación de nanopartículas de G de RSV y M2 de RSV en una vacuna cóctel proporciona una mejora mutua en la potencia inmunitaria de ambos componentes. Aunque la mejora en la respuesta de anticuerpos frente a G de RSV (Figura 10) podría atribuirse a la ayuda de linfocitos T suscitados por M2 de RSV, la mejora recíproca en la respuesta de linfocitos T frente a M2 de RSV después de la administración intranasal del cóctel (Figura 11) fue inesperada.

Ejemplo 13: Diseño de partículas multivalentes

Se diseñaron nanopartículas adicionales para incluir múltiples epítomos en la misma partícula, ya sea como PD separados depositados de forma conjunta en capas en la misma partícula o como un PD de fusión que contiene tanto los epítomos G de RSV como M2 de RSV. La Tabla 3 describe la arquitectura de nanopartículas de RSV de múltiples epítomos y la Tabla 4 describe las secuencias de PD usadas en cada una. Las nanopartículas ACT-1077 a -1079 contienen el epítomo de linfocitos T de M2 de RSV en una o múltiples capas y el epítomo de linfocitos B de G de RSV en la 8ª capa. Las nanopartículas ACT-1086 a -1088 contienen los péptidos con dos epítomos ACT-2086 a -2088, respectivamente, depositados solamente en la 8ª capa. Pueden preverse diseños adicionales usando estos u otros epítomos de RSV, ya sea depositados de forma conjunta en capas o en un único péptido de fusión.

Tabla 3: Arquitectura de nanopartículas de RSV multivalentes, micropartículas de RSV y diseños de microcápsulas de RSV. ACT-1077 a -1079 contienen dos PD separados depositados en distintas capas en la misma nanopartícula de ECPC. ACT-1139 contiene dos PD separados depositados en la 8ª capa en la misma nanopartícula de ECPC. ACT-1086 a -1088 contienen un único péptido de fusión que incorpora los epítomos diana de anticuerpos y de los linfocitos T depositados en la 8ª capa de nanopartículas de C. ACT-1145 y -1146 contienen un único péptido de fusión que incorpora los epítomos diana de anticuerpos y de los linfocitos T depositados en la 8ª capa de las micropartículas de C. ACT-1147 contiene un único péptido de fusión que incorpora los epítomos diana de anticuerpos y de los linfocitos T depositados en la 8ª capa de las microcápsulas de ECPC.

N.º de ACT	Capas	N.º ACT de PD	Secuencia de PD
1077	PGA/M2 de RSV/(PGA/PLL) ₂ /PGA/G de RSV	2031	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ (KVKA) ₄ (SEQ ID NO:12)
		2044	G de RSV ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y (SEQ ID NO:8)
1078	(PGA/M2 de RSV) ₂ /PGA/PLL/PGA/G de RSV	2031	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ (KVKA) ₄ (SEQ ID NO:12)
		2044	G de RSV ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y (SEQ ID NO:8)
1079	(PGA/M2 de RSV) ₃ /PGA/G de RSV	2031	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ (KVKA) ₄ (SEQ ID NO:12)
		2044	G de RSV ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y (SEQ ID NO:8)

N.º de ACT	Capas	N.º ACT de PD	Secuencia de PD
1086	(PGA/PLL) ₃ /PGA/G+M2 de RSV	2086	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:13)
1087	(PGA/PLL) ₃ /PGA/G de RSV	2087	G de RSV ₁₆₉₋₁₉₈ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:14)
1088	(PGA/PLL) ₃ /PGA/G de RSV	2088	G de RSV ₁₆₄₋₁₉₈ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:15)
1139	PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/M2 de RSV + G de RSV mezcladas	2033	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ K ₂₀ Y (SEQ ID NO: 16)
		2044	G de RSV ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₁ Y (SEQ ID NO:8)
1145	PGA/PLL-FITC/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/G de RSV	2086	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:13)
1146	PGA/PLL-FITC/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/G de RSV	2086	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:13)
1147	PGA/PLL-FITC/PGA/PLL/PGA/PLL/PGA/G de RSV	2086	M2 de RSV ₈₁₋₉₈ G ₁₆₄₋₁₉₁ K ₂₀ Y (SEQ ID NO:13)

Tabla 4: Secuencias de PD de RSV usados en los diseños de nanopartículas de ECPC multivalentes de la Tabla 3. Los epítomos de linfocitos B se muestran subrayados, los epítomos de linfocitos T se muestran en negrita, las cisteínas conservadas están sombreadas, las secuencias que no son nativas se muestran en cursiva.

5

	seq. de la proteína M2	enlace	secuencia de la proteína G	cola
ACT-2031	ESYIG SINNIT KQSAS VA SEQ ID NO:12			(KVKA) ₄ SEQ ID NO:16
ACT-2033	ESYIG SINNIT KQSAS VA SEQ ID NO:12			K ₂₀ Y SEQ ID NO: 17
ACT-2042			<u>NFVPCSICSNNPTCWAI</u> <u>CKRIPN</u> SEQ ID NO:18	K ₂₁ Y SEQ ID NO: 19
ACT-2044			<u>HFEVFNFVPCSICSNNP</u> <u>TCWAICKRIPN</u> SEQ ID NO:20	K ₂₁ Y
ACT-2086	ESYIG SINNIT KQSA SEQ ID NO:7	SGS	<u>HFEVFNFVPCSICSNNP</u> <u>TCWAICKRIPN</u> SEQ ID NO:21	K ₂₀ Y
ACT-2087			<u>NFVPCSICSNNPTCWAI</u> <u>CKRIPNKKPGKKT</u> SEQ ID NO:22	K ₂₀ Y
ACT-2088			<u>HFEVFNFVPCSICSNNP</u> <u>TCWAICKRIPNKKPGK</u> KT SEQ ID NO:23	K ₂₀ Y

Ejemplo 14: Dependencia de la dosis de las construcciones PD-nanopartícula

10

Se utilizó la misma dosis de péptido diseñado (1 µg) en los grupos de control positivo (ACF) y de nanopartícula (1042). En experimentos previos, se usaron 5-10 µg para el ACF y 1 µg para la nanopartícula. Estos resultados muestran que a dosis equivalentes las nanopartículas son más inmunogénicas que el control de ACF.

Tabla 5: Grupos para el estudio de mezcla de RSV

Grupo	Descripción
1	Sin tratamiento previo
2	(ACT-2044 + ACT-2031)/CFA(IFA) s.c
3	ACT-1042 1 µg a.p.
4	ACT-1042 1 µg + ACT-1023 1 µg a.p.
5	ACT-1077 1 µg a.p.
6	ACT-1078 1 µg a.p.
7	ACT-1079 1 µg a.p.

Los datos se muestran en las Figuras 14-16.

5 Ejemplo 15: Tiolación de ácido poli-L-glutámico (PGA-SH) y unión del péptido que contiene cisteína.

Se disolvieron 32 mg de sal sódica de PGA de peso molecular medio (comercializada por Sigma) en 1,0 ml de tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2. Se añadieron 22 mg de etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y 15 mg de sulfo-NHS, y la solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron 4,6 mg de sal de cistamina HCl y la solución se dejó reaccionar durante 90 min. El producto se purificó mediante el paso por una columna Desalt® (vendida por Pierce) preequilibrada con tampón de acetato diluido a pH 4,5. El eluyente se congeló y conservó a -80 °C. El grado de tiolación se estimó mediante el ensayo de Ellman (DTNB) y se encontró que era aproximadamente el 24 % del total de restos de glutamato.

15 Un péptido sintético que contiene un epítipo de linfocito T conocido de la proteína G de RSV (G de RSV restos 186-198, SEQ ID NO: 24 CKRIPNKKPGKKT) se puede sintetizar fácilmente mediante métodos de síntesis de péptidos en fase sólida convencionales. Se pueden tratar 15 mg de PGA-SH en 0,5 ml de tampón de fosfato pH 7 con 0,4 mg de DTNB (~1,0 µmol) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución se volverá amarilla. La reacción de activación puede controlarse mediante espectroscopía UV y considerarse acabada cuando no hay un aumento mayor de la absorbancia como 412 nm. Después se pueden añadir 1,5 mg de epítipo peptídico que contiene cisteína (~ 1 umol) y se deja reaccionar la solución durante 10 min. El producto se puede purificar parcialmente por diálisis usando un tubo de diálisis de PM 5000 de límite y la carga de péptido se puede confirmar mediante análisis de aminoácidos.

25 Ejemplo 16: Unión tioéter de un péptido epitópico a PGA-SH.

Puede sintetizarse un péptido sintético que contiene un epítipo de linfocito T conocido de la proteína G de RSV (G de RSV restos 187-198, SEQ ID NO: 25 KRIPNKKPGKKT) en una resina de síntesis de péptidos en fase sólida. Antes de la escisión de la resina, se puede instalar un grupo bromoacetilo en el N-terminal tratando la resina con anhídrido bromoacético. Después de la escisión y purificación de la resina, se pueden añadir 1,5 mg (~1 umol) del péptido (bromoacetil-KRIPNKKPGKKT) a una solución de 15 mg de PGA-SH en tampón de fosfato pH 7. El producto se puede purificar parcialmente por diálisis usando un tubo de diálisis de PM 5000 de límite y la carga de péptido se puede confirmar mediante análisis de aminoácidos.

35 Ejemplo 17: Reticulación de un péptido epitópico que contiene cisteínas con PLL.

Se mezcla una solución madre de PLL de PM mediano (vendida por Sigma) a una concentración conveniente, normalmente 0,5-50 mg/ml y a pH casi neutro, normalmente pH 6-8, con un reticulante tal como sulfosuccinimidil 4-[N-maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC). La cantidad de sulfo-SMCC puede variar, pero se usa una cantidad suficiente para modificar entre el 1-25 % de los restos de lisina de la PLL. El tiempo de reacción típico es de 0,5-5 horas. Después, se elimina el exceso de reactivo sulfo-SMCC pasando la solución de reacción en una columna de filtración en gel o mediante diálisis. Después, la PLL modificada se deja reaccionar con un ligero exceso de péptido epitópico que contiene cisteína a pH casi neutro, normalmente pH 6-8. El conjugado de PLL-epítipo final se purifica pasando la solución por una columna de filtración en gel o mediante diálisis. Este reactivo será adecuado para la incorporación en una película de polielectrolitos por ECPC mediante métodos usados de forma similar para la PLL.

Ejemplo 18: Protección frente a la exposición al RSV después de la inmunización de ratones con nanopartículas

50 El día 28 los ratones se expusieron por vía intranasal a RSV y se sacrificaron 5 días después. Se recogieron los pulmones y se homogeneizaron, y se midieron los títulos víricos mediante ensayo en células Vero y mediante amplificación por qPCR del gen M de RSV. Los resultados (Figura 17) demuestran una protección esencialmente

completa con cualquier formulación que contenga G de RSV (grupos 3-6). En este estudio, M2 de RSV sola no protegió, ni la vacuna multivalente funcionó mejor que G de RSV sola, posiblemente debido a la dosis relativamente alta usada (10 µg).

- 5 Ejemplo 19: Inmunogenicidad de nanopartículas multivalentes que contienen epítopos de G de RSV y M2 de RSV en la misma capa o en capas distintas.

10 Se inmunizaron ratones el día 0 mediante inyección de las construcciones de nanopartículas de RSV en la almohadilla plantar trasera; los inmunógenos incluían ACT-1023 (M2 de RSV), ACT-1042 (G de RSV) + ACT-1023 (M2 de RSV), ACT-1086 (péptido de fusión de M2+G de RSV en una única capa) y ACT-1077 (péptidos G de RSV + M2 de RSV en capas distintas). El día 7, los ratones se desafiaron con células diana marcadas con CFSE y cargadas con M2 de RSV. Al día siguiente, se analizaron las células de bazo por citometría de flujo para detectar la supervivencia de las células diana marcadas con CFSE. Los resultados (Figuras 18 y 19) muestran que aunque la inmunización con cualquier nanopartícula que contiene el epítipo de M2 de RSV suscita células efectoras específicas para M2 de RSV, la respuesta fue más potente en ratones inmunizados con construcciones multivalentes (M2 + G de RSV) que en ratones inmunizados con construcciones monovalentes (M2 de RSV).

20 En un estudio distinto, se inmunizaron ratones los días 0 y 21 mediante inyección de las construcciones de nanopartículas de RSV en la almohadilla plantar trasera; los inmunógenos incluían ACT-1023 (M2 de RSV), ACT-1042 (G de RSV), ACT-1042 + ACT-1023, ACT-1086 (péptido de fusión de M2+G de RSV en una única capa) y ACT-1139 (péptidos G de RSV + M2 de RSV cargados juntos en la misma capa). Los ratones se sangraron el día 28 y se analizaron por ELISA los sueros en cuanto a anticuerpos específicos para G de RSV. Los resultados (Figuras 20, 21) muestran que todas las formulaciones que contenían el epítipo de G de RSV suscitaban títulos de anticuerpos, mientras que la nanopartícula multivalente de ACT-1139 parecía ser la más potente.

25 Se ha de considerar que el uso de los términos "un" y "una", y "el/la" y los términos (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente en el contexto. Los términos primero, segundo, etc., como se usa en el presente documento, no pretenden denotar ningún orden particular, sino que simplemente denotan por conveniencia una pluralidad de, por ejemplo, capas. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero sin limitación"), a menos que se indique otra cosa. La enumeración de intervalos de valores está destinada simplemente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se recitara individualmente en el presente documento. Los valores extremos de todos los intervalos están incluidos dentro del intervalo y son combinables de forma independiente. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en un orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o del lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como"), pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no plantear una limitación en el alcance de la invención a menos que se afirme lo contrario. Ninguna expresión de la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención como se usa en el presente documento.

45 Aunque la invención se ha descrito con referencia a una realización ejemplar, los expertos en la materia entenderán que se pretende que la invención no se limite a la realización particular divulgada como el mejor modo contemplado para llevar a cabo la presente invención, sino que la invención incluya todas las realizaciones que se encuentren dentro del alcance de la reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Artificial Cell Technologies
Powell, Thomas J.
Boyd, James
- 55 <120> COMPOSICIONES ANTIGÉNICAS Y MÉTODOS PARA EL VIRUS RESPIRATORIO SINCIAL
- <130> ATE0019US4
- 60 <150> 61/485669
<151> 13-05-2011
- <150> 61/362029
<151> 07-07-2010

65

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 298

<212> PRT

<213> virus respiratorio sincial

10

<400> 1

ES 2 688 993 T3

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Arg Thr
1 5 10 15

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys
20 25 30

Leu Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
35 40 45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
50 55 60

Ala Asn His Lys Val Thr Pro Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr
65 70 75 80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln
85 90 95

Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr
100 105 110

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser
115 120 125

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn
145 150 155 160

ES 2 688 993 T3

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
 165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
 180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu
 195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu
 210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
 225 230 235 240

Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro
 245 250 255

Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly
 260 265 270

Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln
 275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln
 290 295

<210> 2
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> virus respiratorio sincial

5

<400> 2

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
 65 70 75 80

ES 2 688 993 T3

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe

ES 2 688 993 T3

<400> 3

Met Ser Arg Arg Asn Pro Cys Lys Phe Glu Ile Arg Gly His Cys Leu
1 5 10 15

Asn Gly Lys Arg Cys His Phe Ser His Asn Tyr Phe Glu Trp Pro Pro
20 25 30

His Ala Leu Leu Val Arg Gln Asn Phe Met Leu Asn Arg Ile Leu Lys
35 40 45

Ser Met Asp Lys Ser Ile Asp Thr Leu Ser Glu Ile Ser Gly Ala Ala
50 55 60

Glu Leu Asp Arg Thr Glu Glu Tyr Ala Leu Gly Val Val Gly Val Leu
65 70 75 80

Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Cys
85 90 95

Val Ala Met Ser Lys Leu Leu Thr Glu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Lys
100 105 110

Lys Leu Arg Asp Asn Glu Glu Leu Asn Ser Pro Lys Ile Arg Val Tyr
115 120 125

Asn Thr Val Ile Ser Tyr Ile Glu Ser Asn Arg Lys Asn Asn Lys Gln
130 135 140

Thr Ile His Leu Leu Lys Arg Leu Pro Ala Asp Val Leu Lys Lys Thr
145 150 155 160

Ile Lys Asn Thr Leu Asp Ile His Lys Ser Ile Thr Ile Asn Asn Pro
165 170 175

Lys Glu Ser Thr Asp Thr Asn Asp His Ala Lys Asn Asn Asp Thr Thr
180 185 190

- 5 <210> 4
- <211> 29
- <212> PRT
- <213> virus respiratorio sincicial

10 <400> 4

His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn
1 5 10 15

Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
20 25

ES 2 688 993 T3

<220>
 <223> G de RSV164-191K21Y amida con restos de cisteína protegidos

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es carboxamidometilcisteína

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es carboxamidometilcisteína

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es carboxamidometilcisteína

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es carboxamidometilcisteína

25 <400> 9

His	Phe	Glu	Val	Phe	Asn	Phe	Val	Pro	Xaa	Ser	Ile	Xaa	Ser	Asn	Asn
1				5					10					15	
Pro	Thr	Xaa	Trp	Ala	Ile	Xaa	Lys	Arg	Ile	Pro	Asn	Lys	Lys	Lys	Lys
			20					25						30	
Lys															
		35					40					45			
Lys	Tyr														
	50														

30 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> ciclo-G de RSV 175-184

<400> 10

				Ile	Cys	Ser	Asn	Asn	Pro	Thr	Cys	Trp	Ala
				1				5					10

40 <210> 11
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> G de RSV169-191K21Y

<400> 11

ES 2 688 993 T3

Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
 1 5 10 15

Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 20 25 30

Lys Tyr
 35 40 45

5 <210> 12
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> M2 de RSV81-98 (KVKA)4 amida
 <400> 12

Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ala Lys Val Lys Ala Lys Val Lys Ala Lys Val Lys Ala Lys Val
 20 25 30

Lys Ala

15 <210> 13
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> M2 de RSV81-98G164-191 K20Y amida
 <400> 13

Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Gly Ser His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser
 20 25 30

Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
 35 40 45

Lys
 50 55 60

25 Lys Lys Tyr
 65

ES 2 688 993 T3

<210> 14
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> G de RSV169-198 K20Y amida
 <400> 14
 10
 Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
 1 5 10 15
 Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Lys Lys
 20 25 30
 Lys
 35 40 45
 Lys Lys Tyr
 50
 <210> 15
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> G de RSV164-198 K20Y amida
 20
 <400> 15
 His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn
 1 5 10 15
 Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly
 20 25 30
 Lys Lys Thr Lys
 35 40 45
 Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
 50 55
 25
 <210> 16
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> RSV M2 81-98 K20Y amida
 <400> 16
 35
 Glu Ser Tyr Ile Gly Ser Ile Asn Asn Ile Thr Lys Gln Ser Ala Ser
 1 5 10 15

ES 2 688 993 T3

Val Ala Lys
 20 25 30

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
 35

5 <210> 17
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> K20Y cola
 <400> 17

Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Tyr
 20

15 <210> 18
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de la proteína G
 <400> 18

Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
 1 5 10 15

Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn
 20

25 <210> 19
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> K21Y cola
 <400> 19

Lys
 1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Tyr
 20

40 <210> 20
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 688 993 T3

<220>

<223> Secuencia de la proteina G

<400> 20

5

His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn
1 5 10 15

Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn
20 25

<210> 21

<211> 28

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteina G

15

<400> 21

His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn
1 5 10 15

Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn
20 25

20

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia de la proteina G

<400> 22

Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
1 5 10 15

Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr
20 25 30

30

<210> 23

<211> 34

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteina G

40

<400> 23

His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn
1 5 10 15

Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly
20 25 30

Lys Lys

ES 2 688 993 T3

5
<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> G de RSV restos 186-198

10
<400> 24

 Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr
 1 5 10

15
<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> G de RSV restos 187-198

<400> 25

 Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca,
5 en donde dicha película multicapa comprende un epítipo de la proteína M2 de RSV y un epítipo de la proteína G de RSV, consistiendo dichos epítipos en 3 a 120 aminoácidos, como parte de uno o más polipéptidos diseñados, en donde un polipéptido diseñado es un polipéptido que consiste en una o más regiones de absorción a superficie cargadas de al menos 8 aminoácidos unidos covalentemente al epítipo de la proteína M2 de RSV, el epítipo de la proteína G de RSV, o ambos, que tienen carga suficiente para la unión estable a una superficie cargada de forma opuesta, y en donde el polipéptido diseñado y las una o más regiones de absorción a superficie cargadas en el mismo están cargadas de forma positiva o cargadas de forma negativa,
10 en donde dicha película multicapa comprende dos o más capas de polielectrolitos, en donde las capas adyacentes comprenden polielectrolitos cargados de forma opuesta, en donde al menos un polielectrolito de la película multicapa es dicho uno o más polipéptidos diseñados y
15 en donde un polielectrolito que no es un polipéptido diseñado comprende un material policatiónico o un material polianiónico que tiene un peso molecular de más de 1.000 y al menos 5 cargas por molécula.
2. La película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca de la reivindicación 1, en donde el polipéptido diseñado tiene al menos 15 aminoácidos de longitud y tiene una carga neta por resto a pH neutro de más de o igual a 0,1.
3. La película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca de la reivindicación 1, en donde el epítipo de la proteína M2 de RSV y el epítipo de la proteína G de RSV están presentes en un único polipéptido diseñado.
25
4. La película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca de la reivindicación 1, en donde el epítipo de la proteína M2 de RSV y el epítipo de la proteína G de RSV están presentes en distintos polipéptidos diseñados.
30
5. La película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca de la reivindicación 1, en donde el epítipo de la proteína M2 de RSV suscita una respuesta citotóxica o de linfocitos T auxiliares específica y el epítipo de la proteína G de RSV suscita una respuesta de anticuerpos específica.
35
6. La película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca de la reivindicación 1, en donde el epítipo de la proteína M2 de RSV comprende la SEQ ID NO: 7 y el epítipo de la proteína G de RSV comprende la SEQ ID NO: 4.
7. La película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca de la reivindicación 1, en donde dos o más de las capas de la película multicapa están reticuladas covalentemente.
40
8. La película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca de la reivindicación 7, en donde dos o más de las capas de la película multicapa están reticuladas covalentemente mediante enlaces amida.
45
9. La película de polielectrolitos multicapa depositada sobre una micropartícula núcleo o una nanopartícula núcleo, o en forma de una microcápsula hueca o una nanocápsula hueca de la reivindicación 7, en donde dos o más de las capas de la película multicapa están reticuladas covalentemente mediante enlaces disulfuro.
50

Figura 1

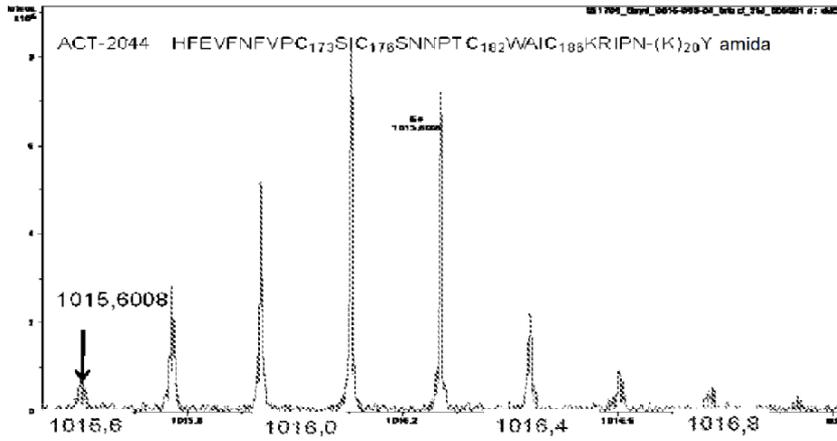
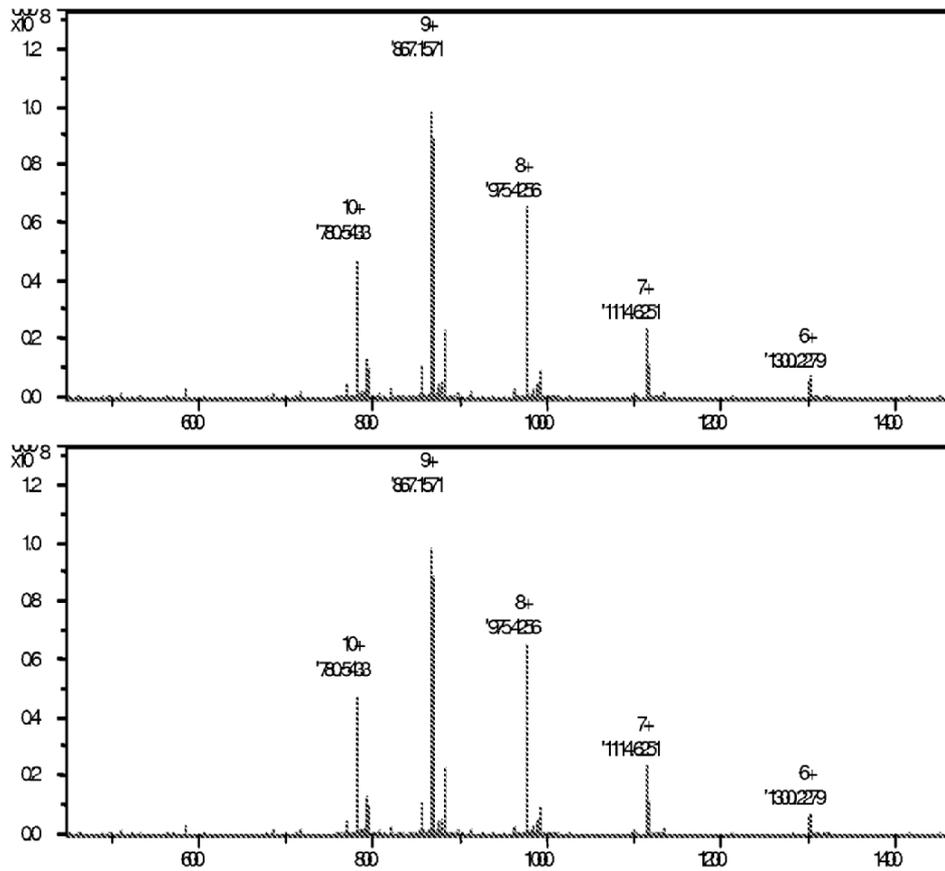
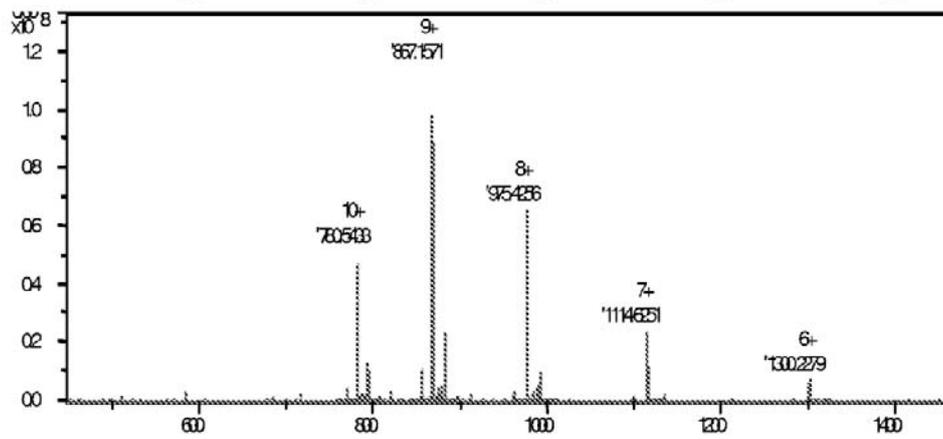
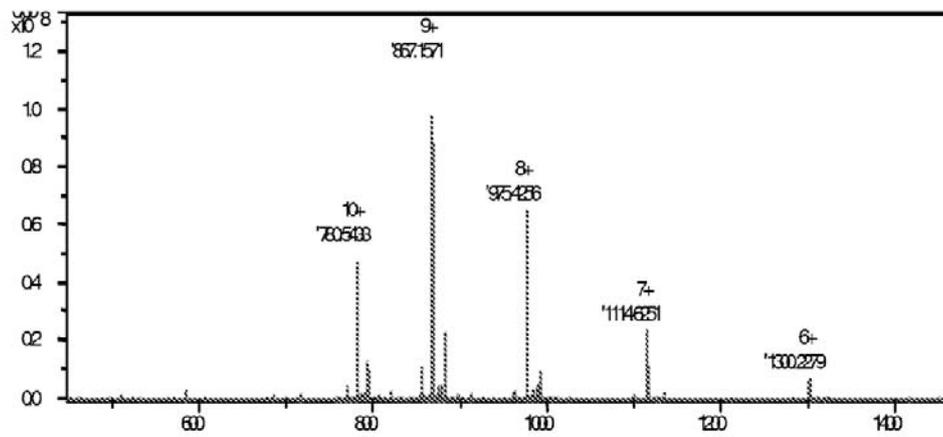
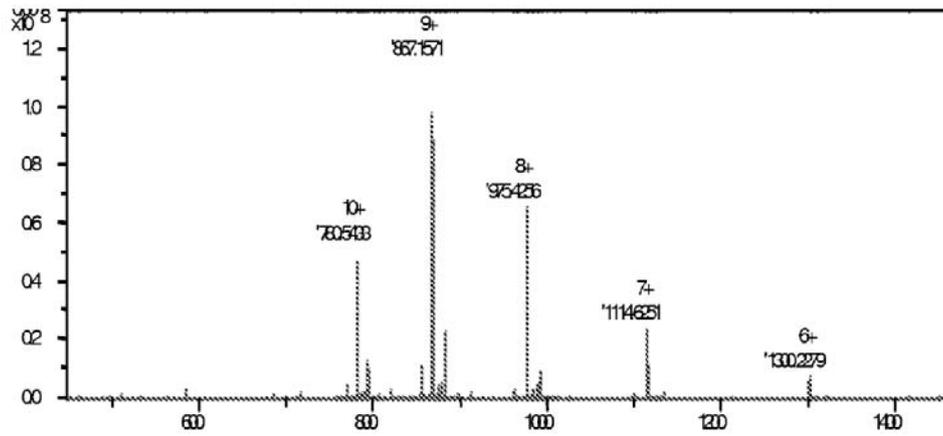


Figura 2





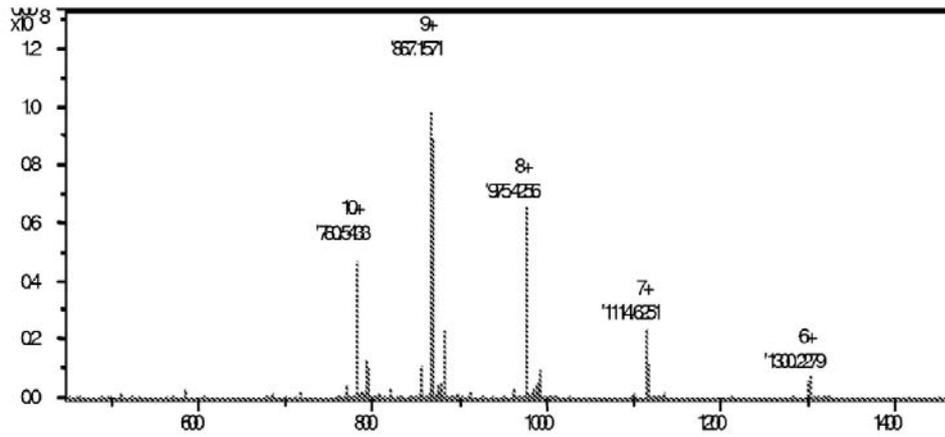
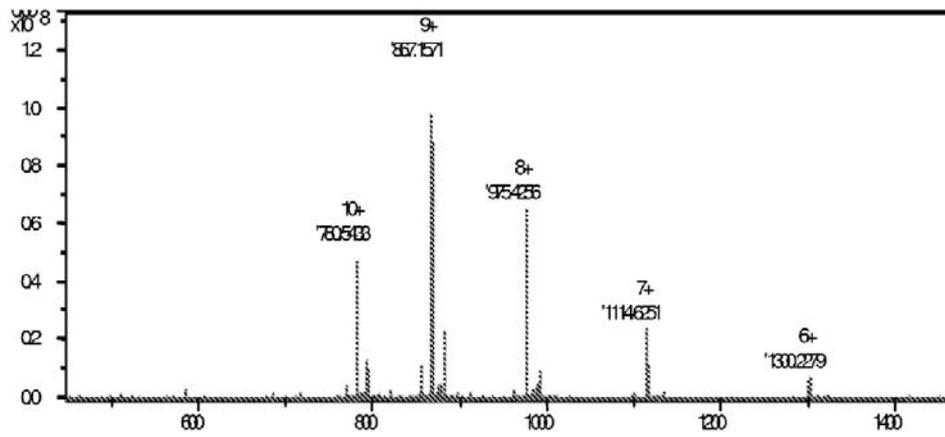
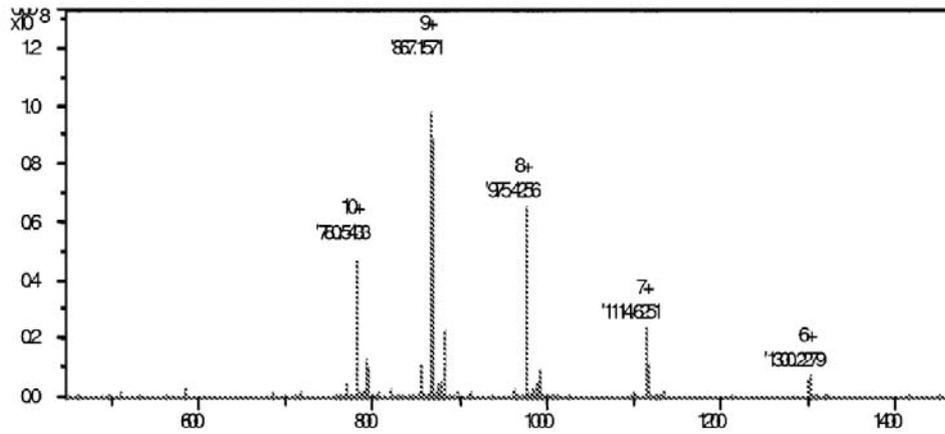
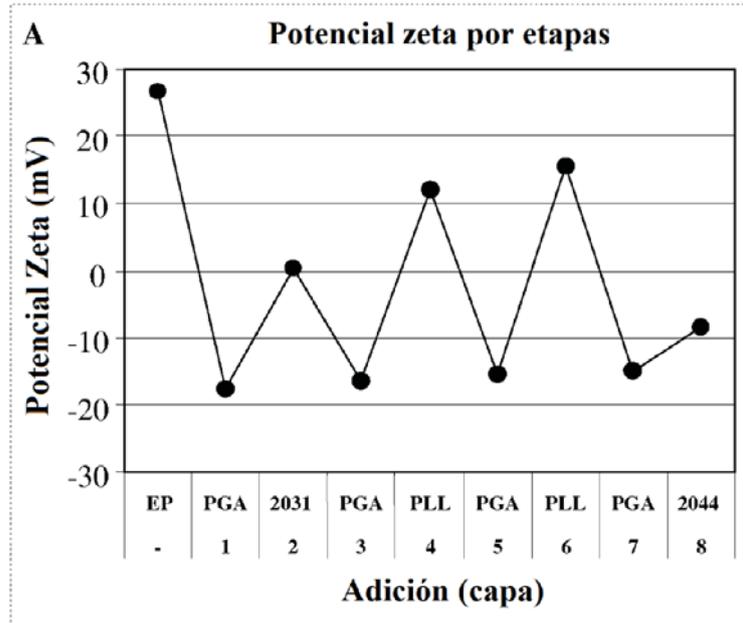
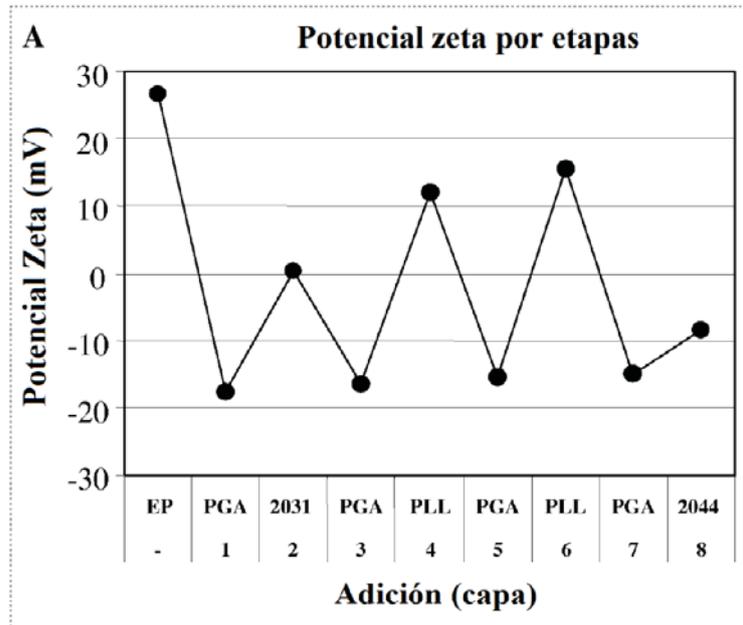


Figura 3



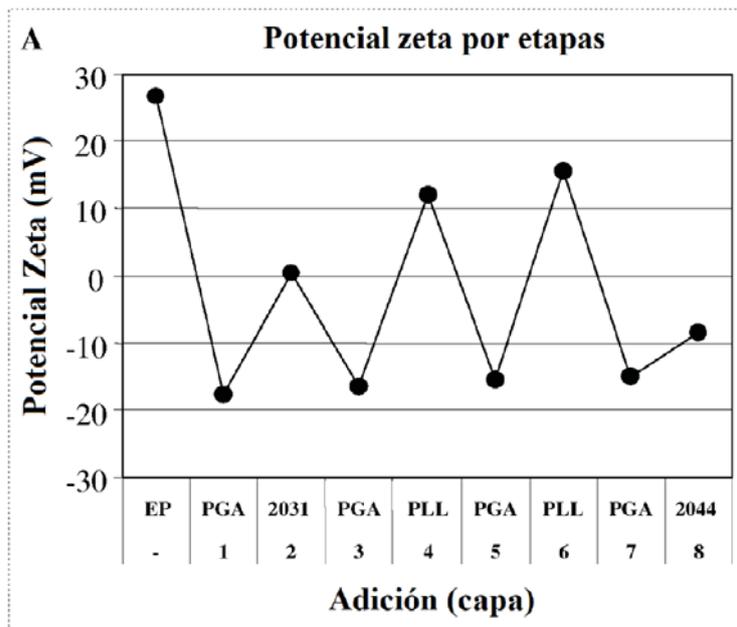
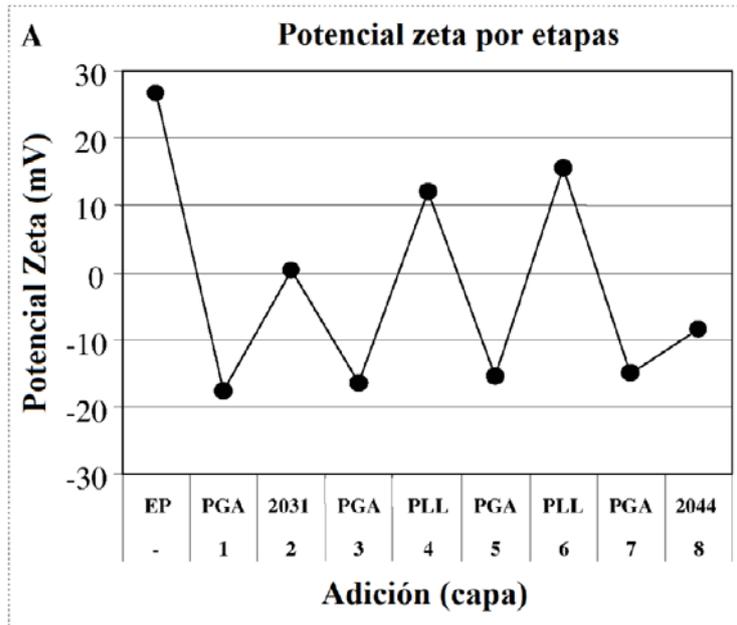


Figura 4

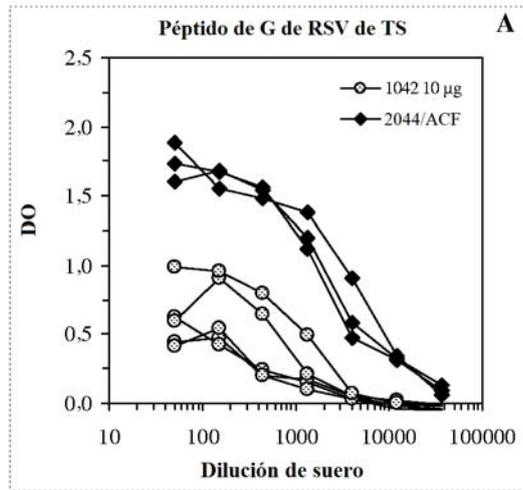


Figura 5

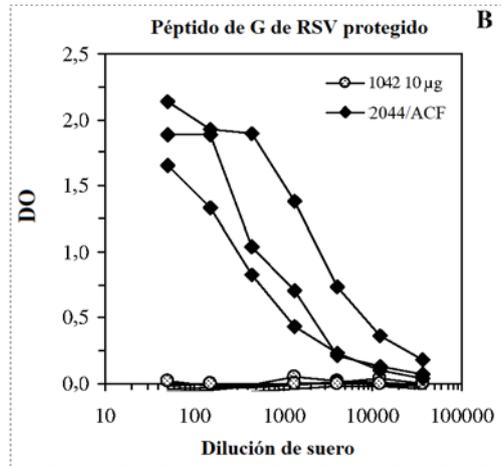


Figura 6

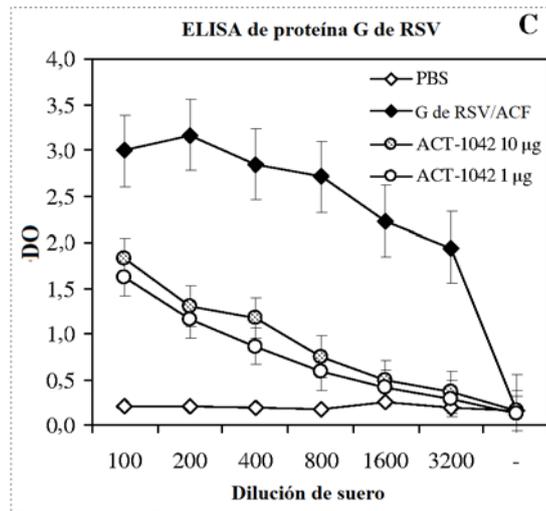


Figura 7

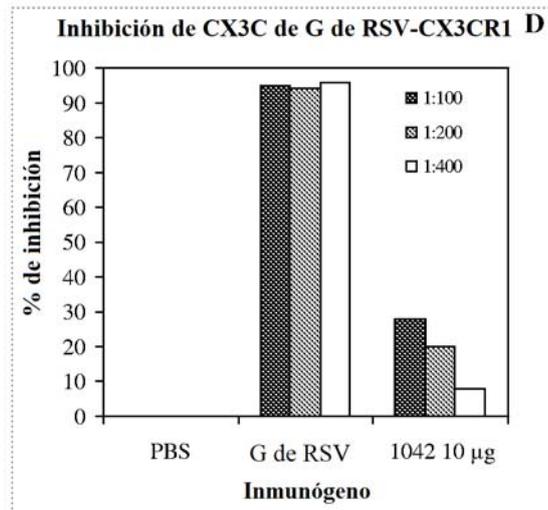


Figura 8

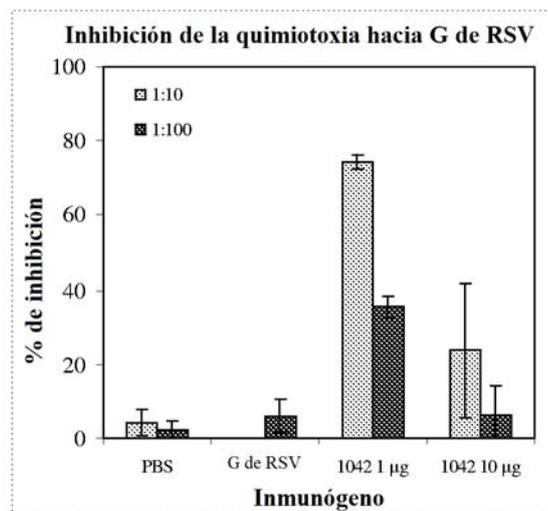


Figura 9

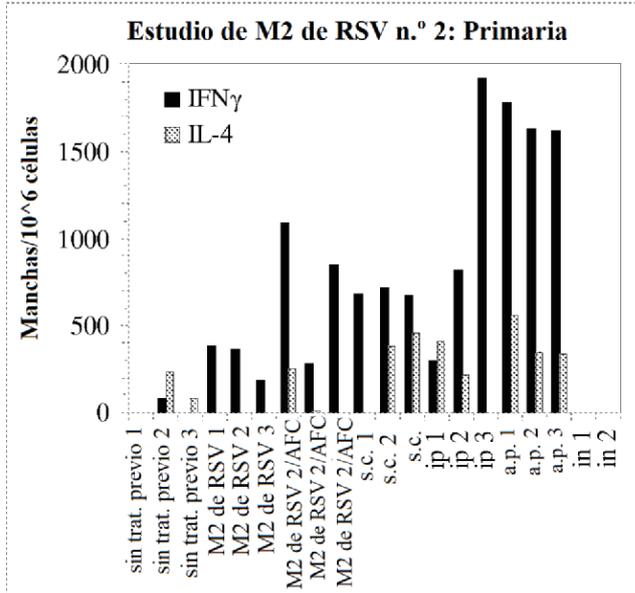


Figura 10,

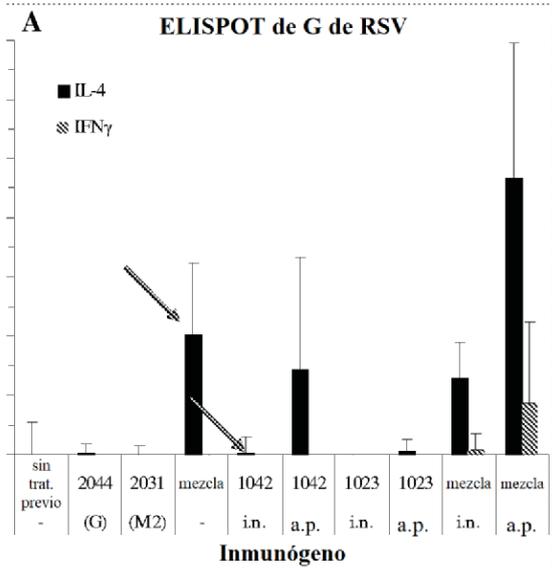


Figura 11

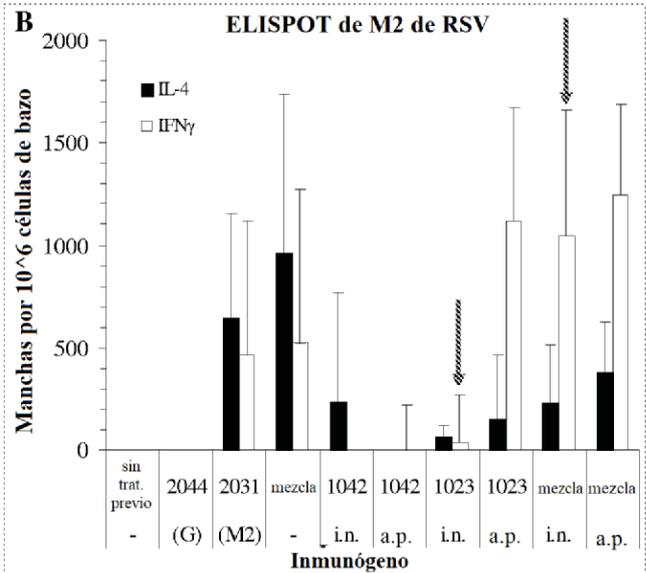


Figura 12

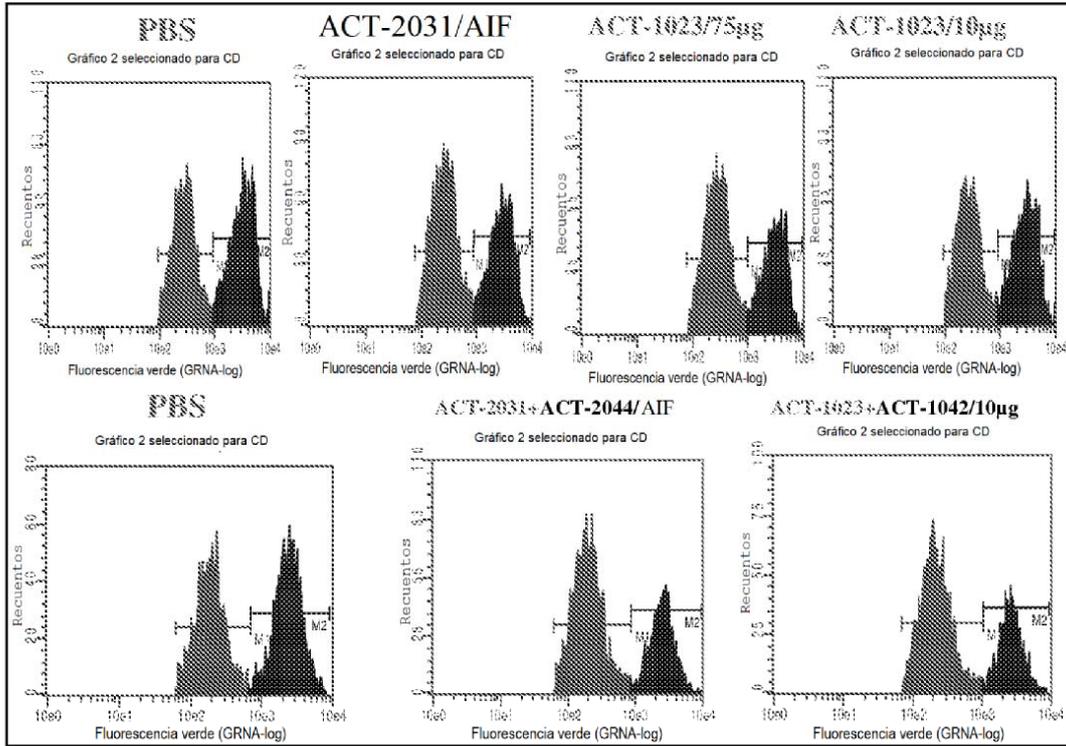


Figura 13

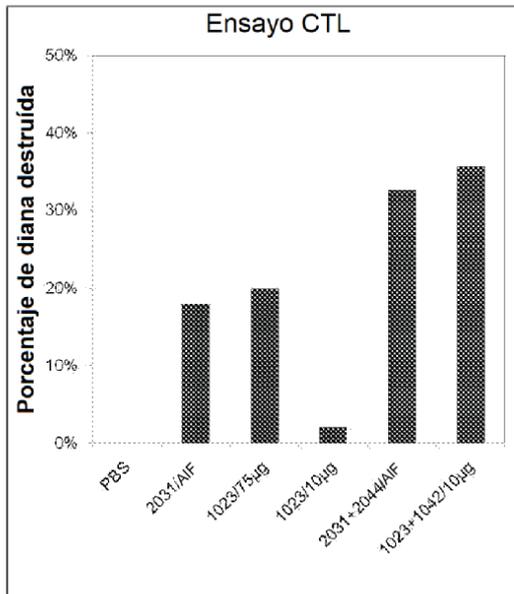


Figura 14

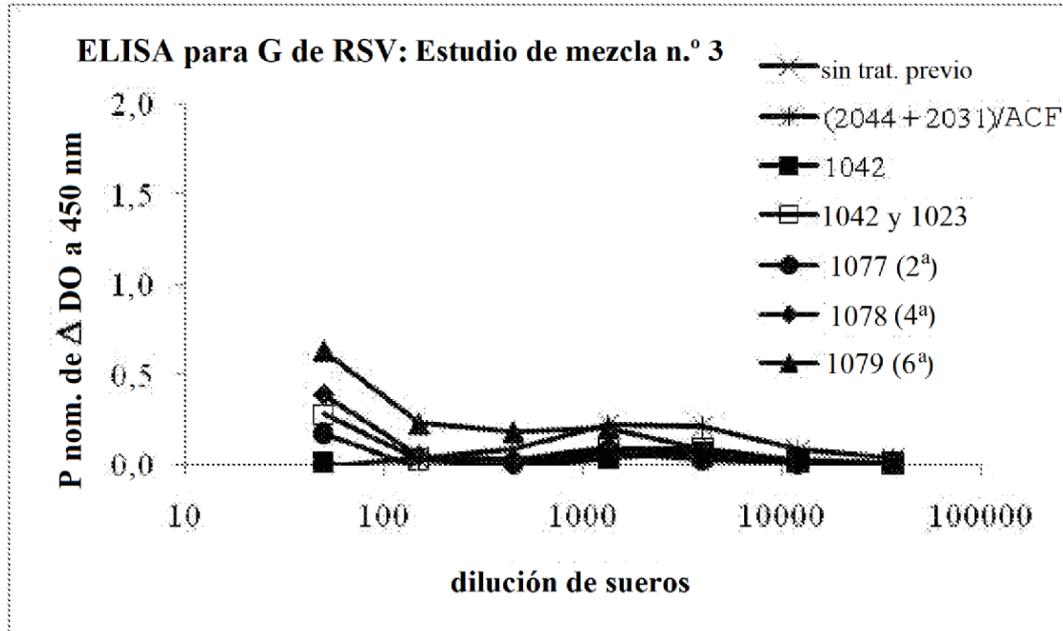


Figura 15

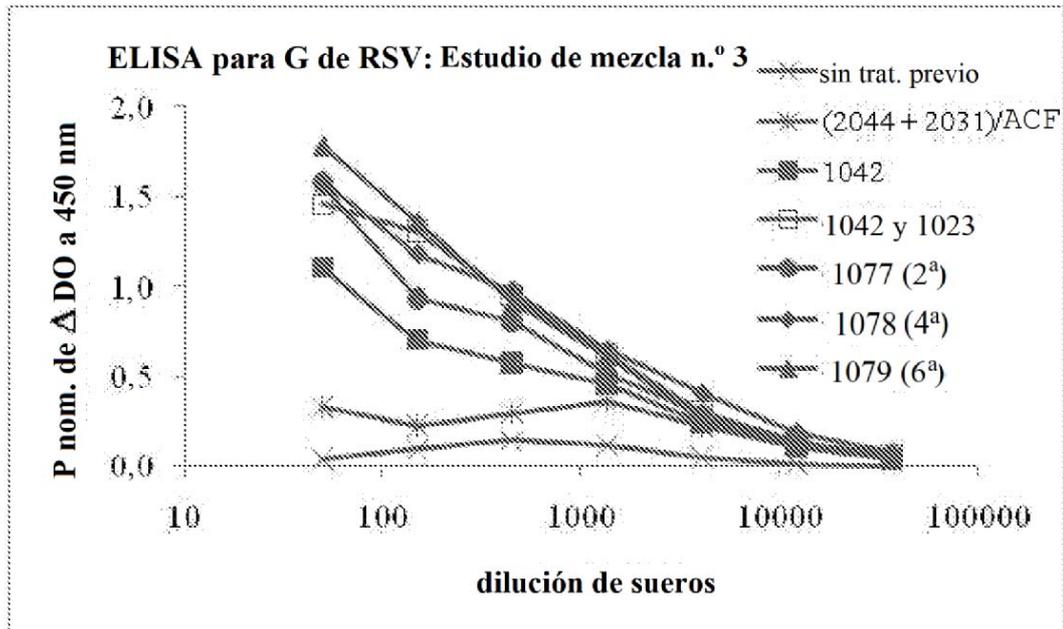


Figura 16

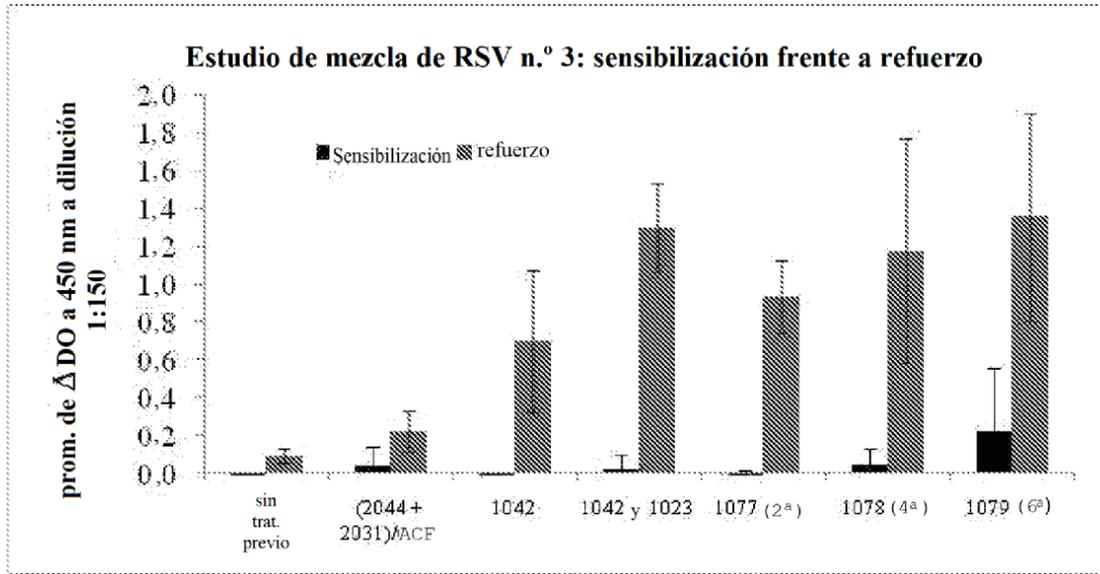


Figura 17

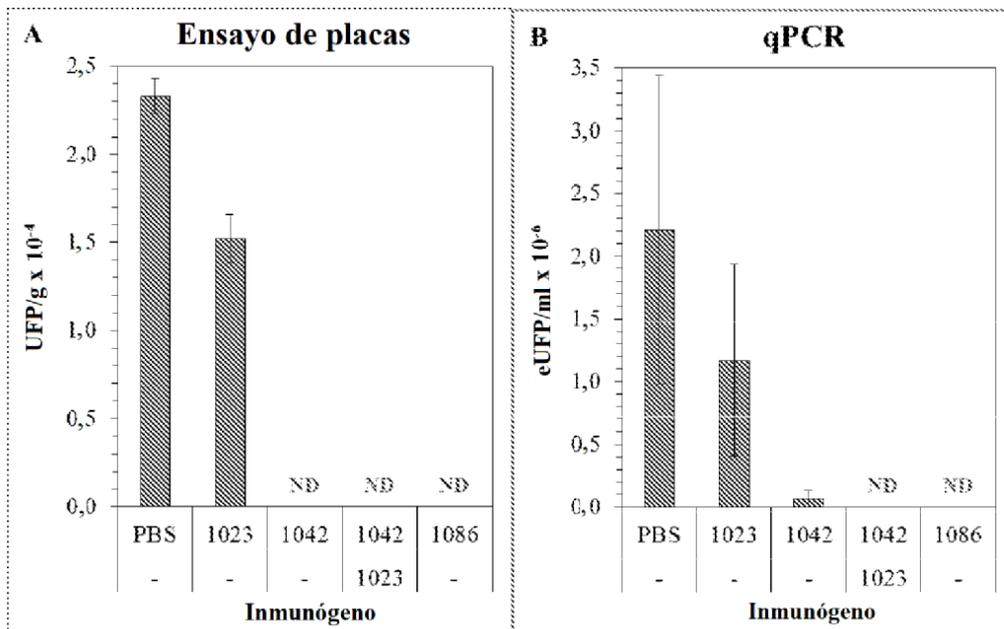


Figura 18

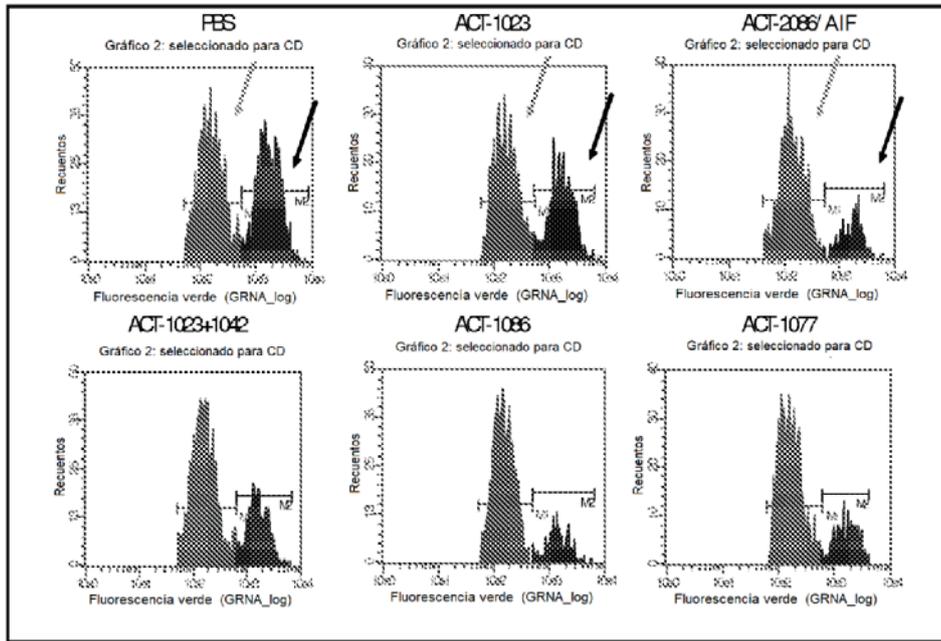


Figura 19

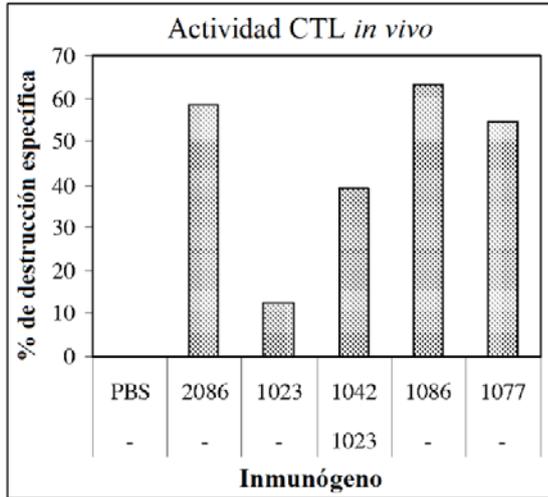


Figura 20

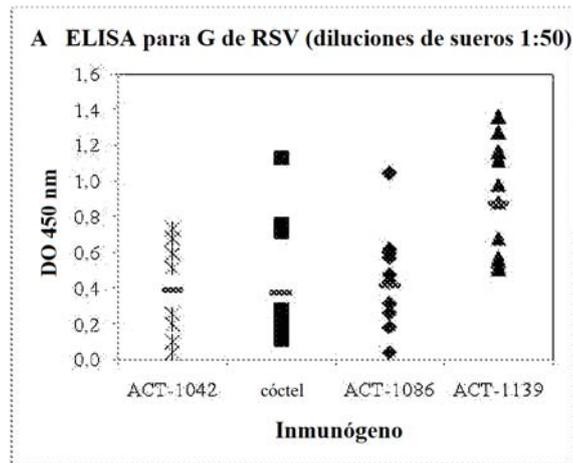


Figura 21

