

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 328**

51 Int. Cl.:

A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2013 PCT/IB2013/053079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13160807**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2013 E 13726297 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2841110**

54 Título: **Método para la administración de antígenos**

30 Prioridad:

24.04.2012 TR 201204773

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

23.09.2019

73 Titular/es:

BOGAZICI UNIVERSITESI (100.0%)

Bebek

34342 Istanbul, TR

72 Inventor/es:

SAHILLIOGLU, ALI CAN y

OZOREN, NESRIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 725 328 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

Método para la administración de antígenos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método novedoso para la administración de antígenos y/o moléculas bioactivas.

Antecedentes

10

Tradicionalmente, las vacunas se basan en el principio de la producción de anticuerpos del cuerpo contra patógenos muertos o vivos atenuados. Recientemente, hay estudios sobre el desarrollo de vacunas de subunidades basadas en inyectar componentes particulares de un patógeno en lugar de inyectar todo el patógeno en sí, para mejorar la bioseguridad. Las vacunas de subunidades contienen antígenos de naturaleza peptídica o proteica codificada por patógenos. Con el fin de facilitar el atrapamiento de estos péptidos y proteínas por las células presentadoras de antígenos (APC), los antígenos se cargan en partículas de tamaño nanométrico o micrométrico. Estos tipos de vacunas se denominan vacunas en partículas (De Temmerman et al., 2011).

15

20

Hay estudios en curso sobre numerosos métodos de administración de antígenos para ser utilizados como vacunas en partículas. Emulsiones, liposomas, complejos inmunoestimulantes, partículas similares a virus, oro, partículas de sílice y partículas basadas en polímeros se utilizan para este propósito. Las partículas basadas en polímeros pueden basarse en compuestos biodegradables, como poli(D,L-láctido) (PLA) y poli(D,L, ácido láctico-glicólico) (PLGA) o compuestos no biodegradables, como el poliestireno. Cápsulas de capa por capa, partículas de quitosán, micro y nanogeles se encuentran entre los otros métodos de administración de antígenos basados en polímeros.

25

30

El denominador común de todos los métodos de administración mencionados anteriormente es aumentar el tamaño de un antígeno para facilitar su atrapamiento mediante APC (Xiang et al., 2006). Otra propiedad de las vacunas en partículas es reducir la degradación enzimática de los antígenos ya sea extracelular o intracelularmente después del atrapamiento, con el fin de alargar el período de tiempo para que los antígenos permanezcan en el ambiente y, por lo tanto, mejorar la capacidad de las APC para presentar estos antígenos a células T.

35

Métodos similares a los empleados para la administración de antígenos también se utilizan en sistemas de liberación controlada de fármacos. Existen aplicaciones en las que los sistemas de liberación de fármacos en micropartículas se emplean por vía oral o nasal. Existen numerosos estudios sobre la liberación controlada de factores de crecimiento a partir de micropartículas basadas en polímeros (Balmayor et al., 2011).

40

El eficaz atrapamiento de antígenos por APC es de suma importancia en el proceso de producción de anticuerpos. Para lograr esto, los antígenos peptídicos cortos (haptenos) se entrecruzan con proteínas portadoras más grandes. Las proteínas portadoras utilizadas con mayor frecuencia para este propósito son la hemocianina de la lapa (KLH) y las proteínas de albúmina de suero bovino (BSA). La proteína portadora KLH más preferida es una proteína de peso molecular de 350 kDa aislada de *Megathura crenulata*. Esta proteína tiene una tendencia a agregarse. Tanto las formas solubles como las agregadas de KLH muestran propiedades antigénicas. Debido a su gran tamaño, la expresión de la proteína KLH en bacterias o la fusión de secuencias codificantes de hapteno y KLH por métodos de clonación molecular no es práctica.

45

Entre los sistemas de administración de antígeno y/o fármaco mencionados anteriormente, los liposomas e hidrogeles se degradan de forma relativamente rápida. Además, los liposomas también tienden a fusionarse entre sí. Por lo tanto, tanto los liposomas como los hidrogeles tienen una vida útil corta.

50

Los métodos que se utilizan en la síntesis de micropartículas basadas en polímeros (disolventes orgánicos, alta temperatura y ciclos de congelación y descongelación) pueden dañar la estructura y la actividad del antígeno o la carga útil de la molécula bioactiva.

55

En general, las vacunas de subunidades generan una menor cantidad de producción de anticuerpos en comparación con las vacunas de patógeno completo. Se han desarrollado diversas estrategias para superar este problema. El primer método es recubrir las micropartículas con moléculas que tienen la tendencia a fusionarse con membranas de APC (anticuerpos, ligandos de receptores). De esta manera, se incrementa la frecuencia de atrapamiento de las micropartículas por APC. Otra estrategia es recubrir las micropartículas con moléculas (adyuvantes) dirigidas a receptores específicos de APC que mejoran la capacidad de presentación de antígenos de las APC. Los miembros de la familia del receptor tipo Toll (TLR) se estimulan al unirse a sus ligandos y se activan las vías que promueven la capacidad de presentación del antígeno a las células. Para estimular los miembros de la familia TLR, las micropartículas se cubren con CpG, poli(I:C), MPL, 3M-019 y ligandos de flagelina.

60

65

La proteína tipo mancha asociada a apoptosis que contiene una CARD (ASC, PYCARD, TMS1) es una proteína adaptadora de 22 kDa con un dominio PYD en el terminal N y un dominio CARD en el terminal C que funciona en los complejos inflamasoma NLRP3, NLRC4 y AIM2. La proteína ASC tiene un papel en la activación de la proteína

caspasa-1 en las vías de señalización inflamatorias y piroptóticas (Franchi et al., 2009). Es una proteína citoplásmica que forma una estructura de mancha (mancha mCherry) en el espacio perinuclear tras la activación de complejos de inflamasomas (Miao et al., 2011).

5 Durante la muerte celular piroptótica, tras la llegada de un estímulo proinflamatorio, las proteínas ASC forman estructuras supramoleculares esféricas que tienen varios micrómetros de diámetro, denominadas piroptosomas. Presumiblemente, los piroptosomas están formados por dímeros de ASC oligomerizados (Fernandes-Alnemri et al., 2007).

10 El inflamasoma NLRP3, que también contiene la proteína ASC, puede activarse por estímulos como el ATP extracelular, las toxinas que dañan la membrana (nigericina), el daño lisosomal, la urea monosódica (MSU) y los rayos UV. La activación del inflamasoma NLRP3 se acompaña de la síntesis de estructuras de proteína tipo mancha o piroptosomas del tamaño de un micrómetro. No de acuerdo la invención, dichas estructuras de proteína tipo mancha también pueden sintetizarse dentro de las células tras la sobreexpresión de la proteína ASC, sin la necesidad de
15 ningún otro estímulo. Las proteínas tipo mancha ASC se pueden sintetizar in vitro incubando proteína ASC recombinante purificada en una solución hipotónica a 37°C (Fernandes-Alnemri et al., 2007).

En el documento de Patente Internacional WO2009014863, la proteína ASC y el piroptosoma se usan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades autoinmunes. Según esta invención, la apoptosis y las estructuras de piroptosoma que
20 contienen dímeros de ASC y procaspasa-1 se producen durante la respuesta inflamatoria temprana en células macrófagas. La activación de la caspasa-1 depende de la formación del piroptosoma. El estado de la inflamación se diagnostica mediante el aislamiento de piroptosomas de las células de macrófagos.

Después de la vacunación contra la gripe con adyuvante MF59, se postuló que la proteína ASC desempeña un papel
25 en el desencadenamiento de la respuesta humoral específica del antígeno, de acuerdo con las comparaciones de los datos entre ratones bloqueados ASC y de tipo salvaje. Sin embargo, no se sugirió lograr el suministro de antígeno mediante la unión de los péptidos antigénicos a la proteína ASC o las proteínas tipo mancha ASC (Ellebedy et al., 2011).

30 Resumen de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar la carga del portador de la proteína tipo mancha ASC con antígenos y/o moléculas bioactivas.

35 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar el uso del portador de la proteína tipo mancha ASC en el suministro de antígenos y/o moléculas bioactivas a células presentadoras de antígenos (APC).

Un objetivo adicional de la presente invención es retardar la degradación de antígenos endocitosados o fagocitados junto con el portador de las proteínas tipo mancha ASC por enzimas dentro de las células y alargar el período de
40 tiempo en el que los antígenos permanecen en el medio ambiente y mejorar así la capacidad de presentación del antígeno de APC a las células T.

Otro objetivo de la presente invención es aumentar el tamaño de los antígenos y/o moléculas bioactivas a través del portador de las proteínas tipo mancha ASC para facilitar su atrapamiento por las APC.
45

Otro objetivo más de la presente invención es aumentar la vida útil de los antígenos y/o moléculas bioactivas transportadas por el portador de la proteína tipo mancha ASC.

50 Descripción detallada de la invención

Un método para el suministro de antígeno desarrollado para cumplir los objetivos de la presente invención se ilustra en las figuras adjuntas en las que;

55 Figura 1 - Síntesis de proteínas tipo mancha mCherry-ASC en células HEK 293 FT y su purificación. Se transfectaron células HEK 293 FT con un plásmido que codifica la proteína de fusión mCherry-ASC. A, B, C: células HEK 293 FT que sintetizan proteínas tipo mancha mCherry-ASC. A: Proteínas tipo mancha mCherry (microscopía confocal) B: Células bajo microscopía de campo claro. C: Superposición de las figuras 1A y 1B. Las proteínas tipo mancha mCherry sintetizadas se purificaron posteriormente a partir de células HEK 293 FT. D: Proteínas tipo mancha mCherry purificadas (microscopía confocal). E: Manchas bajo microscopía de campo claro F: Superposición de las figuras 1D y 1E.
60

Figura 2 - Carga de las proteínas de fusión mCherry-FGF2 en proteínas tipo mancha EGFP-ASC. Los plásmidos que codifican las proteínas de fusión mCherry-FGF2 y EGFP-ASC se transfectaron en células HEK 293 FT y se observó la carga de las proteínas de fusión mCherry-FGF2 en proteínas tipo mancha EGFP-ASC. A: EGFP-ASC
65 B: mCherry-FGF2 C: Imagen de microscopía de campo claro D: Superposición de las figuras 2A, 2B y 2C.

Figura 3 - Recubrimiento de la capa externa de Las proteínas tipo mancha mCherry con péptidos fusionados a la proteína EGFP mediante interacciones hidrófobas. Las células HEK 293 FT se cotransfectaron con plásmidos que codifican mCherry-ASC y EGFP-X. X es para 3A, 3B, 3C: "parada" (EGFP-parada, SEQ ID NO: 2); 3D, 3E, 3F: Péptido 1 (SEQ ID NO: 4); 3G, 3H, 3I: Péptido 2 (SEQ ID NO: 8); 3J, 3K, 3L: Péptido 3 (SEQ ID NO: 9). 3A, 3D, 3G, 3J: EGFP-X (X: "parada", péptido 1, Péptido 2, Péptido 3, respectivamente). 3B, 3E, 3H, 3K: mCherry-ASC. 3C, 3F, 3I, 3L: Superposición de EGFP-X (X: "parada", Péptido 1, Péptido 2, Péptido 3, respectivamente) y proteínas mCherry-ASC.

Figura 4: Los péptidos hidrófobos deben tener al menos 13 aminoácidos de longitud para cubrir la capa externa de las proteínas tipo mancha mCherry-ASC. Los plásmidos que codifican EGFP-X se cotransfectaron a células HEK 293 FT. X es para 4A, 4B, 4C: Péptido 1_19aa (SEQ ID NO: 5); 4D, 4E, 4F: Péptido 1_12aa (SEQ ID NO: 6); 4G, 4H, 4I: Péptido 1_8aa (SEQ ID NO: 7). 4A, 4D, 4G: EGFP-X. 4B, 4E, 4H: mCherry-ASC. 4C, 4F, 4I: Superposición de EGFP-X (X: Péptido 1_19aa, Péptido 1_12aa, Péptido 1_8aa, respectivamente) y proteínas mCherry-ASC.

Figura 5 - Gráficos de hidropatía de péptidos fusionados a EGFP. Las columnas descendentes debajo de la línea horizontal representan aminoácidos hidrófobos, mientras que las columnas ascendentes representan aminoácidos hidrófilos. 5A: Péptido 1 (SEQ ID NO: 4), 5B: Péptido 2 (SEQ ID NO: 8), 5C: Péptido 3 (SEQ ID NO: 9), 5D: Péptido 1_19aa (SEQ ID NO: 5), 5E: Péptido 1_12aa (SEQ ID NO: 6), 5F: Péptido 1_8aa (SEQ ID NO: 7).

Figura 6 - Estado encerrado por membrana de proteínas tipo mancha mCherry-ASC atrapadas por células THP-1 y su lenta degradación dentro de la célula. La línea celular THP-1 EGFP-ASC diferenciada con PMA con características de macrófagos se incubó con proteínas tipo mancha mCherry-ASC purificadas durante 2 horas. En el curso de una extensa generación de imágenes en lapso de tiempo en un entorno no fisiológico, las células perdieron la integridad de su membrana y mostraron características apoptóticas. La estructura de la membrana del orgánulo fagolisosoma que contiene el portador de proteínas tipo mancha mCherry se relajó debido a la apoptosis y se pudo observar claramente. Además, el espacio dentro del fagolisosoma, pero fuera de la proteína tipo mancha de mCherry-ASC se llenó con la señal de mCherry (6G-L: t=600 s a t=1100 s). Esto demostró que las proteínas tipo mancha mCherry-ASC se degradaron a un ritmo lento intracelularmente. De las células se tomaron imágenes bajo microscopía confocal en intervalos de 100 segundos (6A-6L). Izquierda: EGFP-ASC. Medio: mCherry-ASC. Derecha: campo claro.

Figura 7 - Vesículas tubulares que son pinzadas de los fagolisosomas que contienen proteínas tipo mancha mCherry-ASC. La línea celular THP-1 EGFP-ASC diferenciada con PMA con características de macrófagos se incubó con proteínas tipo mancha mCherry-ASC purificadas durante 2 horas. Se observó el momento del pinzamiento de las vesículas tubulares del fagolisosoma que contenía proteínas tipo mancha mCherry-ASC, atrapado por las células THP-1. La degradación total de las proteínas tipo mancha no tuvo lugar mientras se observaban las células. Las células se tomaron imágenes bajo microscopía confocal en intervalos de 10 segundos (7A-7U).

Figura 8 - Resistencia de las proteínas tipo mancha mCherry-ASC contra la incubación prolongada a 37°C. Las proteínas tipo mancha mCherry-ASC se sintetizaron en células HEK 293 FT y se purificaron. Las alícuotas tomadas de Proteínas tipo mancha mCherry se examinaron bajo microscopía confocal justo después de la purificación (8A, 8B) y 30 días después de la incubación a 37°C (8C, 8D). Los plásmidos codificantes de mCherry-ASC y EGFP-péptido 1 (Péptido 1, SEQ ID NO: 4) se cotransfectaron en células HEK 293 FT. Las alícuotas tomadas de proteína tipo mancha mCherry purificadas de las células cotransfectadas se examinaron bajo microscopía confocal justo después de la purificación (8E-8G) y 30 días después de la incubación a 37°C (8H-8J). Se observó que EGFP-Péptido 1 cubría la cubierta externa de las proteínas tipo mancha mCherry-ASC y permanecía unido a las proteínas tipo mancha mCherry-ASC incluso después de la incubación prolongada.

Figura 9 - Resistencia de proteína tipo mancha mCherry contra ciclos repetidos de congelación y descongelación. Las proteínas tipo mancha mCherry-ASC se sintetizaron en células HEK 293 FT, se purificaron y se sometieron a ciclos repetidos de congelación y descongelación de -80°C a +37°C. Las alícuotas tomadas de preparaciones congeladas y descongeladas se contaron con microscopía confocal. Incluso después de 8 ciclos de congelación y descongelación, no se observaron cambios significativos en los recuentos de puntos de mCherry-ASC.

La composición que funciona en el suministro de antígeno y/o molécula bioactiva en su forma más simple, se define en la reivindicación 1 y contiene;

- al menos un portador de proteína tipo mancha ASC formado por proteínas ASC que se unen,
- al menos un péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, transportada por el portador de la proteína tipo mancha ASC.

"La proteína tipo mancha asociada a apoptosis que contiene una CARD" y "ASC" significa productos de expresión de homólogos del gen ASC en diferentes especies y sus isoformas. Esta definición es válida para homólogos de proteína ASC en especies humanas (SEQ ID NO: 1) y pez cebra (SEQ ID NO: 11) y todos los demás seres vivos.

Las proteínas tipo mancha ASC se definen como agregados perinucleares de tamaño micrométrico formados por proteínas de ASC como se describió anteriormente. Estas estructuras se pueden sintetizar mediante la estimulación de las proteínas NLRP3, AIM2 y NLRC4 y/o el desencadenamiento de la piroptosis (Miao et al., 2011, Leemans et al., 2011, Gross et al., 2011). Sin embargo, las estructuras de las proteínas tipo mancha ASC se pueden sintetizar en la sobreexpresión de la proteína ASC (SEQ ID NO: 1) sin necesidad de ningún otro estímulo. En esta invención, las expresiones "portador de las proteínas tipo mancha ASC", "proteína tipo mancha ASC" y "proteína tipo mancha" representan cualquier tipo de agregado sintetizado a partir de proteínas de ASC (SEQ ID NO: 1) en cultivos celulares (expresión génica endógena, estable o transitoria) o agregados sintetizado in vitro a partir de proteínas ASC purificadas (SEQ ID NO: 1), producidas en sistemas de expresión de genes bacterianos, de levadura, baculovíricos, etc.

En la composición de la invención, al menos un péptido/proteína es el antígeno transportado por el portador de proteína tipo mancha ASC, en resumen, un antígeno es al menos un miembro del grupo que consiste en péptidos, proteínas y péptidos que imitan a los carbohidratos o una mezcla de al menos dos miembros de estos grupos que estimulan la producción de anticuerpos al ingresar al cuerpo.

Las moléculas bioactivas son moléculas que tienen efectos terapéuticos en un organismo, tejido o célula vivo. En la composición de la invención, al menos una molécula bioactiva péptido/proteína transportada por el portador de la proteína tipo mancha ASC, en resumen una molécula bioactiva es al menos un miembro del grupo que consiste en medicamentos, enzimas, factores de crecimiento, hormonas, receptores, ligandos de receptores, adyuvantes y anticuerpos o una mezcla de al menos dos miembros de estos grupos.

En la realización preferida de la presente invención, una composición comprende al menos un tipo de antígeno y/o al menos un tipo de molécula bioactiva.

El portador de las proteínas tipo mancha ASC puede transportar antígenos y/o moléculas bioactivas de diferentes maneras. En otras palabras, los antígenos y/o moléculas bioactivas pueden cargarse en el portador de la proteína tipo mancha ASC de diferentes maneras.

En la realización preferida de la presente invención, una secuencia de ADN que codifica un antígeno y una secuencia de ADN que codifica la proteína ASC se combinan de manera que se crea una secuencia de ADN fusionada que codifica la proteína tanto antígeno como ASC y esta secuencia de ADN fusionada codifica una proteína de fusión ASC-antígeno que contiene antígeno y proteína ASC.

Debido al tamaño relativamente pequeño de 22 kDa de la proteína ASC, la clonación molecular y la subsiguiente expresión de proteínas de fusión de antígeno ASC en cultivos celulares o bacterias son extremadamente eficientes.

En la realización preferida de la presente invención, al menos una proteína ASC que forma el portador de la proteína tipo mancha ASC y el antígeno existen como una proteína de fusión y de esta manera, el antígeno se transporta con el portador de la proteína tipo mancha ASC como una proteína de fusión en la composición de la invención.

La purificación de proteína tipo mancha ASC a partir de cultivos celulares y su síntesis in vitro se describió anteriormente (Fernandes-Alnemri et al., 2007). La purificación y la síntesis in vitro de la composición de la invención se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos descritos en dicho documento.

La composición de la invención, que comprende el portador de las proteínas tipo mancha ASC y los antígenos fusionados a las proteínas de la ASC que forman el portador de la proteína tipo mancha ASC, se sintetiza en cultivo celular y se purifica a partir del cultivo de la célula.

En una realización alternativa de la presente invención, las proteínas de fusión de antígeno ASC producidas en bacterias (u otro sistema de expresión génica) se purifican y la composición de la invención, que comprende el portador de proteína tipo mancha ASC y los antígenos fusionados a proteínas de ASC que forman el portador de proteína tipo mancha ASC, se sintetiza in vitro.

Un antígeno existente como una proteína de fusión con la proteína ASC puede insertarse en el extremo N, el extremo C o dentro de la proteína ASC. En esta realización de la invención, el antígeno se transporta dentro del portador de la proteína tipo mancha ASC.

En otra realización preferida de la presente invención, se pueden cargar antígenos y/o moléculas bioactivas en el portador de la proteína tipo mancha ASC formando interacciones hidrófobas con el portador de la proteína tipo mancha ASC o las proteínas ASC que forman el portador de la proteína tipo mancha ASC.

En la realización preferida de la presente invención, las secuencias de péptidos o proteínas, que son el antígeno o la molécula bioactiva cargada en el portador de la proteína tipo mancha ASC a través de interacciones hidrófobas, tienen una longitud de al menos 13 aminoácidos e hidrófobas. Las secuencias de péptidos o proteínas, que son el antígeno

o la molécula bioactiva, se denominan hidrófobas cuando su valor medio de hidrofobicidad es superior a 0 o hidrófila cuando su valor medio de hidrofobicidad es inferior a 0.

5 Los antígenos o moléculas bioactivas con propiedades hidrofílicas no pueden transportarse con portadores de Proteínas tipo mancha ASC a través de interacciones hidrófobas solas. Los antígenos o moléculas bioactivas con propiedades hidrófilas pueden cargarse en el portador de la proteína tipo mancha ASC a través de interacciones hidrófobas creando una proteína de fusión de antígeno y/o molécula bioactiva con un péptido que comprende una longitud de al menos 13 aminoácidos y secuencia hidrófoba.

10 En esta realización preferida de la invención, los antígenos y/o moléculas bioactivas recubren la superficie o, en otras palabras, la cubierta exterior del portador de la proteína tipo mancha ASC.

15 La composición de la invención que comprende el portador de la proteína tipo mancha ASC y al menos un antígeno y/o molécula bioactiva cargada en el portador de la proteína tipo mancha ASC a través de interacciones hidrófobas se sintetiza en un cultivo celular y se purifica a partir de un cultivo celular.

20 En una realización alternativa de la presente invención, las proteínas ASC producidas por vía bacteriana (o producidas a través de otro sistema de expresión génica) que forman el portador de la proteína tipo mancha ASC y un antígeno y/o una molécula bioactiva se purifican; y la composición de la invención que comprende el portador de las proteínas tipo mancha ASC y al menos un antígeno y/o molécula bioactiva, cargada en el portador de la proteína tipo mancha ASC mediante interacciones hidrófobas, se sintetiza in vitro.

25 En la realización preferida de la presente invención, la composición se forma cargando al menos un antígeno y/o molécula bioactiva en el portador de la proteína tipo mancha ASC a través de interacciones hidrófobas y se nombra como una composición a través de interacciones hidrófobas.

30 En otra realización preferida de la presente invención, la composición se forma formando una proteína de fusión de al menos un antígeno y/o una molécula bioactiva con proteínas ASC que forman el portador de la proteína tipo mancha ASC y se denomina composición fusionada.

En otra realización preferida de la presente invención, la composición se forma tanto por la composición fusionada como por la composición a través de métodos de producción de interacciones hidrófobas. Esta composición se denomina composición fusionada mediante interacciones hidrófobas.

35 No de acuerdo con la invención, la composición se puede sintetizar en cultivo celular con o sin ningún estímulo. Dichos estímulos se consiguen mediante estímulos proinflamatorios.

40 No de acuerdo con la invención, la composición, el portador de las proteínas tipo mancha ASC se sintetiza mediante la sobreexpresión de un plásmido que contiene una secuencia de ADN que codifica la proteína ASC (SEQ ID NO: 1) en un cultivo celular sin ningún estímulo. De esta manera, el portador de la proteína tipo mancha ASC y el antígeno y/o la molécula bioactiva transportada por el portador de la proteína tipo mancha ASC forman la composición de la invención en cultivo celular sin ningún estímulo.

45 En otra realización preferida de la presente invención, el portador de las proteínas tipo mancha ASC en la composición de la invención se puede sintetizar mediante la estimulación de células con estímulos proinflamatorios. De esta manera, el portador de las proteínas tipo mancha ASC y el antígeno y/o la molécula bioactiva portada por el portador de las proteínas tipo mancha ASC forman la composición de la invención en cultivo celular con un estímulo. El dicho estímulo proinflamatorio puede ser cualquier estímulo desencadenante inflamatorio NLRP3, NLRC4 o AIM2. El inflamatorio NLRP3 puede ser activado por urea monosódica (MSU), ácido úrico, asbesto, sílice, hidróxido de aluminio, ATP, sustancias dañinas para la membrana plasmática, como nigericina, UVB, hialuronano, fibras de amiloide- β , cristales de deshidrato de pirofosfato de calcio; el inflamatorio NLRC4 puede ser activado por la flagelina y el inflamatorio AIM2 puede ser activado por el ADN citosólico o análogos de ADN (poliA: T) (Franchi et al., 2009, Jin et al., 2010).

55 En otra realización de la presente invención, la composición se sintetiza en una solución hipotónica in vitro. Las proteínas ASC que forman el portador de la proteína tipo mancha ASC (SEQ ID NO: 1), el antígeno y/o la molécula bioactiva se expresan en sistemas de expresión génica de bacterias, levaduras, baculovirales, etc. y luego se purifican. La proteína ASC purificada y el antígeno y/o molécula bioactiva forman la composición de la invención mediante incubación conjunta en una solución hipotónica (solución que tiene <50 mM KCl) a 37°C.

60 Los dichos métodos para la carga de antígenos son válidos para la proteína ASC humana (SEQ ID NO: 1) y sus homólogos en especies evolutivamente estrechamente relacionadas, así como sus homólogos en especies distantes como el pez cebra (zASC, SEQ ID NO: 11). Las estructuras de proteína tipo mancha formadas por la proteína zASC fueron descritas anteriormente (Masumoto et al., 2003).

65

En una realización preferida de la presente invención, cuando se pretende que la composición se use en el desarrollo de un anticuerpo policlonal contra un antígeno que pertenece a seres humanos o un ser vivo, está estrechamente relacionado con los seres humanos, entonces es aconsejable usar la proteína ASC en un pariente lejano, como el homólogo de pez cebra de la proteína ASC (SEQ ID NO: 11). De esta manera, incluso si el organismo huésped utilizado en la producción de anticuerpos desarrolla anticuerpos contra el homólogo de pez cebra de la proteína ASC (SEQ ID NO: 11), debido a la alta diversidad de secuencias entre las proteínas ASC humanas y de pez cebra, la probabilidad de estos anticuerpos el reconocimiento de la proteína ASC humana (SEQ ID NO: 1) está disminuido. De manera similar, cuando la composición está destinada a ser utilizada en el desarrollo de un anticuerpo policlonal contra un antígeno perteneciente al pez cebra o su pariente cercano, es recomendable utilizar un homólogo relativamente distante, como el homólogo humano de la proteína ASC (SEQ ID NO: 1). Las proteínas ASC humanas (SEQ ID NO: 1) y de pez cebra (SEQ ID NO: 11) comparten una identidad de secuencia de 34.2% y solo 5 aminoácidos en una fila son idénticos. Estas similitudes se pueden reducir al hacer al menos una o pocas mutaciones en la secuencia.

La composición de la invención proporciona el suministro de antígenos y/o moléculas bioactivas junto con el portador de la proteína tipo mancha ASC a las células presentadoras de antígeno (APC). Las células presentadoras de antígenos (APC) son macrófagos, células dendríticas y células B.

Las APC atrapan la composición de la invención en células mediante endocitosis/fagocitosis. La composición atrapada es encerrada por una vesícula endosómico/fagosómico (endosoma temprano) derivada de la membrana de las células con un valor de pH entre 6-6.5 y, por lo tanto, la composición entra en la vía endocítica/fagocítica. La vía endocítica/fagocítica consiste en los estadios de endosoma temprano (pH=6-6.5), endolisosoma/fagolisosoma (pH=5-6) y lisosoma (pH=4.5-5), progresivamente. La composición se degrada en los estadios endolisosoma/fagolisosoma y lisosoma mediante enzimas hidrolíticas y valores de pH ácido. Como resultado, cualquier antígeno contenido en la composición se degrada en oligopéptidos de 13 a 18 aminoácidos de longitud y estos péptidos se cargan en moléculas MHC de clase II y se envían a la membrana plasmática en un complejo. Las células T_H reconocen e interactúan con estas estructuras antigénicas de pieza de MHC de clase II.

Los antígenos atrapados junto con la composición de la invención se degradan a través de la vía endocítica/fagocítica de una manera controlada. De esta manera, la composición proporciona una liberación y degradación del antígeno relativamente lenta.

Mientras que las proteínas tipo mancha ASC en endocitosis/fagocitadas se encontraban dentro del orgánulo fagolisosoma, se observaron claramente los pinzamientos de vesículas tubulares del orgánulo. Se sabe que los oligopéptidos, los productos de degradación de las proteínas dentro de los fagolisosomas, se cargan en moléculas de clase II del MHC en este tipo de vesículas.

Las vacunas ideales están diseñadas para tener una vida útil prolongada, para ser resistentes a los ciclos de congelación y descongelación que podrían ocurrir durante el transporte o por accidente y para preservar su integridad a la temperatura corporal durante largos intervalos, al tiempo que son biodegradables.

Por medio de la composición de la invención, la estabilidad de los antígenos y/o moléculas bioactivas en la composición aumenta a 37°C y la molécula antígeno/bioactiva puede perdurar sin degradación durante al menos 30 días dentro de la composición a esta temperatura. La composición de la invención mejora así la estabilidad de un antígeno en condiciones fisiológicas y alarga su vida útil. Por medio de la composición de la invención, un antígeno puede soportar al menos 8 ciclos de congelación-descongelación sin degradación. Por lo tanto, la composición minimiza cualquier daño que el antígeno/molécula bioactiva pueda soportar por los eventos de congelación y descongelación que podrían ocurrir durante el transporte o por accidente.

Los procesos perjudiciales para antígenos tales como alta temperatura, uso de disolventes orgánicos o congelación-descongelación se eliminan con la composición de la invención.

Todas las descripciones mencionadas anteriormente sobre una composición que contiene portador de proteína tipo mancha ASC y antígenos también son válidas para una composición que contiene el portador de proteína tipo mancha ASC y moléculas bioactivas.

Realizaciones específicas

Ejemplo 1

Síntesis de la composición que contiene el portador de proteínas tipo mancha ASC y las proteínas mCherry fusionadas a proteínas ASC que forman el portador de proteínas tipo mancha ASC en células HEK 293 FT y su purificación a partir del cultivo celular HEK 293 FT.

La secuencia de ADN que codifica un antígeno o una molécula bioactiva en naturaleza peptídica o proteica, se clona en un plásmido que contiene la secuencia codificante de la proteína ASC (SEQ ID NO: 1) de manera que formen una proteína de fusión. El plásmido debe contener preferiblemente un origen de replicación de SV40 (por ejemplo, pcDNA3

o esqueleto del vector pEGFP-C3). El plásmido creado en consecuencia se transfecta en una línea celular seleccionada para sobreexpresar la proteína de fusión antígeno ASC (o molécula bioactiva). La línea celular HEK 293 FT se usó en esta invención porque multiplica el origen de replicación de SV40 que contiene plásmidos en altos números de copias dentro de las células.

5 El plásmido pmCherry-C3.1-ASC que codifica la proteína de fusión mCherry-ASC se transfectó en células HEK 293 FT mediante el método de calcio-fosfato. Se colocaron en placa 1 millón de células en una placa de cultivo celular de 35 mm un día antes de la transfección. Se añadió 1 µg de plásmido hasta 219 µl de volumen con agua destilada y se mezcló con 31 µl de 2M CaCl₂. Se añadieron 250 µl de 2X HBS (280 mM de NaCl, 50 mM de HEPES, 1.5 mM de Na₂HPO₄, pH=7.05), se mezclaron y la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió gota a gota en células HEK 293 FT colocadas en placas el día anterior. Alternativamente, la mezcla de transfección se puede agregar justo después de colocar las células en placas y antes de que se adhieran a la placa de cultivo.

15 No de acuerdo con la invención, cuando la proteína ASC se sobreexpresó en células HEK 293 FT, se sintetizaron manchas ASC sin la necesidad de un estímulo. Cuando los péptidos o proteínas fusionados a la proteína ASC (por ejemplo, MCherry-ASC) formando el portador de la proteína tipo mancha ASC se expresaron en exceso en las células HEK 293 FT, formaron la composición inventiva con el portador de la proteína tipo mancha ASC como una proteína de fusión sin estímulo (Figura 1A-C).

20 La composición compuesta por el portador de proteína tipo mancha mCherry y las proteínas mCherry fusionadas a proteínas ASC formando el portador de proteína tipo mancha mCherry en células HEK 293 FT se mostró bajo microscopía confocal (Figura 1A), microscopía de campo claro (Figura 1B) y superposición de imágenes de microscopía confocal y de campo claro (Figura 1C).

25 Se describió anteriormente un protocolo detallado sobre la purificación de las proteínas tipo mancha ASC del cultivo celular (Fernandes-Alnemri et al., 2007). En nuestra invención, la purificación de la composición de la invención se llevó a cabo basándose en este protocolo. Se recogieron células HEK 293 FT que contenían la composición en solución tampón Triton X-100 con cóctel inhibidor de proteasa (Triton X-100 al 1%, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM, pH=7.5) y se pasaron a través de una punta de aguja G22 20 veces. El lisado obtenido se centrifugó a 30 5000 rpm durante 1 minuto y las proteínas solubles en el sobrenadante se descartaron. Más tarde, el sedimento se resuspendió en 1X PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄). Opcionalmente, el sedimento resuspendido se puede pasar a través de un filtro de 5 µm.

35 La composición obtenida después de este proceso, compuesta por el portador de proteína tipo mancha mCherry y las proteínas mCherry fusionadas con las proteínas ASC que forman el portador de proteína tipo mancha mCherry, se mostró bajo microscopía confocal (Figura 1D), microscopía de campo claro (Figura 1E) y superposición de imágenes de microscopía confocal y de campo claro (Figura 1F) in vitro.

40 Tanto dentro de la célula como in vitro, la proteína mCherry estaba presente en el portador de la proteína tipo mancha ASC como una proteína de fusión (Figura 1A, 1D).

Ejemplo 2

45 Síntesis de una secuencia de ADN fusionada que codifica la proteína de fusión mCherry-ASC.

Para clonar el plásmido pmCherry-C3.1-ASC que codifica la proteína de fusión mCherry-ASC, la secuencia de ADN que codifica la proteína ASC humana se obtuvo del plásmido pcDNA3-ASC mediante digestión con enzimas HindIII-EcoRI y se ligó al sitio de clonación múltiple del vector pmCherry-C3.1 digerido con las mismas enzimas para crear una secuencia codificante de la proteína de fusión mCherry-ASC. El plásmido pcDNA3-ASC fue un obsequio de Gabriel Nunez (Universidad de Michigan, Ann Arbor, Estados Unidos).

50 Con el fin de clonar el plásmido pmCherry-C3.1, la secuencia codificante de la proteína mCherry se amplificó por PCR a partir del plásmido pcDNA3 IFP 1.4 utilizando los cebadores NheI_mCherry_F (gctagcaccatggtgctcaagggcgaaga) y XhoI_mCherry_R (ctcgagtttctgtacagctgctcat) La secuencia codificante de la proteína EGFP se digirió y se eliminó del plásmido pEGFP-C3 mediante enzimas NheI-XhoI y el producto de la PCR digerido con las mismas enzimas se ligó a su lugar. pcDNA3 IFP 1.4 fue un obsequio de Tsien Lab (Universidad de California en San Diego, San Diego, Estados Unidos).

60 Se puede crear una proteína de fusión clonando la secuencia codificante de antígeno/molécula bioactiva preferida en el extremo N de la secuencia codificante de la proteína ASC (SEQ ID NO: 1) como en el ejemplo de la proteína de fusión mCherry-ASC o alternativamente a la C-terminal o dentro de la secuencia codificante de la proteína.

Ejemplo 3

65 Métodos alternativos de carga de antígenos y/o moléculas bioactivas en el portador de proteína tipo mancha ASC.

Se proporcionó FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2, SEQ ID NO: 10) cargado en el portador de proteína tipo mancha ASC como un ejemplo de moléculas bioactivas que pueden cargarse en el portador de proteína tipo mancha ASC. La proteína FGF2 es un factor de crecimiento conocido por su papel en la angiogénesis, el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas.

Cuando sea deseable cargar un antígeno o una molécula bioactiva en proteínas tipo mancha ASC sin crear una proteína de fusión con la proteína ASC (SEQ ID NO: 1), el plásmido que contiene la secuencia de ADN que codifica el antígeno y/o la molécula bioactiva y el plásmido que contiene la secuencia de ADN que codifica la proteína ASC se cotransfectan en la línea celular preferida.

Como ejemplo, el plásmido que codifica la proteína de fusión mCherry-FGF2 se cotransfectó con el plásmido que codifica la proteína de fusión EGFP-ASC. Una mezcla de plásmidos que codifican mCherry-FGF2 y EGFP-ASC, 1 µg cada uno, se mezcló en un volumen total de 219 µl en agua destilada. El resto del procedimiento de transfección y la purificación de la composición de la invención que comprende el portador de la proteína tipo mancha ASC y el antígeno y/o molécula bioactiva se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1.

La composición de la invención que consiste en el portador de proteína tipo mancha ASC, proteínas EGFP (antígeno) fusionadas a proteínas ASC que forman el portador de proteína tipo mancha ASC y la proteína mCherry-FGF2 (molécula bioactiva) que recubre la cubierta externa del portador de proteína tipo mancha ASC en HEK 293 FT las células se mostraron bajo microscopía confocal (Figura 2A-B), microscopía de campo claro (Figura 2C) y superposición de imágenes de microscopía de campo claro y confocal (Figura 2D).

Se puede observar que una cubierta esférica compuesta por proteínas de fusión mCherry-FGF2 recubre la cubierta externa del portador de la proteína tipo mancha ASC compuesta por las proteínas de fusión EGFP-ASC en células obtenidas mediante microscopía confocal (Figura 2). En esta figura y en todas las demás figuras, se mostró EGFP en verde, se mostró mCherry en rojo y la señal de superposición en imágenes combinadas de estas proteínas se mostró en amarillo.

La composición de la invención es capaz de comprender más de un tipo de péptido o proteína de diferentes maneras. La composición de la invención es capaz de transportar al menos un péptido/proteína o al menos un tipo de péptido/proteína que recubre su cubierta externa, mientras que al menos un péptido/proteína o al menos un tipo de péptido/proteína dentro de las proteínas tipo mancha ASC.

Cualquier interacción entre mCherry (SEQ ID NO: 3), EGFP (SEQ ID NO: 2), proteínas tipo mancha ASC compuestas de proteínas ASC (SEQ ID NO: 1) y proteína FGF2 (SEQ ID NO: 10) no ha sido informado hasta la fecha.

Ejemplo 4

Producción de secuencias de ADN fusionadas que codifican las proteínas de fusión mCherry-FGF2 y EGFP-ASC.

Para clonar el plásmido pmCherry-C3-FGF2 (isoforma de 18 kDa) que codifica la proteína de fusión mCherry-FGF2, se amplificó el ADNc de la isoforma de 18 kDa del gen FGF2 a partir de una biblioteca de ADNc sintetizada utilizando ARN aislado de células HeLa, utilizando cebadores HindIII_Fgf2_F (ctataagcttatggcagccgggagcatcacc) y EcoRI_Fgf2_R (atgaattcagctcttagcagacattggaag). El producto de la PCR digerido con las enzimas HindIII y EcoRI se clonó ligando en el vector pmCherry-C3.1 digerido con las mismas enzimas.

Para clonar el plásmido pEGFP-C3-ASC que codifica la proteína de fusión EGFP-ASC, la secuencia de ADN que codifica la proteína ASC humana se digirió del plásmido pcDNA3-ASC utilizando enzimas HindIII-EcoRI y se creó la secuencia codificante de la proteína de fusión EGFP-ASC ligando esta secuencia de ADN en el sitio de clonación múltiple del vector EGFP-C3 digerido con las mismas enzimas. El vector pEGFP-C3 se adquirió de Clontech.

Ejemplo 5

Recubrimiento de la capa externa de las proteínas tipo mancha mCherry-ASC con péptidos fusionados a EGFP a través de interacciones hidrófobas.

Si el antígeno y/o la molécula bioactiva no pueden recubrir la cubierta externa del portador de la proteína tipo mancha ASC como se muestra en el Ejemplo 3, entonces debería estar vinculado a una estructura con propiedades hidrófobas.

Por ejemplo, cuando el plásmido codificante de la proteína EGFP hidrófila (EGFP-stop, SEQ ID NO: 2) se cotransfectó con el plásmido codificante mCherry-ASC, la proteína EGFP (SEQ ID NO: 2) no colocalizó con el portador de proteína tipo mancha ASC compuesto por proteínas de fusión mCherry-ASC y no cubrió la cubierta externa del portador de proteína tipo mancha ASC (Figura 3A-C).

Sin embargo, cuando se creó una proteína de fusión con la proteína EGFP (SEQ ID NO: 2) y el péptido 1 hidrófobo (SEQ ID NO: 4) y el plásmido que codifica esta proteína de fusión se cotransfectó con la codificación mCherry-ASC plásmido, EGFP-Péptido 1 recubierto la cubierta externa del portador de la proteína tipo mancha ASC compuesto por proteínas de fusión mCherry-ASC (Figura 3D-F).

Cuando se creó una proteína de fusión a partir de la proteína EGFP (SEQ ID NO: 2) y el péptido 2 hidrofílico (SEQ ID NO: 8) o el péptido 3 (SEQ ID NO: 9), estas proteínas de fusión no recubrieron la cubierta externa de la proteína tipo mancha Cherry ASC (Figura 3G-L). El péptido 1 (SEQ ID NO: 4), el péptido 2 (SEQ ID NO: 8) y el péptido 3 (SEQ ID NO: 9) tienen una longitud de 26 aminoácidos.

Se probó si las versiones más cortas del Péptido 1 hidrófobo (SEQ ID NO: 4) también podían recubrir la cubierta externa de las proteínas tipo mancha ASC a través de sus propiedades hidrófobas y formar la composición de la invención junto con las proteínas tipo mancha ASC. Estas secuencias peptídicas acortadas son versiones largas de 19, 12 y 8 aminoácidos del Péptido 1. Entre estos péptidos acortados, solo la proteína de fusión EGFP-Péptido 1_19aa recubría la cubierta externa de las proteínas tipo mancha mCherry-ASC, cuando 19 aminoácidos de longitud el Péptido 1_19aa (SEQ ID NO: 5) estaba en una proteína de fusión con proteína EGFP (SEQ ID NO: 2) (Figura 4A-C). Cuando se crearon proteínas de fusión con versiones aún más cortas del Péptido 1, siendo el Péptido 1_12aa (SEQ ID NO: 6) o el Péptido 1_8aa (SEQ ID NO: 7), y EGFP (SEQ ID NO: 2); estas proteínas de fusión no cubrían la capa externa de las proteínas tipo mancha mCherry-ASC (Figura 4D-I). Por lo tanto, la longitud más corta de un péptido hidrófobo requerido para cargar una proteína en las proteínas tipo mancha ASC debe tener al menos 13 aminoácidos de longitud.

Se proporcionaron gráficos de hidropatía de los péptidos mencionados anteriormente (Figura 5). De acuerdo con las gráficas de hidropatía y los valores medios calculados de hidrofobicidad (Tabla 1), parece que el Péptido 1 (SEQ ID NO: 4) y sus versiones más cortas son más hidrófobas en comparación con el Péptido 2 (SEQ ID NO: 8) y el Péptido 3 (SEQ ID NO: 9). No se pudo encontrar una relación entre las cargas eléctricas de los péptidos que figuran en la Tabla 1 y su capacidad para cargarse en proteínas tipo mancha mCherry ASC. Se ha demostrado anteriormente que la superficie de la proteína ASC (SEQ ID NO: 1) es rica en aminoácidos hidrófobos conservados evolutivamente y estos aminoácidos son críticos para la oligomerización de la proteína ASC (SEQ ID NO: 1) (Moriya et al. 2005). Tomados en conjunto, se ha demostrado que la razón de la capacidad de las proteínas de fusión EGFP-Péptido 1 y EGFP-Péptido 1_19aa para cargarse en las proteínas tipo mancha mCherry-ASC es su estructura hidrófoba.

Tabla 1: Propiedades de los péptidos fusionados a EGFP.

	Longitud	Hidrofobicidad media	Carga (pH=7)	Posibilidad de ser cargado a proteínas tipo mancha
Péptido 1 (SEQ ID NO: 4)	26	1.98	0	+
Péptido 2 (SEQ ID NO: 8)	26	-1.96	-1.9	-
Péptido 3 (SEQ ID NO: 9)	26	-1.4	-3	-
Péptido 1_19aa (SEQ ID NO: 5)	19	3.22	-1	+
Péptido 1_12aa (SEQ ID NO: 6)	12	2.39	-1	-
Péptido 1_8aa (SEQ ID NO: 7)	8	2.89	-1	-

Los gráficos de hidropatía (Figura 5) y las cargas eléctricas calculadas de péptidos a pH=7.0 en la Tabla 1 se calcularon utilizando la aplicación en <http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>. Los valores medios de hidrofobicidad de los péptidos dados en la Tabla 1 se calcularon utilizando la aplicación en <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>.

Cotransfección de mCherry-ASC y EGFP-Péptido X (X es Péptido 1 (SEQ ID NO: 4), Péptido 1_19aa (SEQ ID NO: 5), Péptido 1_12aa (SEQ ID NO: 6), Péptido 1_8aa (SEQ ID NO: 7), el péptido 2 (SEQ ID NO: 8), el péptido 3 (SEQ ID NO: 9) que codifican los plásmidos y la purificación de las proteínas tipo mancha del cultivo celular se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 3.

La clonación de los plásmidos EGFP-X se llevó a cabo de la siguiente manera:

pEGFP-péptido 1, pEGFP-péptido 2, pEGFP-péptido 3.

La sección de 22 aminoácidos de la secuencia larga de 26 aminoácidos codificada por el sitio de clonación múltiple del vector pEGFP-C3 se cambió con 3 péptidos elegidos al azar de la misma longitud. Estos péptidos son tres secuencias consecutivas seleccionadas del gen de resistencia a la ampicilina del vector pcDNA3. El péptido 1 (SEQ

ID NO: 4) fue amplificado en PCR con BgIII_Amp1_F (ataagatcttatgagattcaacattccgtg) y EcoRI_Amp1_R cebadores (tgaattcaaaaaacaggaaggcaaaatgcc), el péptido 2 (SEQ ID NO: 8) con BgIII_Amp2_F (tctagatctgtcaccagaaacgctggtg) y EcoRI_Amp2_R cebadores (tgaattcagtaaccactcgtgcaccaac), el péptido 3 (SEQ ID NO: 9) con BgIII_Amp3_F (ataagatcttatgcaactggatctcaacagcg) y EcoRI_Amp3_R (tgaattcacattggaaaacgttctcg) cebadores y clones clonados entre los sitios BgIII-EcoRI en el vector de pEGFP-C3 mediante la digestión del producto de la PCR y el vector con estas enzimas y se ligaron entre sí.

Versiones más cortas de pEGFP-péptido 1.

Las versiones largas de 15, 8 y 4 aminoácidos del Péptido 1 clonado a partir del gen de resistencia a la ampicilina se subclonaron mediante la ligadura de los oligonucleótidos ordenados a los sitios BgIII-EcoRI en el vector pEGFP-C3 (los péptidos largos de 15, 8 y 4 aminoácidos forman 19, 12, 8 aminoácidos péptidos largos con secuencia YSDL en su inicio). Para clonar el pEGFP-péptido 1_19aa (SEQ ID NO: 5), amp1_19aa_F (gatctgtcgccttattccctttttgCGGCatttgccttctgtttttg) y amp1_19aa_R (aattcaaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggaataagggcgacaa) oligonucleótidos; para clonar pEGFP-Péptido 1_12aa (SEQ ID NO: 6), amp1_12aa_F (gatctgtcgccttattgccttctgtttttg) y amp1_12aa_R (aattcaaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaa) oligonucleótidos; y para clonar pEGFP-Péptido 1_8aa (SEQ ID NO: 7), amp1_8aa_F (gatcttctcctgtttttg) y amp1_8aa_R (aattcaaaaaacaggaagaa), los oligonucleótidos se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente en una hora. Los oligonucleótidos, autofusionados en sus secuencias complementarias de esta manera, fueron clonados entre los sitios BgIII y EcoRI en el vector pEGFP-C3 mediante la digestión de los oligonucleótidos autofusionados y el vector con estas enzimas y ligándolas entre sí.

Se puede crear una proteína de fusión clonando la secuencia codificante de antígeno/molécula bioactiva preferida en el extremo N o C del Péptido 1, Péptido 1_19aa o cualquier otra secuencia codificante de péptido, que logre la carga de de antígeno/moléculas bioactivas en proteínas tipo mancha ASC.

Ejemplo 6

Estimulación de EGFP-ASC que expresa células THP-1 estables con estímulos proinflamatorios.

La composición de la invención que comprende proteína tipo mancha ASC cargadas con antígenos y/o moléculas bioactivas puede sintetizarse mediante la expresión de antígenos y/o moléculas bioactivas fusionadas a la proteína ASC en una línea celular inducible por estímulos proinflamatorios y, posteriormente, estimulando las células con tales estímulos proinflamatorios.

Tales estímulos proinflamatorios pueden ser cualquier estímulo que desencadene los inflamomas NLRP3, NLRC4 o AIM2. El inflamoma NLRP3 puede ser activado por urea monosódica (MSU), ácido úrico, amianto, sílice, hidróxido de aluminio, ATP, sustancias dañinas para la membrana plasmática como nigericina, UVB, hialuronano, fibras de amiloide-β y cristales de deshidrato de pirofosfato de calcio; el inflamoma NLRC4 puede ser activado por la flagelina; y el inflamoma AIM2 puede desencadenarse por ADN citosólico o análogos de ADN (poliA:T) (Franchi et al., 2009, Jin et al., 2010).

Para crear una línea celular estable que exprese EGFP-ASC, se empleó el método de transducción lentiviral en células THP-1. Para producir lentivirus, el plásmido lentiviral pLenti-Efla-EGFP-ASC, que codifica la proteína de fusión EGFP-ASC, se cotransfectó con plásmidos auxiliares (pCMVdeltaR8.74 y pMD2.G) en células HEK 293 FT (4 µg de cada 3 los plásmidos se transfectaron a 5 millones de células sembradas en placa en una placa de 100 mm). 2 días después de la transfección, el sobrenadante de cultivo celular que contenía lentivirus se pasó a través de un filtro de 0.45 µm y se mezcló con polibreno (concentración final: 4 µg/ml). Posteriormente, el sobrenadante que contenía lentivirus se añadió a la célula THP-1 y se incubó durante 5 horas. El sobrenadante del cultivo celular se cambió después de la incubación y se observó un aumento en el número de células que expresan la proteína de fusión EGFP-ASC en un período de 5 días. Al final del quinto día, las células se colocaron en placas de 96 pozos, de modo que cada pozo recibió una sola célula y se estableció una colonia de líneas celulares estables derivada de una sola célula.

La proteína de fusión EGFP-ASC que expresaba la línea celular de monocitos THP-1 estable se diferenciaba para adquirir características de macrófagos mediante incubación con PMA 0.5 µM durante 3 horas. Las células diferenciadas se estimularon con 150 µg/ml de MSU durante 8 horas para activar el inflamoma NLRP3 y se observó que las células sintetizaban manchas de EGFP-ASC. El resto de la purificación de las proteínas tipo mancha ASC del proceso de cultivo celular se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

Para la transducción lentiviral de la proteína de fusión EGFP-ASC en la línea celular de monocitos THP-1, la secuencia de ADN que codifica EGFP-ASC se digirió del plásmido pEGFP-C3-ASC con enzimas NheI-NotI y se clonó ligándola en el vector pLenti-Efla digerido con las mismas enzimas. El esqueleto del vector pLenti-Efla se tomó del plásmido pLenti-EF1a-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE. El plásmido pLenti-EF1a-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE y los plásmidos auxiliares pCMVdeltaR8.74 y pMD2.G fueron donados por Deisseroth Lab (Stanford University, Stanford, Estados Unidos).

En EGFP-ASC que expresan células THP-1 estables, las proteínas de fusión EGFP-ASC estaban presentes en el citosol en un patrón difuso en ausencia de estímulos proinflamatorios (tales como MSU). Las proteínas tipo mancha de EGFP-ASC se sintetizaron cuando las células se estimularon con 150 µg/ml de MSU durante 8 horas.

- 5 Se puede crear una proteína de fusión clonando la secuencia codificante de antígeno/molécula bioactiva preferida a la secuencia codificante de la proteína ASC (SEQ ID NO: 1) en el extremo N como en el ejemplo EGFP-ASC o alternativamente en el extremo C o dentro de la secuencia codificadora de proteínas.

Ejemplo 7

10 Síntesis de la composición de la invención in vitro (la proteína de fusión no está de acuerdo con la invención)

Se puede producir un antígeno o una molécula bioactiva como una proteína de fusión con la proteína ASC en un sistema de expresión bacteriano. Alternativamente, el antígeno/molécula bioactiva y las proteínas ASC se pueden producir en un sistema de expresión génica bacteriana por separado (no como una proteína de fusión). Posteriormente, las proteínas de fusión purificadas o las proteínas expresadas por separado forman la composición de la invención mediante incubación a 37°C en una solución que contiene <50 mM KCl in vitro.

20 Como ejemplo, se clonó la secuencia codificante de la proteína de fusión histidina-EGFP-ASC 6X en el esqueleto del vector pETM-20 y el plásmido se transformó en la cepa bacteriana Rosetta2 pLysS. La expresión génica controlada por el sistema pET se indujo mediante IPTG 0.4 mM a 15°C durante la noche. La cepa bacteriana se cultivó en Terrific Broth (12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura, 4 ml de glicerol, 0.017 M KH₂PO₄, 0.072 M K₂HPO₄ en 1 L de agua). La purificación de proteínas se realizó como se describe en la técnica anterior (Alba, 2007). El sedimento bacteriano se centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos y se resuspendió en Tris 20 mM, pH=8, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM y solución que contenía clorhidrato de guanidinio 5 M y se sometió a sonicación. Los restos celulares se centrifugaron a 13000 rpm durante 45 minutos y el sobrenadante se pasó a través de una columna de purificación de His (Pierce). La columna se lavó en una solución que contenía imidazol 20 mM y la proteína se eluyó en una solución que contenía imidazol 200 mM. El pH de elución se redujo a pH=4 y se dializó frente a agua a pH=4.

30 La síntesis de proteína tipo mancha in vitro se llevó a cabo como se describe en la técnica anterior (Fernandes-Alnemri et al., 2007). Se incubaron 10 ng/µl de proteína EGFP-ASC purificada y dializada a 37°C durante 1 hora en una solución que contenía Tris-HCl 30 mM, pH 7.5.

35 Con el fin de clonar el plásmido pETM20-6X-His-EGFP-ASC, la secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión EGFP-ASC se digirió a partir del plásmido pEGFP-C3-ASC con enzimas NcoI-NotI y se clonó ligando esta secuencia en el 6X His contiene el vector pETM20 digerido con las mismas enzimas.

40 Se puede crear una proteína de fusión clonando la secuencia codificante de antígeno/molécula bioactiva preferida a la secuencia codificante de proteína ASC (SEQ ID NO: 1) en el extremo N como en el ejemplo 6X de histidina-EGFP-ASC o alternativamente en el extremo C o dentro de la secuencia codificante de la proteína.

Ejemplo 8 (no de acuerdo con la invención)

45 Cuando la proteína ASC (SEQ ID NO: 1) fusionada a antígeno/moléculas bioactivas se expresa en bacterias, las proteínas de fusión quedan atrapadas en cuerpos de inclusión. Al utilizar el método descrito en este ejemplo, se pueden sintetizar agregados en micropartículas de proteínas ASC derivadas de cuerpos de inclusión o manchas ASC in vitro.

50 La proteína de fusión 6X histidina-EGFP-ASC se clonó en el esqueleto del vector pETM-20 y el plásmido se transformó en la cepa bacteriana Rosetta2 pLysS. La expresión génica controlada por el sistema pET se indujo con IPTG 0.4 mM a 15°C durante la noche. La cepa bacteriana se cultivó en Terrific Broth (12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura, 4 ml de glicerol, 0.017 M KH₂PO₄, 0.072 M K₂HPO₄ en 1 L de agua). Se sedimentaron 30 ml de bacterias a 8000 rpm durante 15 minutos. El sedimento bacteriano se resuspendió en 10 ml de solución Triton X-100 (Triton X-100 al 1%, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH=7,5) y se incubó a 30°C durante 15 minutos. Durante la incubación, la enzima lisozima T7, presente en la cepa Rosetta2 pLysS, digirió las paredes celulares bacterianas. Posteriormente, el sedimento bacteriano se sometió a sonicación y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos. La fase sobrenadante se enriqueció en proteínas bacterianas solubles y esta fase se descartó. A continuación, el sedimento se resuspendió en una solución de PBS que contenía SDS al 1% y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos. Esta vez, el sobrenadante se enriqueció en proteínas de fusión 6X-histidina-EGFP-ASC extraídas de cuerpos de inclusión. Las proteínas se precipitaron mezclando 1 volumen de sobrenadante con 4 volúmenes de acetona, mientras que SDS permanece en el sobrenadante gracias a la acetona. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante se desechó. El sedimento de proteínas se lavó con 4 volúmenes de acetona durante 2 veces más. Se añadió 1 volumen de PBS sobre el sedimento y se sometió a sonicación. Este método de síntesis de proteína tipo mancha in vitro a partir de proteínas de fusión ASC extraídas de cuerpos de inclusión se denomina método Triton X-100/SDS/Acetona (TSA).

65

Cuando una preparación sintetizada a partir de la proteína de fusión histidina-EGFP-ASC 6X utilizando el método TSA se examinó bajo microscopía confocal, se observaron estructuras de proteína tipo mancha de tamaño micrométrico.

5 Se puede crear una proteína de fusión mediante la clonación de la secuencia codificante de antígeno/molécula bioactiva preferida a la secuencia codificante de la proteína ASC (SEQ ID NO: 1) en el extremo N como en el ejemplo 6X de histidina-EGFP-ASC o alternativamente en el extremo C o dentro de la secuencia codificadora de proteínas.

Ejemplo 9 (no de acuerdo con la invención)

10 Obtención del portador de las proteínas tipo mancha ASC utilizando diferentes homólogos de ASC.

Se crea una proteína de fusión con un antígeno/molécula bioactiva y el homólogo de pez cebra de la proteína ASC (SEQ ID NO: 11). Como ejemplo, el plásmido que codifica la proteína de fusión EGFP-zASC se transfirió en células HEK 293 FT, como se describe en el Ejemplo 1. La transfección y purificación de las proteínas tipo mancha ASC del cultivo celular se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

15 Para clonar el plásmido que codifica la proteína de fusión EGFP-zASC, el homólogo de pez cebra de la secuencia codificante de la proteína ASC (zASC) se amplificó a partir de ADNc sintetizado a partir de ARN de embriones de pez cebra de 9 días de edad utilizando los cebadores Sacl_zAsc_F (atagagctcatggcgaatctttcaaggag) y EcoRI_zAsc_R (agaattctactgagcatcctcaaggtc) y se clonó mediante la digestión del producto de PCR y el plásmido pEGFP-C3 con enzimas Sacl-EcoRI y se ligaron entre sí. El ADNc de pez cebra fue un obsequio de Xalid Bayramli (Universidad de Bogazici, Estambul, Turquía).

20 Se puede crear una proteína de fusión mediante la clonación de la secuencia codificante de antígeno/molécula bioactiva preferida a la secuencia codificadora de la proteína zASC (SEQ ID NO: 11) en el extremo N como en el ejemplo EGFP-zASC o alternativamente en el extremo C o dentro de la secuencia codificadora de proteínas.

Ejemplo 10

30 Obtención de la composición de la invención que consiste en un antígeno/molécula bioactiva y el portador de proteína tipo manchas ASC compuesto de proteína zASC.

35 Como ejemplo de carga de un antígeno/molécula bioactiva en el portador de la proteína tipo mancha formado por la proteína ASC de pez cebra (SEQ ID NO: 11) mediante interacciones hidrófobas, proteína de fusión EGFP-zASC y mCherry-Péptido 1 (Péptido 1, SEQ ID NO: 4) la proteína de fusión que codifica los plásmidos se cotransfectaron en células HEK 293 FT. La cotransfección y la purificación de las proteínas tipo mancha ASC del cultivo celular se llevaron a cabo como en el Ejemplo 3. Como resultado de la cotransfección, se observó que mCherry-Péptido 1 recubría la cubierta externa de las proteínas tipo mancha EGFP-zASC.

40 Con el fin de clonar pmCherry-C3.1-Péptido 1 plásmido que codifica mCherry-péptido 1 de la proteína de fusión, peptid1_XhoI_F (tcgagtactcagatcttatgagattcaacatttccgtgctgccttattccctttttgcgccattttgccttctgtttttg) y peptid1_EcoRI_R (aattcaaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcataag atctgagtac) oligonucleótidos se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y se enfrió hasta la temperatura ambiente lentamente en una hora. Los oligonucleótidos, autofusionados en sus secuencias complementarias de esta manera, fueron clonados entre los sitios XhoI y EcoRI en el vector pmCherry-C3.1 mediante la digestión de los oligonucleótidos autofusionados y el vector con estas enzimas y ligándolos entre sí.

Ejemplo 11

50 La membrana incluyó el estado de la composición inventiva atrapada en células THP-1 dentro de la célula y su lenta degradación.

55 Se produjeron manchas mCherry-ASC por sobreexpresión de las proteínas de fusión mCherry-ASC en células HEK 293 FT como se describe en el Ejemplo 1. Como resultado de la purificación de proteínas tipo mancha mCherry-ASC sintetizadas en cultivo celular como se describe en el Ejemplo 1, se obtuvieron proteínas tipo mancha de 2-8 micrómetros de diámetro. La proteína EGFP-ASC que expresa células THP-1 estables con características de macrófagos después del tratamiento con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) se incubó con las proteínas tipo mancha mCherry. Tras las 2 horas de incubación, se observó que las células THP-1 que contenían EGFP-ASC en su citoplasma atrapaban proteínas tipo mancha mCherry-ASC en una distribución difusa y en concentraciones bajas (Figura 6, t=0 s). En las células analizadas bajo microscopía confocal, se observó que las señales provenientes del EGFP-ASC expresado de forma estable y la proteína tipo mancha ASC-ASC recientemente atrapada no se superponían. Se sabe que en las proteínas que sobreexpresan las proteínas EGFP-ASC y mCherry-ASC, estas dos proteínas de fusión se colocan en las mismas proteínas tipo mancha. La falta de colocación en la proteína tipo mancha cherry-ASC endocitosada y estable EGFP-ASC expresando células THP-1 mostró que la proteína tipo mancha ASC-ASC estaba presente en un orgánulo cerrado por membrana. Esta membrana encerrada en orgánulo es el fagolisosoma.

Otra evidencia que muestra el estado encerrado en la membrana de las proteínas tipo mancha mCherry-ASC atrapadas se obtuvo durante la incubación prolongada de células THP-1 en condiciones que promueven la apoptosis. En condiciones fisiológicas, la proteína tipo mancha en endocitosis fue encerrada con una membrana apretada y no fue posible distinguir la membrana en estas condiciones. Sin embargo, durante la incubación prolongada de células THP-1 diferenciadas con PMA en un entorno no fisiológico, se perdió la integridad de la membrana plasmática de las células (ampollas de membrana). Con el fin de promover la progresión gradual de las células hacia la apoptosis, las células THP-1 se mantuvieron entre un portaobjetos y un cubreobjetos en PBS y se tomaron imágenes de >30 minutos.

Simultáneamente con la deformación de la membrana plasmática, la membrana del fagolisosoma se deformó y expandió. Por lo tanto, la membrana que encierra las proteínas tipo mancha ASC atrapada en el fagolisosoma se hizo visible. Además, se observó claramente que el espacio dentro del fagolisosoma pero fuera de la estructura de la proteína tipo mancha esférica se llenó con mCherry-ASC, que se separó de las proteínas tipo mancha ASC (Figura 6, t=600 s a t=1100 s). El portador de la proteína tipo mancha ASC-ASC se distinguió bajo la imagen de microscopía de campo claro como una estructura sólida y esférica dentro del fagolisosoma. La mayor parte de la señal de mCherry-ASC proveniente del orgánulo fagolisosoma provino de esta estructura. En la Figura 6, para mostrar la señal mCherry-ASC en el espacio dentro del fagolisosoma pero fuera de la estructura de la proteína tipo mancha esférica, la señal en la estructura de la proteína tipo mancha esférica estaba saturada y las diferencias entre las dos regiones no estaban claras. Sin embargo, la intensidad de la señal proveniente de la portadora de la proteína tipo mancha ASC-ASC fue mucho mayor que la difusa mCherry-ASC en el fagolisosoma, lo que indica una degradación lenta y controlada en el interior del fagolisosoma. Además, la falta de degradación de la proteína tipo mancha de mCherry-ASC completa en el período de tiempo en que se observaron las células bajo microscopía confocal y la estabilidad de las proteínas tipo mancha mCherry-ASC a 37°C durante al menos 30 días en solución, sugirió que la degradación controlada en el fagolisosoma puede tomar un período de horas o incluso días.

Las células THP-1 se sometieron a apoptosis no debido a las proteínas tipo mancha ASC atrapadas, sino debido a la exposición prolongada a condiciones no fisiológicas. Las células THP-1, incubadas con proteínas tipo mancha mCherry-ASC durante diferentes períodos de tiempo, preservaron la integridad de su membrana en los primeros 5-10 minutos de obtención de imágenes, mientras que la muerte celular se observó alrededor del minuto 20. Además, las células podrían preservar la integridad de su membrana, cuando se examinaron utilizando una cámara de crecimiento durante el mismo período de tiempo.

Ejemplo 12

Pinzamientos de vesículas tubulares de los fagolisosomas que contienen la composición de la invención.

Cuando se generaron imágenes de EGFP-ASC que expresaba células THP-1 estables con mCherry-ASC atrapadas, en lapsos de tiempo bajo microscopía confocal usando cámaras de crecimiento que mantenían las condiciones del cultivo celular, se observó que las proteínas tipo mancha mCherry-ASC conservaban su estructura esférica dentro de la célula, mientras que las vesículas tubulares que contenían mCherry-ASC fueron pinzadas a partir del fagolisosoma (Figura 7). Se desconoce el tiempo requerido para la degradación total de los puntos atrapados. Sin embargo, este hallazgo sugiere que los antígenos transportados con el portador de la proteína tipo mancha ASC pueden degradarse en el fagolisosoma de manera controlada y pueden ingresar en la vía de presentación del antígeno dejando el orgánulo fagolisosoma en las vesículas tubulares. Para ingresar a la vía de presentación del antígeno, este tipo de vesículas se deben fusionar con la molécula MHC de clase II que contiene las vesículas y llegar a la membrana plasmática.

Además, las vesículas que contenían mCherry-ASC que sobresalían del fagolisosoma no se superponían con el citoplasma EGFP-ASC. Esto también es una evidencia de la hipótesis de que las estructuras que se desprenden del fagolisosoma son vesículas encerradas en membrana.

Con el fin de mantener viables las células de macrófagos THP-1 durante la obtención de imágenes de lapso de tiempo, se empleó una cámara de crecimiento casera. El gel de agarosa se vertió en una placa de 60 mm y una pieza del tamaño de un cubreobjetos se cortó y se extrajo del gel de agarosa. El gel de agarosa se calentó a 37°C y el hueco en el gel se llenó con medio de cultivo celular a 37°C. Un cubreobjetos recubierto de células THP-1 se montó en la cámara de crecimiento al revés y la generación de imágenes se realizó bajo microscopía confocal. De esta manera, se observó que las membranas celulares THP-1 permanecen estables durante al menos 30 minutos.

Ejemplo 13

Resistencia de la composición de la invención frente a incubación prolongada a 37°C.

Para medir la estabilidad de la composición a temperatura fisiológica (37°C) in vitro, que estaba compuesta por un antígeno o una molécula bioactiva cargada en el portador proteínas tipo mancha ASC como una proteína de fusión o por medio de interacciones hidrófobas, el plásmido codificante mCherry-ASC se transfirió en células HEK 293 FT solas o con el plásmido que codifica EGFP-Péptido 1 (Péptido 1, SEQ ID NO: 4).

Las proteínas tipo mancha ASC se aislaron del cultivo celular como se describe en el Ejemplo 1 y se incubaron en solución de PBS a 37°C durante 30 días. Al final del día 30, se observó que las estructuras esféricas de Proteínas tipo mancha ASC mCherry y las estructuras esféricas compuestas de EGFP-Péptido 1 que recubren la cubierta externa de Proteínas tipo mancha ASC mCherry (Figura 8).

5 Ejemplo 14

La resistencia de la composición de la invención frente a ciclos de congelación-descongelación.

10 Las composiciones de la invención sintetizadas y purificadas como en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 4 se sometieron a 8 ciclos consecutivos de congelación y descongelación (de -80°C a +37°C). A partir de las composiciones congeladas y descongeladas en un área unitaria se generaron imágenes con microscopía confocal y se contaron. No se pudieron detectar diferencias estadísticamente significativas entre el primer y el último ciclo de congelación y descongelación. Como ejemplo, se muestra la composición fusionada compuesta por proteínas tipo mancha mCherry (Figura 9).

15 A continuación se presentan las referencias citadas en la descripción.

Referencias

20 Balmayor ER, Azevedo HS, Reis RL. (2011) Controlled delivery systems from pharmaceuticals to cells and genes. *Pharm Res.* 28(6):1241-58.

De Alba E(2007) 1H, 15N and 13C backbone and side chain chemical shifts of human ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain). *Biomol NMR Assign.* 1(1):135-7

25 De Temmerman ML, Rejman J, Demeester J, Irvine DJ, Gander B, De Smedt SC. (2011) Particulate vaccines on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discov Today.* 16(13-14):569-82.

30 Ellebedy AH, Lupfer C, Ghoneim HE, DeBeauchamp J, Kanneganti TD, Webby RJ. (2011) Inflammasome-independent role of the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) in the adjuvant effect of MF59. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(7):2927-32.

35 Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J, Alnemri ES. (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ.* 14(9):1590-604.

Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. (2009) The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* 10(3):241-7.

40 Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. (2011) The inflammasome: an integrated view *Immunol Rev.* 243(1):136-51.

Jin C, Flavell RA. (2010) Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol.* 30(5):628-31.

45 Leemans JC, Cassel SL, Sutterwala FS. (2011) Sensing damage by the NLRP3 inflammasome *Immunol Rev.* 243(1):152-62.

50 Masumoto J, Zhou W, Chen FF, Su F, Kuwada JY, Hidaka E, Katsuyama T, Sagara J, Taniguchi S, Ngo-Hazelett P, Postlethwait JH, Nuñez G, Inohara N. (2003) Caspy, a Zebrafish Caspase, Activated by ASC Oligomerization Is Required for Pharyngeal Arch Development *J Biol Chem.* 7;278(6):4268-76.

Miao EA, Rajan JV, Aderem A. (2011) Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev.* 243(1):206-14.

55 Moriya M, Taniguchi S, Wu P, Liepinsh E, Otting G, Sagara J. (2005) Role of Charged and Hydrophobic Residues in the Oligomerization of the PYRIN Domain of ASC *Biochemistry.* 18;44(2):575-83.

Xiang SD, Scholzen A, Minigo G, David C, Apostolopoulos V, Mottram PL, Plebanski M. (2006) Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods.* 40(1):1-9.

60 Listado de secuencias

<160> 11

<210> 1

65 <211> 196

ES 2 725 328 T3

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

5

<400> 1

Met Gly Arg Ala Arg Asp Ala Ile Leu Asp Ala Leu Glu Asn Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Leu Lys Lys Phe Lys Leu Lys Leu Leu Ser Val Pro Leu
 20 25 30
 Arg Glu Gly Tyr Gly Arg Ile Pro Arg Gly Ala Leu Leu Ser Met Asp
 35 40 45
 Ala Leu Asp Leu Thr Asp Lys Leu Val Ser Phe Tyr Leu Glu Thr Tyr
 50 55 60
 Gly Ala Glu Leu Thr Ala Asn Val Leu Arg Asp Met Gly Leu Gln Glu
 65 70 75 80
 Met Ala Gly Gln Leu Gln Ala Ala Thr His Gln Gly Ser Gly Ala Ala
 85 90 95
 Pro Ala Gly Ile Gln Ala Pro Pro Gln Ser Ala Ala Lys Pro Gly Leu His
 100 105 110
 Phe Ile Asp Gln His Arg Ala Ala Leu Ile Ala Arg Val Thr Asn Val Glu
 115 120 125
 Trp Leu Leu Asp Ala Leu Tyr Gly Lys Val Leu Thr Asp Glu Gln Tyr
 130 135 140
 Gln Ala Val Arg Ala Glu Pro Thr Asn Pro Ser Lys Met Arg Lys Leu
 145 150 155 160
 Phe Ser Phe Thr Pro Ala Trp Asn Trp Thr Cys Lys Asp Leu Leu Leu
 165 170 175
 Gln Ala Leu Arg Glu Ser Gln Ser Tyr Leu Val Glu Asp Leu Glu Arg Ser
 180 185 190

10 <210> 2

<211> 240

<212> PRT

15

<213> Aequorea victoria

<400> 2

ES 2 725 328 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235

<210> 3

5 <211> 236

<212> PRT

<400> 3

10

ES 2 725 328 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe
 1 5 10 15
 Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe
 20 25 30
 Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr
 35 40 45
 Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp
 50 55 60
 Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His
 65 70 75 80
 Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe
 85 90 95
 Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val
 100 105 110
 Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys
 115 120 125
 Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys
 130 135 140
 Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly
 165 170 175
 His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val
 180 185 190
 Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser
 195 200 205
 His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly
 210 215 220
 Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235

<210> 4

5 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

ES 2 725 328 T3

<400> 4

Tyr Ser Asp Leu Met Ser Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro
1 5 10 15
Phe Phe Ala Ala Phe Cys Leu Pro Val Phe
 20 25

5 <210> 5

<211> 19

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<400> 5

Tyr Ser Asp Leu Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala Phe Cys Leu
1 5 10 15
Pro Val Phe

15

<210>. 6

<211> 12

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<400> 6

Tyr Ser Asp Leu Ala Ala Phe Cys Leu Pro Val Phe
1 5 10

30

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<400> 7

Tyr Ser Asp Leu Leu Pro Val Phe
1 5

40

<210> 8

<211> 26

45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 8

50

ES 2 725 328 T3

Tyr Ser Asp Leu Ala His Pro Glu Thr Leu Val Lys Val Lys Asp Ala

1 5 10 15

Glu Asp Gln Leu Gly Ala Arg Val Gly Tyr

 20 25

<210> 9

5 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<400> 9

Tyr Ser Asp Leu Ile Glu Leu Asp Leu Asn Ser Gly Lys Ile Leu Glu

1 5 10 15

Ser Phe Arg Pro Glu Glu Arg Phe Pro Met

 20 25

15 <210> 10

<211> 155

<212> PRT

20

<400> 10

Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu

 20 25 30

Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg

 35 40 45

Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu

 50 55 60

Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn

65 70 75 80

Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys

 85 90 95

Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr

 100 105 110

Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys

 115 120 125

Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys

 130 135 140

Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser

145 150 155

ES 2 725 328 T3

<210> 11

<211> 203

5 <212> PRT

<213> Danio Rerio

<400> 11

10

Met Ala Glu Ser Phe Lys Glu His Leu Gln Glu Ala Phe Glu Asp Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala Asp Asn Leu Arg Lys Phe Lys Ser Lys Leu Gly Asp Arg Arg
 20 25 30
 Gln Glu Pro Arg Val Thr Lys Ser Ala Ile Glu Lys Leu Lys Asp Glu
 35 40 45
 Ile Asp Leu Ala Asp Leu Met Val Gly Val Phe Thr Ser Lys Asp Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Thr Val Glu Ile Leu Arg Ala Ile Lys Cys Ile Ala Val
 65 70 75 80
 Ala Asp Asp Leu Leu Arg Asn Thr Gly Gln Ser Glu Ser Lys Gly Ala
 85 90 95
 Pro Ser Asp Glu Ser Lys Cys Ala Ser Ser Lys Ala Val Ser Lys Val
 100 105 110
 Ala Phe Ser Lys Val Asn Phe Ile Asp Glu His Trp Lys Glu Leu Ile
 115 120 125
 Asp Arg Val Asn Asn Val Asp Pro Ile Leu Asp Ile Leu Arg Gln Lys
 130 135 140
 Lys Val Ile Thr Asn Glu Asp Tyr Cys Thr Ile Arg Asn Lys Glu Thr
 145 150 155 160
 Pro Gln Lys Lys Met Arg Glu Leu Leu Thr Gly Pro Ile Thr Cys Ala
 165 170 175
 Gly Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Tyr Asp Ala Leu Arg Glu Ser Asn
 180 185 190
 Lys Phe Leu Met Asp Asp Leu Glu Asp Ala Gln
 195 200

Listado de secuencias

15

<110> SAHILLIOGLU, ALI CAN OZOREN, NESRIN

<120> MÉTODO PARA LA ADMINISTRACIÓN DE ANTÍGENOS

ES 2 725 328 T3

<130> 32178-01

<140> PCT/IB2013/053079

5 <141> 2013-04-18

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1

<211> 195

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

```

Met Gly Arg Ala Arg Asp Ala Ile Leu Asp Ala Leu Glu Asn Leu Thr
 1           5           10           15

Ala Glu Glu Leu Lys Lys Phe Lys Leu Lys Leu Leu Ser Val Pro Leu
           20           25           30

Arg Glu Gly Tyr Gly Arg Ile Pro Arg Gly Ala Leu Leu Ser Met Asp
           35           40           45

Ala Leu Asp Leu Thr Asp Lys Leu Val Ser Phe Tyr Leu Glu Thr Tyr
 50           55           60

Gly Ala Glu Leu Thr Ala Asn Val Leu Arg Asp Met Gly Leu Gln Glu
 65           70           75           80

Met Ala Gly Gln Leu Gln Ala Ala Thr His Gln Gly Ser Gly Ala Ala
           85           90           95

Pro Ala Gly Ile Gln Ala Pro Pro Gln Ser Ala Ala Lys Pro Gly Leu
           100          105          110

His Phe Ile Asp Gln His Arg Ala Ala Leu Ile Ala Arg Val Thr Asn
           115          120          125

Val Glu Trp Leu Leu Asp Ala Leu Tyr Gly Lys Val Leu Thr Asp Glu
           130          135          140

Gln Tyr Gln Ala Val Arg Ala Glu Pro Thr Asn Pro Ser Lys Met Arg
           145          150          155          160
    
```

ES 2 725 328 T3

Lys Leu Phe Ser Phe Thr Pro Ala Trp Asn Trp Thr Cys Lys Asp Leu
165 170 175

Leu Leu Gln Ala Leu Arg Glu Ser Gln Ser Tyr Leu Val Glu Asp Leu
180 185 190

Glu Arg Ser
195

<210> 2

5 <211> 239

<212> PRT

10 <213> Aequorea victoria

<400> 2

ES 2 725 328 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

ES 2 725 328 T3

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

<210> 3

5 <211> 236

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mCherry es una proteína marcadora fluorescente derivada de la proteína DsRed por mutagénesis.

15 <400> 3

ES 2 725 328 T3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe
1 5 10 15

Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe
20 25 30

Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr
35 40 45

Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp
50 55 60

Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His
65 70 75 80

Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe
85 90 95

Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val
100 105 110

Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys
115 120 125

Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys
130 135 140
Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly
145 150 155 160

Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly
165 170 175

His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val
180 185 190

Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser
195 200 205

His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly
210 215 220

Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

<210> 4

<211> 26

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Es un péptido corto clonado a partir del gen de resistencia a la ampicilina del plásmido pcDNA3 con cuatro aminoácidos adicionales N-terminales (YSDL).

15 <400> 4

Tyr Ser Asp Leu Met Ser Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro
 1 5 10 15

Phe Phe Ala Ala Phe Cys Leu Pro Val Phe
 20 25

20 <210> 5

<211> 19

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Es un péptido corto clonado a partir del gen de resistencia a la ampicilina del plásmido pcDNA3 con cuatro aminoácidos adicionales N-terminales (YSDL).

30 <400> 5

Tyr Ser Asp Leu Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala Phe Cys Leu
 1 5 10 15

Pro Val Phe

35 <210> 6

<211> 12

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Es un péptido corto clonado a partir del gen de resistencia a la ampicilina del plásmido pcDNA3 con cuatro aminoácidos adicionales N-terminales (YSDL).

<400> 6

50

Tyr Ser Asp Leu Ala Ala Phe Cys Leu Pro Val Phe
 1 5 10

<210> 7

ES 2 725 328 T3

<211> 8
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> Es un péptido corto clonado a partir del gen de resistencia a la ampicilina del plásmido pcDNA3 con cuatro aminoácidos adicionales N-terminales (YSDL).
<400> 7
15 Tyr Ser Asp Leu Leu Pro Val Phe
1 5
<210> 8
<211> 26
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Es un péptido corto clonado a partir del gen de resistencia a la ampicilina del plásmido pcDNA3 con cuatro aminoácidos adicionales N-terminales (YSDL).
30 <400> 8
Tyr Ser Asp Leu Ala His Pro Glu Thr Leu Val Lys Val Lys Asp Ala
1 5 10 15
Glu Asp Gln Leu Gly Ala Arg Val Gly Tyr
20 25
<210> 9
35 <211> 26
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Es un péptido corto clonado a partir del gen de resistencia a la ampicilina del plásmido pcDNA3 con cuatro aminoácidos adicionales N-terminales (YSDL).
45 <400> 9
Tyr Ser Asp Leu Ile Glu Leu Asp Leu Asn Ser Gly Lys Ile Leu Glu
1 5 10 15
Ser Phe Arg Pro Glu Glu Arg Phe Pro Met
20 25
50 <210> 10

ES 2 725 328 T3

<211> 155

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu
20 25 30

Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg
35 40 45

Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu
50 55 60

Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn
65 70 75 80

Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys
85 90 95

Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr
100 105 110

Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys
115 120 125

Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys
130 135 140

Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
145 150 155

10

<210> 11

<211> 203

15

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 11

20

ES 2 725 328 T3

Met Ala Glu Ser Phe Lys Glu His Leu Gln Glu Ala Phe Glu Asp Leu
1 5 10 15

Gly Ala Asp Asn Leu Arg Lys Phe Lys Ser Lys Leu Gly Asp Arg Arg
20 25 30

Gln Glu Pro Arg Val Thr Lys Ser Ala Ile Glu Lys Leu Lys Asp Glu
35 40 45

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

Val Ser Val Thr Val Glu Ile Leu Arg Ala Ile Lys Cys Ile Ala Val
65 70 75 80

Ala Asp Asp Leu Leu Arg Asn Thr Gly Gln Ser Glu Ser Lys Gly Ala
85 90 95

Pro Ser Asp Glu Ser Lys Cys Ala Ser Ser Lys Ala Val Ser Lys Val
100 105 110

Ala Phe Ser Lys Val Asn Phe Ile Asp Glu His Trp Lys Glu Leu Ile
115 120 125

Asp Arg Val Asn Asn Val Asp Pro Ile Leu Asp Ile Leu Arg Gln Lys
130 135 140

Lys Val Ile Thr Asn Glu Asp Tyr Cys Thr Ile Arg Asn Lys Glu Thr
145 150 155 160

Pro Gln Lys Lys Met Arg Glu Leu Leu Thr Gly Pro Ile Thr Cys Ala
165 170 175

Gly Asn Lys Gly Lys Glu Val Leu Tyr Asp Ala Leu Arg Glu Ser Asn
180 185 190

Lys Phe Leu Met Asp Asp Leu Glu Asp Ala Gln
195 200

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que funciona en el sistema de administración de antígenos y/o moléculas bioactivas a células presentadoras de antígenos, que comprende
- al menos un portador de proteína tipo mancha ASC formado por proteínas ASC que se unen entre sí; y caracterizado por
 - al menos un péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, transportada por el portador de la proteína tipo mancha ASC y transportada por el portador de la proteína tipo mancha ASC formando interacciones hidrófobas con las proteínas ASC que forman el portador de la proteína tipo mancha ASC,
 - el portador de la proteína tipo mancha ASC que libera el péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, en un ambiente ácido y que es biodegradable por hidrólisis o enzimas.
- 10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque el antígeno es al menos un miembro del grupo que consiste en péptidos, proteínas y péptidos que simulan carbohidratos o una mezcla de al menos dos miembros de estos grupos que pueden estimular la producción de anticuerpos al entrar en el cuerpo.
- 15 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la molécula bioactiva es al menos un miembro del grupo que consiste en fármacos, enzimas, factores de crecimiento, hormonas, receptores, ligandos de receptores, adyuvantes y anticuerpos o una mezcla de al menos dos miembros de estos grupos.
- 20 4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el portador de la proteína tipo mancha ASC que lleva al menos un tipo de antígeno y/o al menos un tipo de molécula bioactiva.
- 25 5. Una composición que comprende la composición formada por interacciones hidrófobas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y una composición formada por una composición fusionada caracterizada por un antígeno y/o la molécula bioactiva como una proteína de fusión con al menos una proteína ASC que forma el portador de proteína tipo mancha ASC y es transportado por el portador de la proteína tipo mancha ASC como la proteína de fusión.
- 30 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada por el antígeno y/o la molécula bioactiva como una proteína de fusión con la proteína ASC y que se fusiona con la proteína ASC en el término N, el término C o dentro de la proteína ASC.
- 35 7. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6, caracterizada porque el antígeno y/o la molécula bioactiva se transportan dentro del portador de la proteína tipo mancha ASC.
- 40 8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por el antígeno y/o la molécula bioactiva que comprende al menos un tipo de péptido/proteína que tiene al menos 13 aminoácidos de longitud.
- 45 9. Una composición según la reivindicación 8, caracterizada por el antígeno y/o la molécula bioactiva que comprende al menos un tipo de péptido/proteína que es hidrófobo.
- 50 10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque el antígeno y/o la molécula bioactiva son transportados recubriendo la cubierta exterior del portador de la proteína tipo mancha ASC.
- 55 11. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el antígeno y/o la molécula bioactiva que comprende al menos un tipo de péptido/proteína.
- 60 12. Un método para producir la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por las etapas de:
- formar al menos un portador de la proteína tipo mancha ASC por las proteínas ASC que se unen;
 - cargar al menos un péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, en el portador de la proteína tipo mancha ASC;
- 65 y
- sintetizar la composición en cultivo celular mediante la estimulación de células con estímulos proinflamatorios,
 - obtener la composición que comprende el portador de la proteína tipo mancha ASC y al menos un péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, cargado en el portador de la proteína tipo mancha ASC.

- 5 13. Un método de producción de acuerdo con la reivindicación 12 que hace referencia a la reivindicación 5 a 7, caracterizado porque el péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, se carga en las proteínas ASC que forman el portador de las proteínas tipo mancha ASC como proteína de fusión, en la etapa de cargar al menos un péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, en el portador de la proteína tipo mancha ASC para formar una composición formada por composición fusionada y composición a través de interacciones hidrófobas.
- 10 14. Un método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, caracterizado porque la composición que comprende el portador de la proteína tipo mancha ASC y al menos un péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, se sintetiza en un cultivo celular y se purifica a partir de cultivo celular, en la etapa de obtención de la composición.
- 15 15. Un método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 en referencia a la reivindicación 5 a 7 y la reivindicación 13, caracterizado porque la composición se sintetiza usando proteínas de fusión purificadas que comprenden la proteína ASC que forma el portador de la proteína tipo mancha ASC y el péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, en la etapa de obtención de la composición.
- 20 16. Un método de producción de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque la composición se sintetiza in vitro incubando las proteínas de fusión que comprenden la proteína ASC que forma el portador de la proteína tipo mancha ASC y el péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, en una solución hipotónica a 37°C, en la etapa de obtención de la composición.
- 25 17. Un método de producción para una composición de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque el péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, se carga en el portador de la proteína tipo mancha ASC a través de interacciones hidrófobas con el portador de la proteína tipo mancha ASC, en la etapa de cargar al menos un péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, en el portador de la proteína tipo mancha ASC.
- 30 18. Un método de producción para una composición de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque la secuencia péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, cargada en el portador de la proteína tipo mancha ASC a través de interacciones hidrófobas, comprende al menos un tipo de péptido/proteína que tiene al menos 13 aminoácidos de longitud y es hidrófobo, en la etapa de cargar al menos un péptido/proteína, estando el antígeno y/o la molécula bioactiva, en el portador de la proteína tipo mancha ASC.
- 35 19. Un método de producción para una composición de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque la composición, que comprende el portador de la proteína tipo mancha ASC y al menos un péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, cargado en el portador de la proteína tipo mancha ASC por interacciones hidrófobas se sintetiza en cultivos celulares y se purifica a partir de cultivos celulares, en la etapa de obtención de la composición.
- 40 20. Un método de producción para una composición de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado porque la composición se sintetiza usando proteínas ASC purificadas que forman el portador de la proteína tipo mancha ASC y el péptido/proteína purificado, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, en la etapa de obtención de la composición.
- 45 21. Un método de producción para una composición según la reivindicación 20, caracterizado porque la composición se sintetiza in vitro mezclando las proteínas ASC que forman el portador de la proteína tipo mancha ASC y el péptido/proteína, que es el antígeno y/o la molécula bioactiva, en una solución hipotónica a 37°C de incubación, en la etapa de obtención de la composición.

Figura 1

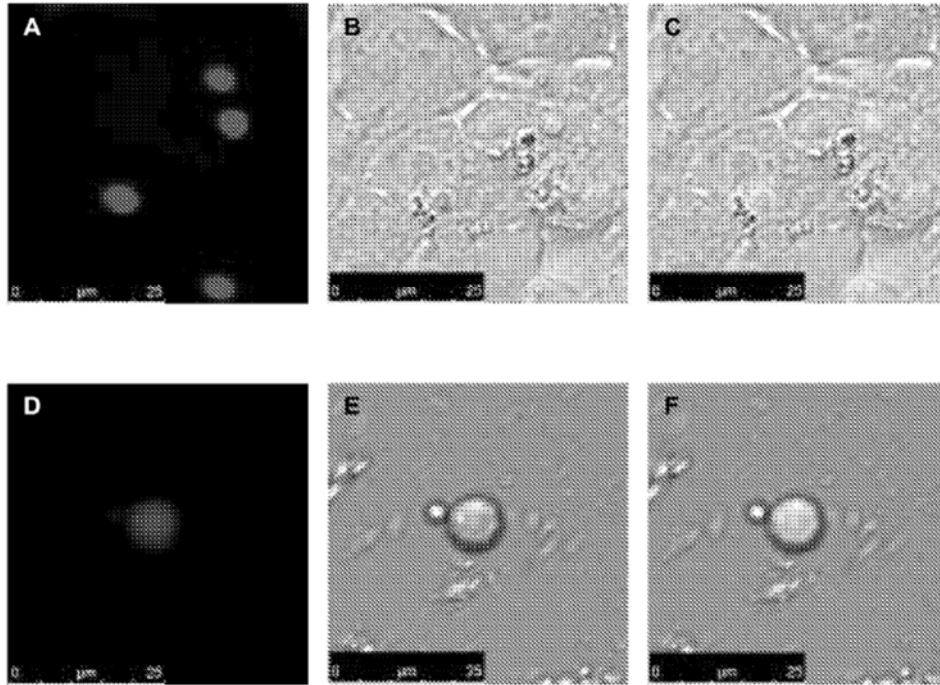


Figura 2

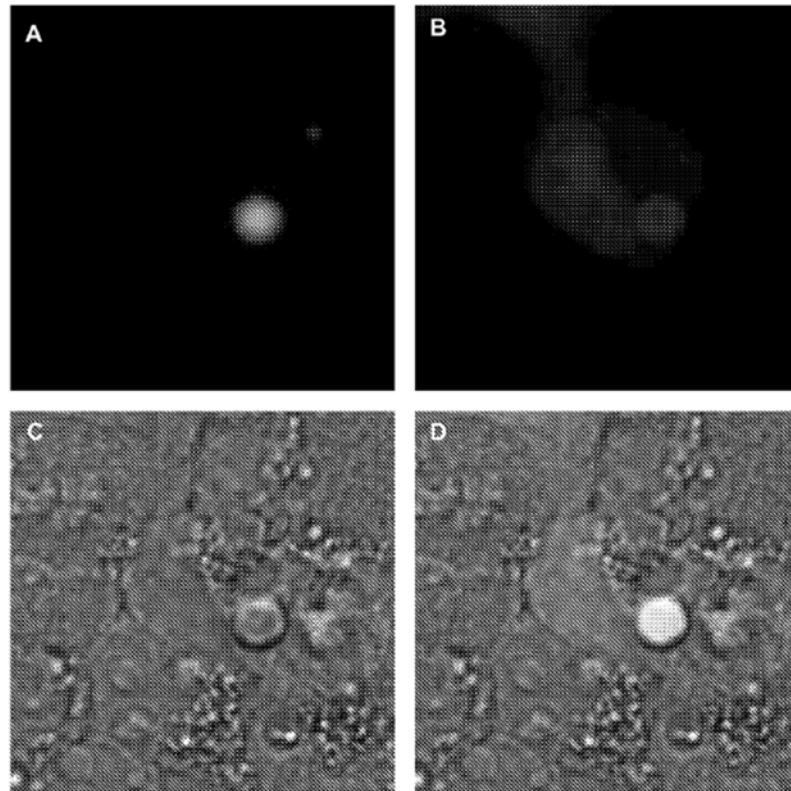


Figura 3

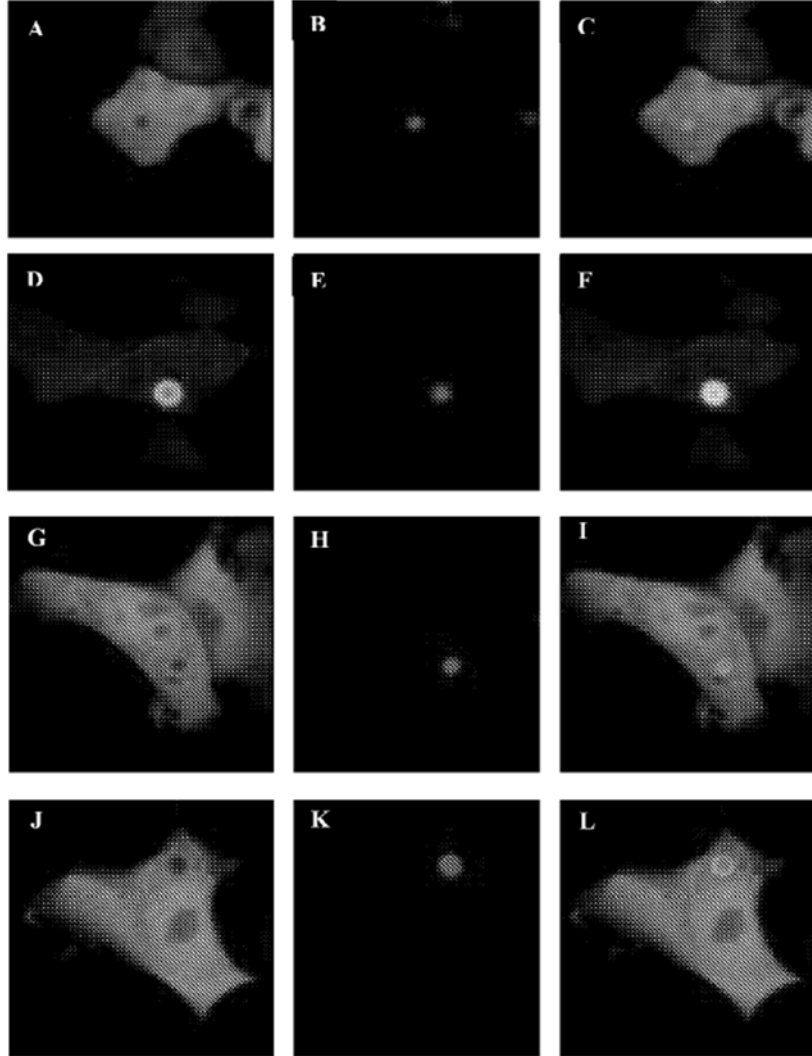


Figura 4

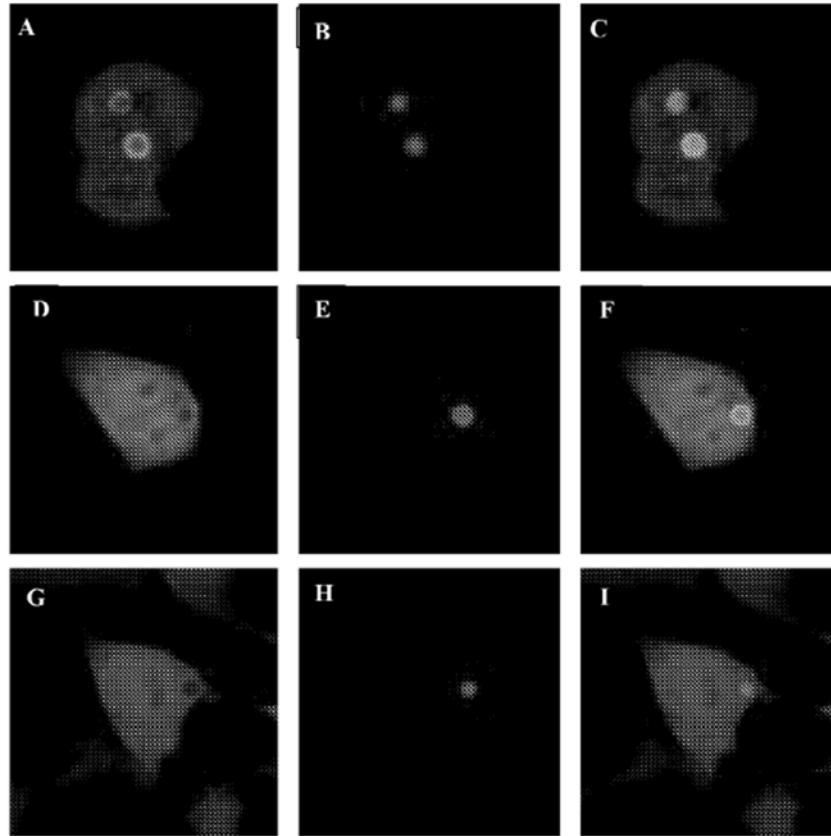


Figura 5

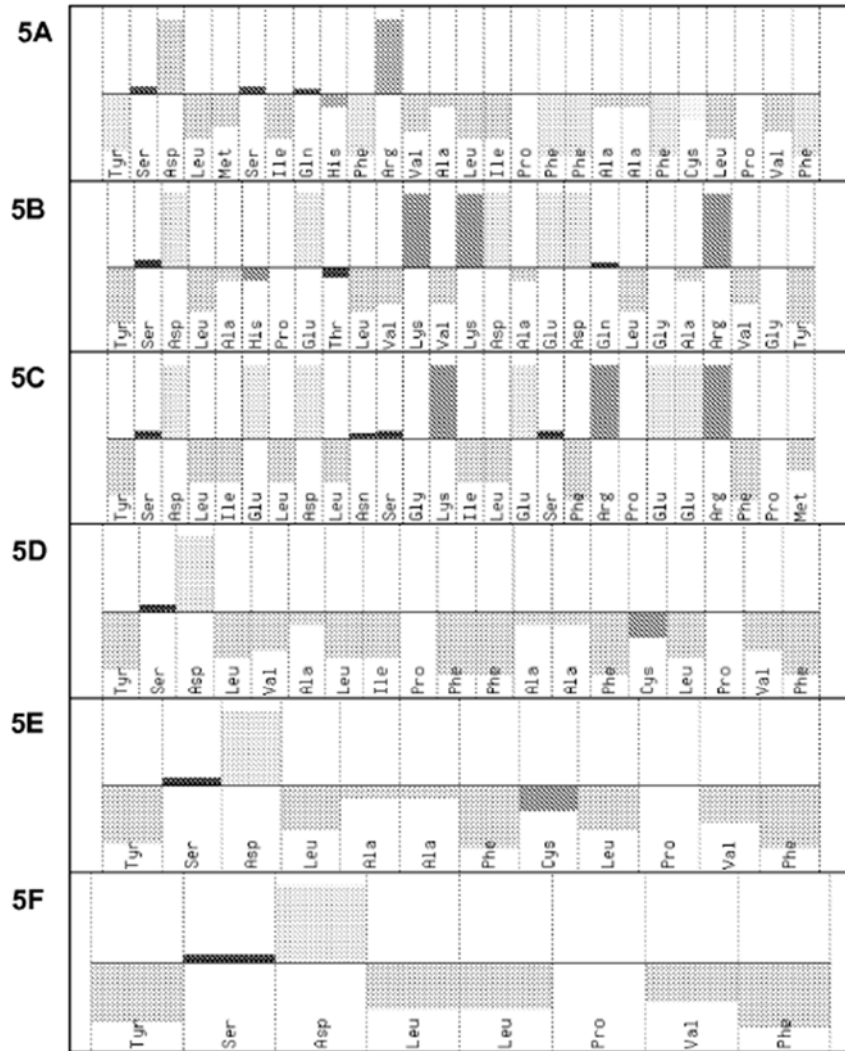


Figura 6

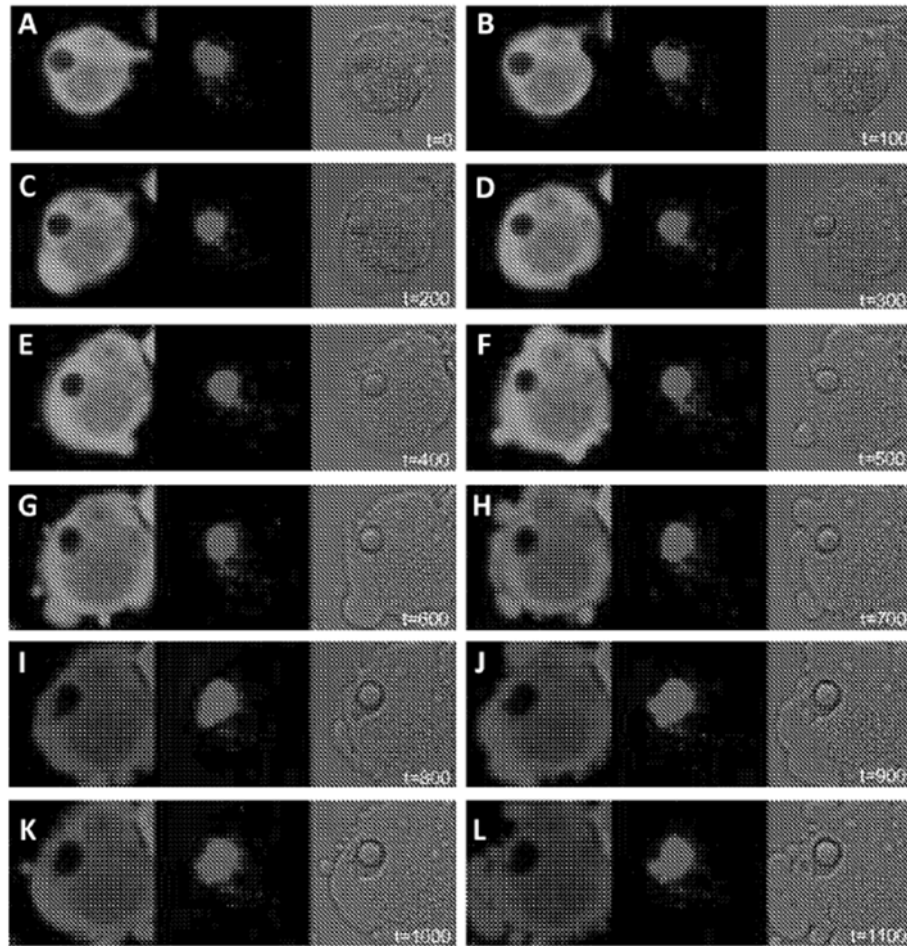


Figura 7

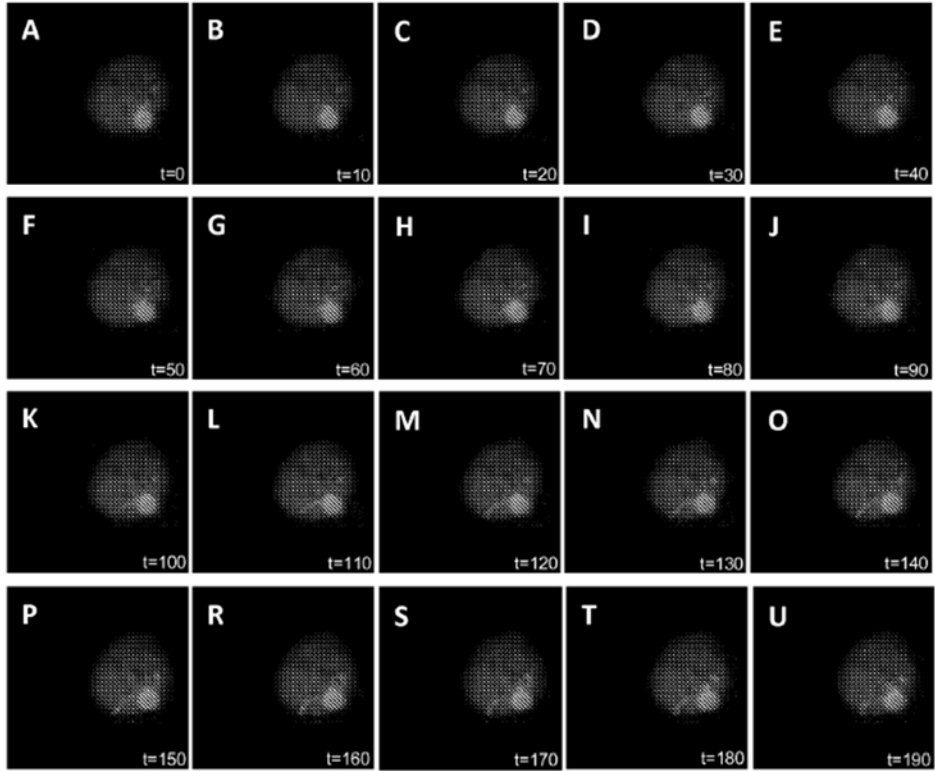


Figura 8

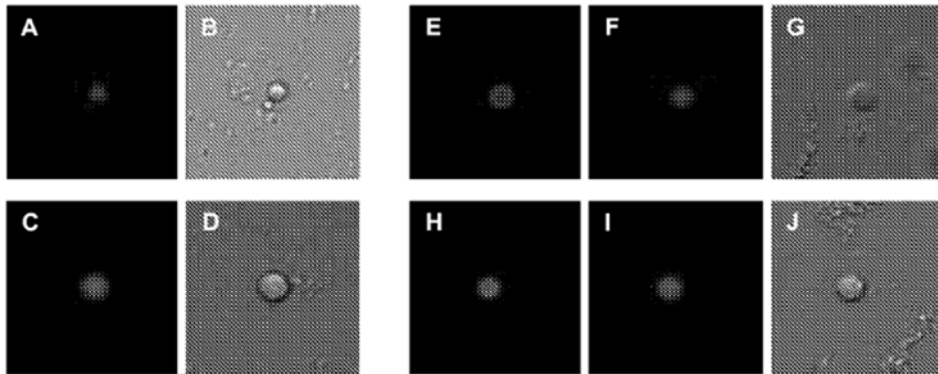


Figura 9

