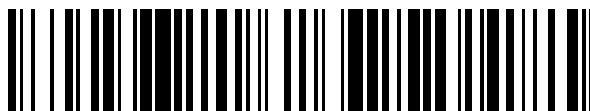


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 864 764**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00	(2006.01)
A61K 39/02	(2006.01)
A61P 37/02	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)
A61K 39/39	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2012 PCT/US2012/037412**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12155007**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2012 E 12781636 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.03.2021 EP 2706991**

54 Título: **Composición inmunogénica que presenta múltiples antígenos, y métodos y usos de la misma**

30 Prioridad:

11.05.2011 US 201161484934 P
08.03.2012 US 201261608168 P
13.03.2012 US 201261609974 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.10.2021

73 Titular/es:

CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION
(100.0%)
55 Shattuck Street
Boston, MA 02115, US

72 Inventor/es:

MALLEY, RICHARD;
LU, YINGJIE y
ZHANG, FAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 864 764 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

Composición inmunogénica que presenta múltiples antígenos, y métodos y usos de la misma

5 Apoyo gubernamental

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de las subvenciones número AI067737-01 y AI51526-01, otorgadas por los National Institutes of Health. El gobierno de los Estados Unidos posee determinados derechos sobre la invención.

10

Campo

La presente invención se refiere a la genética molecular, inmunología y microbiología. La presente solicitud se refiere en general a composiciones y métodos para la preparación de composiciones inmunogénicas. Más específicamente, la presente invención proporciona un macrocomplejo inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 1. Este complejo puede usarse como una composición inmunogénica, tal como una vacuna, para conferir una respuesta inmunitaria humoral y celular sinérgica; y en algunas divulgaciones, provoca una protección sinérgica mediada por anticuerpos y células contra patógenos, por ejemplo, infección letal y el transporte mucoso de tales patógenos.

15

20 Antecedentes

Las vacunas brindan prevención y tratamiento para una variedad de enfermedades, que incluyen infecciones por microorganismos, infecciones virales y cánceres. Las vacunas actuales basadas en polisacáridos, sin embargo, no siempre son eficaces en las poblaciones más vulnerables. Por ejemplo, Las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) y *Salmonella typhi* son dos enfermedades importantes en los niños en los países en desarrollo. Para la fiebre tifoidea, las vacunas de polisacárido Vi autorizadas son ineficaces en niños menores de dos años. No obstante, el éxito de las vacunas a base de polisacáridos y la inmunización pasiva para la prevención de la colonización o enfermedad ha demostrado la importancia de los anticuerpos capsulares, en particular en el control de enfermedades causadas por *S. pneumoniae*. Asimismo, los estudios tanto en animales como en humanos demuestran que los anticuerpos provocados por la vacunación neumocócica pueden proteger contra la colonización neumocócica nasofaríngea (NP), que precede a la enfermedad neumocócica.

25

30

Una limitación de las actuales vacunas antineumocócicas de polisacáridos es que la protección por el anticuerpo anticapsular está limitada por su especificidad de serotipo. Por ejemplo, aunque la vacuna antineumocócica conjugada 7-valente (PCV7) ha reducido significativamente la incidencia de enfermedad neumocócica invasiva debido a cepas de tipo vacunal (VT), estudios recientes han demostrado que los serotipos no VT están reemplazando gradualmente a las poblaciones neumocócicas VT, potencialmente limitando la utilidad de la vacuna. Esto ha llevado a la evaluación de si la colonización neumocócica se puede prevenir mediante la inmunización con antígenos conservados. En particular, se han evaluado varias proteínas neumocócicas como candidatas a vacuna en modelos animales de colonización neumocócica. Se ha demostrado que la inmunización de la mucosa con algunas de estas proteínas provoca anticuerpos sistémicos y mucosos y confiere protección contra la enfermedad neumocócica y la colonización. Sigue existiendo la necesidad de una composición inmunogénica que incluya tanto polisacáridos neumocócicos como proteínas, capaces de generar respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales robustas a todos los serotipos neumocócicos.

35

40

45

Adicionalmente, la respuesta inmunitaria innata proporciona una defensa rápida y generalmente eficaz contra patógenos microbianos. Esta respuesta implica el reconocimiento celular de moléculas asociadas a patógenos, la activación de la producción y liberación de mediadores inflamatorios, el reclutamiento de leucocitos y la activación de efectores antimicrobianos. Los receptores tipo Toll (TLR), de los cuales al menos once se han descrito para mamíferos, son capaces de discriminar entre una amplia variedad de moléculas asociadas a patógenos y provocar respuestas protectoras. Por ejemplo, TLR4 reconoce muchos productos microbianos, incluidos los de bacterias gramnegativas, la proteína F del virus sincitial respiratorio y las citolisinas dependientes del colesterol (CDC) de bacterias grampositivas. Adicionalmente, TLR2 reconoce una gran cantidad de compuestos sintéticos y microbianos. Por lo tanto, la inclusión de tales agonistas de TLR puede potenciar la respuesta inmunitaria a las vacunas. Sigue existiendo la necesidad de mejorar la eficacia de las vacunas provocando una respuesta inmunitaria innata (mediada por TLR u otra) contra infecciones tales como la colonización y enfermedad neumocócica.

50

55

Sumario

La presente divulgación proporciona un sistema de presentación de múltiples antígenos inmunogénicos (MAPS), útil para la producción de composiciones inmunogénicas, tales como las útiles en vacunas. En particular, la presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden un complejo inmunogénico que comprende al menos un tipo de polímero, por ejemplo, un polisacárido, que puede, opcionalmente, ser antigénico; al menos una proteína o péptido antigénico; y al menos un par de moléculas de afinidad-complementaria que comprende (i) una primera molécula de afinidad que se asocia con el polímero, y (ii) una molécula de afinidad complementaria que se asocia con la proteína o péptido; de manera que las moléculas de afinidad primera y complementaria sirven como enlace indirecto entre el

60

65

polímero y la proteína o péptido antigénico. Por consiguiente, el polímero puede unir al menos 1, o al menos 2, o una pluralidad de antígenos proteicos o peptídicos iguales o diferentes. En algunas divulgaciones, el polímero es antigénico, por ejemplo, el polímero es un polisacárido capsular neumocócico. En algunas divulgaciones, los antígenos proteicos o peptídicos son antígenos proteicos o peptídicos recombinantes.

5 Las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento pueden provocar respuestas tanto humorales como celulares a uno o varios antígenos al mismo tiempo. Las composiciones inmunogénicas proporcionan una respuesta de memoria de larga duración, protegiendo potencialmente a un sujeto de futuras infecciones. Esto permite una composición inmunogénica única que genera un título alto de anticuerpos anti-polisacárido funcional y es similar o se compara favorablemente con el nivel de anticuerpos inducido por la vacuna conjugada convencional. Además, no hay restricción para la proteína transportadora específica, y se pueden usar varias proteínas antigénicas en la construcción MAPS para generar una respuesta de anticuerpos anti-polisacáridos robusta. Adicionalmente, la fuerte respuesta de anticuerpos y las respuestas Th17/Th1 son específicas de múltiples antígenos proteicos presentados a través de la composición MAPS. Esto representa una gran ventaja, ya que es un medio para provocar dos formas de inmunidad con una construcción. Además de una respuesta inmunitaria más convencional a un polisacárido antigénico conjugado con una proteína vehículo, la presente divulgación proporciona una respuesta de linfocitos T y, más específicamente, respuestas Th17 y Th1 a proteínas inyectadas sistémicamente. Además, la presente composición inmunogénica puede incorporar ligandos al esqueleto de polímero. Esto proporciona un potencial para mejorar las respuestas específicas de linfocitos B o linfocitos T modificando la relación proteína/polímero, el tamaño del complejo o incorporando un factor coestimulador específico, tales como ligandos de TLR2/4, etc., en la composición.

En comparación con la tecnología de conjugación típica, que implica un tratamiento riguroso de las proteínas, los presentes métodos evitan el riesgo de desnaturalización de otras modificaciones del antígeno peptídico. Esto proporciona una ventaja sustancial de preservar la antigenicidad de las proteínas incluidas y aumenta la probabilidad de que la propia proteína sirva como antígeno (en lugar de simplemente como vehículo). De manera similar, los presentes métodos evitan modificaciones/daños innecesarios del esqueleto de polisacárido, dado que no hay reticulación química pesada: la biotilación se puede controlar con precisión para conseguir la reacción con grupos funcionales específicos del polisacárido y el nivel de biotilación se puede ajustar fácilmente. Esto es ventajoso para evitar el proceso típico de conjugación, que produce daño en las cadenas laterales o epítomos críticos, lo que puede causar una inmunogenicidad y protección reducidas.

El presente ensamblaje basado en la afinidad proporciona una preparación fácil y muy flexible de la composición inmunogénica. Es muy específico y estable; puede permanecer en frío durante meses y conservar su potencia. El proceso de ensamblaje es lo suficientemente simple como para garantizar una alta reproducibilidad; solo se requieren unas pocas etapas, lo que reduce el riesgo de variación de un lote a otro, lo cual constituye una gran ventaja industrial. El ensamblaje MAPS es muy eficaz (más del 95 %), incluso a bajas concentraciones de proteína y polisacárido (tal como 0,1 mg/ml); esto es una gran ventaja, ya que las ineficiencias en la fabricación de conjugados (normalmente las eficiencias están en el intervalo <50%) representan un obstáculo importante y la razón del alto costo de las vacunas. Para la formulación: es fácil ajustar la composición y propiedades físicas del producto final. La relación proteína:polímero en el complejo es ajustable; con biotilación moderada del polímero, la relación proteína:polímero puede ser 10:1 (p/p) o más; a la inversa, la relación puede ser 1:10 o menos si tal es el interés basado en objetivos inmunológicos. Adicionalmente, el tamaño de la composición de MAPS inmunogénica se puede ajustar mediante la elección del tamaño del polímero. Los métodos para la elaboración de MAPS facilitan la combinación de proteínas y polímeros con pocas modificaciones. La posible multivalencia del producto final mediante la carga de múltiples antígenos proteicos, del mismo o de diferentes patógenos (por ejemplo, neumococo y tuberculosis), en una única construcción inmunogénica, proporciona una composición que puede usarse para disminuir el número de vacunas necesarias para inmunizar a un sujeto contra más de una enfermedad. Además, la composición de MAPS es muy estable; se disocia solo por ebullición y mantiene la inmunogenicidad incluso después de muchos meses a 4 °C. La inmunogenicidad del complejo MAPS puede estar limitada por la estabilidad de la proteína antigénica o el componente peptídico, estabilidad que puede extenderse mediante la inclusión en el complejo MAPS. Los antígenos específicos usados en el presente documento exhibieron estabilidad a temperatura ambiente y después de al menos un ciclo de congelación-descongelación. Esto proporciona una ventaja importante sobre las vacunas actuales que se ven comprometidas si no se mantiene rigurosamente la "cadena de frío".

Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición inmunogénica que comprende un polímero, al menos un antígeno proteico o peptídico y al menos un par de moléculas de afinidad- complementaria, donde el par de moléculas de afinidad-complementaria comprende una primera molécula de afinidad que se asocia con el polímero y una molécula de afinidad complementaria que se asocia con el antígeno proteico o peptídico, de modo que cuando la primera molécula de afinidad se asocia con la molécula de afinidad complementaria, une indirectamente el antígeno al polímero.

En algunas divulgaciones, la primera molécula de afinidad se reticula con el polímero con un reactivo de reticulación, por ejemplo, un reactivo de reticulación seleccionado de CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio), EDC (clorhidrato de (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida), cianoborohidruro sódico; bromuro de cianógeno; o bicarbonato de amonio/ácido yodoacético. En algunas divulgaciones, la primera molécula de afinidad está reticulada

con grupos funcionales carboxilo, hidroxilo, amino, fenoxilo, hemiacetal y mecarpto del polímero. En algunas divulgaciones, la primera molécula de afinidad está unida covalentemente al polímero.

5 En algunas divulgaciones, la primera molécula de afinidad es biotina o un derivado de la misma, o una molécula con estructura o propiedad física similar a la biotina, por ejemplo, una amina-PEG3-biotina ((+)- biotilación-3-6,9-triaundecanodiamina) o derivado de la misma.

10 En algunas divulgaciones, el antígeno proteico o peptídico de la composición inmunogénica es una proteína de fusión que comprende la proteína o péptido antigénico fusionado con la molécula de unión de afinidad complementaria. La fusión puede ser una construcción genética, es decir, un péptido o proteína de fusión recombinante. En algunas divulgaciones, un antígeno puede unirse covalentemente como una proteína de fusión a la molécula de afinidad complementaria. En divulgaciones alternativas, el antígeno está unido de forma no covalente a la molécula de afinidad complementaria.

15 En algunas divulgaciones, la molécula de afinidad complementaria es una proteína de unión a biotina o un derivado o una parte funcional de la misma. En algunas divulgaciones, la molécula de afinidad complementaria es una proteína similar a avidina o una parte funcional de la misma, por ejemplo, pero no se limitan a, rizavidina o un derivado de la misma. En algunas divulgaciones, una molécula de afinidad complementaria es avidina o estreptavidina o un derivado o una parte funcional de las mismas.

20 En algunas divulgaciones, un péptido de señal de secreción se localiza en el extremo N-terminal de la proteína similar a la avidina. Se puede usar cualquier secuencia de señal conocida por un experto habitual en la materia; y en algunas divulgaciones, la secuencia de señal es MKKIWLALAGLVLAFSASA (SEQ ID NO:1) o un derivado o una parte funcional de la misma. En algunas divulgaciones, el antígeno puede fusionarse con una molécula de afinidad complementaria mediante un péptido enlazador flexible, donde el péptido enlazador flexible une el antígeno a la molécula de afinidad complementaria.

30 En algunas divulgaciones, el componente polimérico del inmunógeno comprende un polímero derivado de un organismo vivo, por ejemplo, un polisacárido. En algunas divulgaciones, un polímero puede purificarse y aislarse de una fuente natural, o puede sintetizarse como con una composición/estructura natural, o puede ser un polímero sintético (por ejemplo, con una composición/estructura artificial). En algunas divulgaciones, un polímero se obtiene de un organismo seleccionado del grupo que consiste en: bacterias, arqueas o células eucariotas como hongos, insectos, plantas o quimeras de los mismos. En algunas divulgaciones, el polímero es un polisacárido obtenido de una bacteria patógena. En divulgaciones específicas, el polisacárido es un polisacárido capsular neumocócico, un polisacárido de la pared celular neumocócica o un polisacárido Vi de *Salmonella typhi*.

40 En algunas divulgaciones, un polímero de la composición inmunogénica como se divulga en el presente documento es un polímero de cadena ramificada, por ejemplo, un polisacárido ramificado, o como alternativa, puede ser un polímero de cadena lineal, por ejemplo, un polímero de cadena sencilla, por ejemplo, polisacárido. En algunas divulgaciones, el polímero es un polisacárido, por ejemplo, dextrano o un derivado del mismo. En algunas divulgaciones, un polímero, por ejemplo, el polisacárido dextrano puede tener un peso molecular promedio de 425 kD-500 kDa, inclusive, o en algunas divulgaciones, mayor de 500kDa. En algunas divulgaciones, un polímero, por ejemplo, el polisacárido dextrano, puede tener un peso molecular promedio de 60 kD-90 kDa, inclusive, o en algunas divulgaciones, menor 70 kDa. El polímero de dextrano se puede obtener de una bacteria, tal como *Leuconostoc mesenteroides*.

50 En algunas divulgaciones, una composición inmunogénica como se divulga en el presente documento comprende al menos 2 antígenos, o al menos 3 antígenos, o al menos 5 antígenos, o entre 2-10 antígenos, o entre 10-15 antígenos, o entre 15-20 antígenos, o entre 20-50 antígenos, o entre 50-100 antígenos, o más de 100 antígenos, inclusive. En algunas divulgaciones, cuando una composición inmunogénica como se divulga en el presente documento comprende al menos 2 antígenos, los antígenos pueden ser el mismo antígeno o al menos 2 antígenos diferentes. En algunas divulgaciones, los antígenos pueden ser del mismo patógeno o de diferentes patógenos, o pueden ser diferentes epítomos o partes de la misma proteína antigénica, o pueden ser el mismo antígeno que es específico para diferentes serotipos o variaciones estacionales del mismo patógeno (por ejemplo, el virus de la gripe A, B, y C).

55 En algunas divulgaciones, una composición inmunogénica como se divulga en el presente documento comprende un antígeno de un organismo patógeno o un tejido anormal. En algunas divulgaciones, el antígeno es un antígeno tumoral. En algunas divulgaciones, un antígeno puede ser al menos un antígeno seleccionado de antígenos de patógenos o parásitos, tales como antígenos de *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* o *M. tetanus*, *Bacillus anthracis*, VIH, antígenos de la gripe estacional o epidémica (tales como H1N1 o H5N1), *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitides* o *N. gonorrhoeae*, VPH, *Chlamydia trachomatis*, VHS u otros herpesvirus, o *Plasmodia* sp. Estos antígenos pueden incluir péptidos, proteínas, glucoproteínas, o polisacáridos. En algunas divulgaciones, el antígeno es un toxoide o parte de una toxina.

65 En algunas divulgaciones, una composición inmunogénica como se divulga en el presente documento comprende un polisacárido antigénico, por ejemplo, tal como el antígeno Vi (polisacárido capsular de *Salmonella typhi*), polisacáridos

capsulares neumocócicos, polisacáridos de la pared celular neumocócica, el polisacárido capsular Hib (*Haemophilus influenzae* tipo B), los polisacáridos capsulares meningocócicos, el polisacárido de *Bacillus anthracis* (el agente causante del ántrax) y otros polisacáridos capsulares o de la pared celular de bacterias, o cualquier combinación de los mismos. El polisacárido puede tener un componente proteico, por ejemplo, una glucoproteína, tal como las de los virus.

En algunas divulgaciones, una composición inmunogénica como se divulga en el presente documento comprende además al menos un factor de coestimulación asociado con el polímero o polisacárido, donde el factor de coestimulación puede asociarse directa o indirectamente. Por ejemplo, en alguna divulgación, un factor de coestimulación puede unirse covalentemente al polímero. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, un factor de coestimulación puede unirse covalentemente a la primera molécula de afinidad, que a continuación se reticula con el polímero. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, un factor de coestimulación puede unirse a una molécula de afinidad complementaria, que se asocia con una primera molécula de afinidad para unir el factor de coestimulación al polímero. En algunas divulgaciones, un factor de coestimulación es un adyuvante. En divulgaciones alternativas, un factor coestimulador puede ser cualquiera conocido por un experto en la materia, por ejemplo, sin limitación, agonistas del receptor tipo Toll (agonistas de TLR2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, etc.), agonistas de NOD o agonistas del inflamasoma.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere al uso de la composición inmunogénica como se divulga en el presente documento para ser administrada a un sujeto para provocar una respuesta inmunitaria en el sujeto. En algunas divulgaciones, la respuesta inmunitaria es una respuesta de anticuerpos/linfocitos B, una respuesta de linfocitos T CD4⁺ (que incluye linfocitos Th1, Th2 y Th17) y/o una respuesta de linfocitos T CD8⁺. En algunas divulgaciones, se administra al menos un adyuvante junto con la composición inmunogénica.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto a al menos un antígeno, que comprende administrar al sujeto la composición inmunogénica como se divulga en el presente documento.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de vacunación de un animal, por ejemplo, un ave, un mamífero o un ser humano, contra al menos un antígeno que comprende administrar una composición de vacuna que comprende la composición inmunogénica como se divulga en el presente documento.

En todos los aspectos como se divulgan en el presente documento, un animal o un sujeto puede ser un ser humano. En algunas divulgaciones, el sujeto puede ser un animal agrícola o no doméstico, o un animal doméstico. En algunas divulgaciones, una composición de vacuna que comprende la composición inmunogénica como se divulga en el presente documento puede administrarse mediante inyección subcutánea, intranasal, oral, sublingual, vaginal, rectal, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o mediante un parche cutáneo para inmunización transcutánea.

En todos los aspectos como se divulgan en el presente documento, una respuesta inmunitaria es una respuesta de anticuerpos/linfocitos B, una respuesta de linfocitos T CD4⁺ (que incluye respuestas de linfocitos Th1, Th2 y Th17) o una respuesta de linfocitos T CD8⁺ contra antígeno(s) proteico/peptídico. En algunas divulgaciones, una respuesta inmunitaria es una respuesta de anticuerpos/linfocitos B contra el polímero, por ejemplo, un polisacárido neumocócico. En algunas divulgaciones, se administra al menos un adyuvante junto con la composición inmunogénica.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere al uso de la composición inmunogénica como se divulga en el presente documento para su uso en un diagnóstico de exposición a un patógeno o agente inmunogénico.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a kits para preparar una composición inmunogénica como se divulga en el presente documento. Por ejemplo, dichos kits pueden comprender uno cualquiera o más de los siguientes materiales: un recipiente que comprende un polímero, por ejemplo, un polisacárido, reticulado con una pluralidad de primeras moléculas de afinidad; y un recipiente que comprende una molécula de afinidad complementaria que se asocia con la primera molécula de afinidad, en el que la molécula de afinidad complementaria se asocia con un antígeno.

En otra divulgación, el kit puede comprender un recipiente que comprende un polímero, por ejemplo, un polisacárido; un recipiente que comprende una pluralidad de primeras moléculas de afinidad; y un recipiente que comprende una molécula de reticulación para reticular las primeras moléculas de afinidad con el polímero. En algunas divulgaciones, el kit puede comprender al menos un factor de coestimulación que se puede añadir al polímero. En algunas divulgaciones, el kit comprende un reactivo de reticulación, por ejemplo, pero sin limitación, CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio), EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida), cianoborohidruro sódico; bromuro de cianógeno; bicarbonato de amonio/ácido yodoacético para unir el cofactor al polímero o polisacárido. En algunas divulgaciones, el kit comprende además un medio para unir la molécula de afinidad complementaria al antígeno proteico o peptídico, donde el medio puede ser un reactivo de reticulación o alguna proteína de fusión intermedia.

En algunas divulgaciones, el kit puede comprender un recipiente que comprende un vector de expresión para la expresión de una proteína de fusión de antígeno proteico o peptídico-molécula de afinidad, por ejemplo, un vector de

expresión para la expresión del antígeno proteico o peptídico como una proteína de fusión con la molécula de afinidad complementaria. En algunas divulgaciones, el vector puede comprender opcionalmente una secuencia de un péptido enlazador, en el que el vector de expresión puede expresar una proteína de fusión de antígeno-molécula de afinidad complementaria que comprende un péptido enlazador localizado entre el antígeno y la molécula de afinidad.

5 En algunas divulgaciones, el kit puede comprender opcionalmente un recipiente que comprende una molécula de afinidad complementaria que se asocia con la primera molécula de afinidad, en el que la molécula de afinidad complementaria se asocia con un antígeno de péptido/proteína. En algunas divulgaciones, el kit puede comprender adicionalmente un medio para unir la molécula de afinidad complementaria al antígeno, por ejemplo, usando un
10 reactivo de reticulación como se divulga en el presente documento u otra proteína intermedia, tal como un anticuerpo divalente o un fragmento de anticuerpo.

También se proporciona en el presente documento un método para vacunar a un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano con las composiciones inmunogénicas tal como se divulgan en el presente documento, comprendiendo el método administrar una composición de vacuna como se divulga en el presente al sujeto.
15

Descripción de los dibujos

20 La Figura 1 es un diagrama esquemático del sistema de presentación de antígenos múltiples (MAPS). El MAPS representa una plataforma novedosa de una composición inmunogénica compleja, que se produce uniendo varios antígenos proteicos a un polisacárido o antígeno de polisacárido mediante una interacción estable de un par de afinidad, tal como un par avidina-biotina. En una divulgación del complejo MAPS, los antígenos proteicos de uno o diferentes patógenos se fusionan de forma recombinante con una proteína similar a la avidina y se expresan en *E. coli*. El esqueleto de polisacárido, que puede elegirse entre una variedad de patógenos, se biotinila y/o reticula
25 con o sin factores de coestimulación utilizando tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) o clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) como reactivo activador. Un complejo MAPS puede ensamblarse fácilmente simplemente mezclando e incubando los antígenos de fusión purificados, uno o múltiples, en la proporción deseada, con polisacárido biotinilado. El complejo MAPS ensamblado se puede purificar/separar según el tamaño mediante cromatografía de filtración en gel.

30 La Figura 2 muestra ejemplos de biotinylación de polisacárido: las estructuras del derivado de biotina, amina-PEG3-biotina (también conocida como (+)- biotinylación-3-6,9-triaundecanodiamina); la estructura de CDAP; y la estructura de EDC. La Figura también muestra un esquema para el método de biotinylación de polisacáridos usando CDAP como reactivo activador, proceso (1) o usando EDC como reactivo activador, proceso (2). Otros procedimientos para la biotinylación están abarcados en los métodos de la divulgación.

35 Las Figuras 3A-3C muestran una divulgación de una rizavidina recombinante y una proteína de fusión rizavidina-antígeno. La Figura 3A muestra un esquema de la construcción de rizavidina modificada (superior) y proteína de fusión rizavidina-antígeno (inferior). Todas las construcciones se clonaron en el vector PET21b y se transformaron en *E. coli* cepa BL21 (DE3) para la expresión. La Figura 3B muestra la SDS-PAGE de la rizavidina recombinante purificada (rRhavi). La Figura 3C muestra la SDS-PAGE de proteínas de fusión de rhavi-antígeno purificadas. Carril 1, rhavi-Pdt; carril 2, rhavi-PsaA; carril 3, rhavi-sp1733; carril 4, rhavi-sp1534; carril 5, rhavi-sp0435; carril 6, rhavi-sp1458; carril 7, rhavi-ESAT-6/Cfp10; carril 8, rhavi-TB9.8/TB10.4; carril 9, rhavi-MPT64; carril 10, rhavi-MPT83.

40 Las Figuras 4A-4C muestran el perfil de elución de un MAPS de ejemplo ensamblado. En La Figura 4A el MAPS se ensabló incubando 0,5 mg de rRhavi purificada con 1 mg de dextrano 90 biotinilado (BD90, PM promedio 60-90 KD) a 4 °C durante la noche y aplicando a continuación a una columna Superdex-200. El pico A y el pico B indicaban las fracciones eluidas que contenían el complejo MAPS, el pico C indicaba las fracciones eluidas que contenían rRhavi libre. La Figura 4B muestra la SDS-PAGE de fracciones de pico. Se llevaron a ebullición todas las muestras en tampón de muestra SDS con DTT 10 mM. La Figura 4C muestra la estabilidad del complejo MAPS. Se trataron cantidades iguales de muestra y a continuación se aplicaron a la SDS-PAGE. El complejo MAPS permanece intacto incluso después del tratamiento del tampón de muestra SDS que contiene el reactivo reductor (carril 1) y solo se puede romper después de llevar a ebullición, lo que demuestra la estabilidad de la asociación. Carril 1, MAPS tratado con tampón de muestra SDS que contiene DTT 10 mM, temperatura ambiente durante 10 min; carril 2, MAPS tratado con tampón de muestra SDS sin DTT, llevado a ebullición durante 10 min; carril 3, MAPS tratado con tampón de muestra SDS que contiene DTT 10 mM, llevado a ebullición durante 10 min.

45 La Figura 5 muestra el ensamblaje del complejo MAPS a diferentes temperaturas y a diferentes concentraciones de PS y antígeno proteico. El complejo MAPS se puede ensamblar eficazmente en una amplia gama de concentraciones de polisacárido (PS) o antígeno proteico (tan solo 0,1 mg/ml). El ensamblaje se puede realizar mediante incubación durante la noche a 4 °C (Figura 5A) o a 25 °C (Figura 5B), dependiendo de la estabilidad de los antígenos. La eficiencia de ensamblaje del complejo MAPS se puede estimar analizando la mezcla de ensamblaje mediante SDS-PAGE, con o sin la ebullición previa de la muestra. Sin el tratamiento de ebullición, los antígenos proteicos que se incorporaron al complejo MAPS permanecen en el PS y, por lo tanto, aparecen como
50 bandas de peso molecular muy grande en el gel (MAPS/PS); solamente las proteínas no unidas se desplazarían más abajo en el gel y se detectarían con el peso molecular esperado del antígeno (posición de monómero o dímero). Comparando la banda de antígeno proteico antes y después de la ebullición, se pudo estimar el porcentaje de antígenos ensamblados en el complejo MAPS. En general, la eficiencia del ensamblaje a 4 °C es superior al 85 %, y a 25 °C, es cercana al 95 %-99 %.

65 La Figura 6 muestra perfiles de elución de MAPS ensamblado con diferentes proporciones de proteína frente a

polisacárido. Se incubaron 0,5 mg de rRhavi purificada durante la noche con 1 mg, 0,5 mg o 0,1 mg de BD90, y a continuación se analizaron mediante cromatografía de filtración en gel usando una columna Superdex 200. El complejo MAPS ensamblado en una proporción más alta de proteína frente a polisacárido parecía tener un peso molecular más alto que el ensamblado en una proporción más baja. Se recogieron las fracciones de pico que contenían complejo MAPS para cada muestra (indicadas por flechas). Se midió la proporción de proteína frente a polisacárido en el complejo MAPS purificado y mostró una buena correlación con la proporción de entrada.

La Figura 7 muestra perfiles de elución de MAPS ensamblado con diferentes tamaños de polisacárido. Se incubaron 0,5 mg de antígeno de fusión con 0,25 mg de dextrano biotinilado con un peso molecular promedio de 425-500 KD (BD500), 150 KD (BD150) o 60-90 KD (BD90). El complejo MAPS se separó usando la columna Superpose 6; el perfil cromatográfico mostró que el complejo ensamblado con un polisacárido más grande tenía un tamaño mayor.

La Figura 8A-8D muestra el ensamblaje de MAPS con múltiples antígenos. La Figura 8A muestra el ensamblaje de MAPS con dos antígenos en diferentes proporciones. El complejo MAPS bivalente se preparó incubando polisacárido capsular biotinilado de *S. pneumoniae* (SP) serotipo 14 capsular con dos antígenos de fusión neumocócicos diferentes rhavi-1652 y rhavi-0757 mezclados en una relación molar de 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, o 4:1. La SDS-PAGE mostró que las cantidades de cada antígeno incorporado en el complejo MAPS estaban bien correlacionadas con las proporciones de entrada. Las Figuras 8B-8D muestran el complejo MAPS multivalente que se preparó con polisacárido biotinilado (dextrano o polisacárido capsular neumocócico de serotipo 3) que conecta dos (2V, Figura 8B), tres (3V, Figura 8C) o cinco (5V, Figura 8D) diferentes antígenos neumocócicos y de tuberculosis. La SDS-PAGE mostró los antígenos incorporados en el complejo MAPS. Se llevaron a ebullición todas las muestras en tampón de muestra SDS con DTT 10 mM.

La Figura 9 muestra que la inmunización con un complejo MAPS indujo una fuerte respuesta de anticuerpos contra antígenos polisacáridos. Los ratones que fueron inmunizados con complejo MAPS producido a partir de dextrano biotinilado (9A), polisacárido Vi (9B) o polisacárido de la pared celular neumocócica (CWPS) (9C) produjeron una cantidad significativamente mayor de anticuerpos anti-polisacárido en comparación con los grupos de animales que recibieron adyuvante solo (sin Ag) o una mezcla de polisacárido y proteínas desacoplados (Mezcla). Las Figuras 9D-9F muestran que el complejo MAPS se compara favorablemente con la vacuna conjugada convencional en la generación de Ac anti-PS. Los complejos MAPS se produjeron a partir de polisacárido capsular (CPS) de SP de serotipo 1, 5, 14, cargado con cinco antígenos proteicos. Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea con MAPS o Pevnar 13® (vacuna conjugada antineumocócica 13-valente [proteína diftérica CRM197]; Wyeth/Pfizer) (PCV13) dos veces, con 2 semanas de diferencia, y el anticuerpo IgG sérico contra el serotipo CPS vacunal se analizó 2 semanas después de la segunda inmunización por ELISA. El título de IgG anti-CPS en ratones inmunizados con PCV13 se fijó arbitrariamente en 1200 unidades para comparación. Para todos los serotipos probados, la inmunización con el complejo MAPS generó un nivel similar (serotipo 5) o un nivel mucho mayor de anticuerpo IgG anti-CPS (serotipo 1 y serotipo 14) que el generado por la vacunación con PCV13. Serotipo 1 (Figura 9D); Serotipo 5 (Figura 9E); Serotipo 14 (Figura 9F).

La Figura 10 compara el anticuerpo anti-PS inducido por MAPS a diferentes dosis de inmunización. El complejo MAPS se preparó a partir de una carga de CPS de SP de serotipo 5 con cinco antígenos proteicos. A los ratones se les administró complejo MAPS a 1 µg-16 µg de contenido de PS por dosis, para dos inmunizaciones, con dos semanas de diferencia. Se midió el anticuerpo sérico contra CPS de serotipo 5 y se comparó entre diferentes grupos de inmunización dos semanas después de la segunda inmunización. En todas las dosificaciones, la inmunización con MAPS indujo anticuerpos IgG robustos contra el CPS de serotipo 5. La administración de 2 µg de PS por dosis generó el título de anticuerpos más alto y el aumento de la dosificación de PS hasta 16 µg redujo el título de anticuerpos aproximadamente 4 veces.

La Figura 11 muestra que los anticuerpos anti-PS generados por la inmunización con el complejo MAPS facilitan la destrucción de los patógenos objetivo *in vitro*. La Figura 11A demuestra la destrucción mediada por anticuerpos de la bacteria que expresa Vi. El suero de los animales inmunizados con el complejo MAPS (usando Vi como el esqueleto), pero no de los otros dos grupos, mostró una potente destrucción de la cepa que expresa Vi (más del 90 % de destrucción) en 1 hora desde la incubación. Suero de ratones inmunizados con Alum (línea discontinua); Mezcla (línea negra); o MAPS (línea gris). Las Figuras 11B-11D demuestran que la actividad destructora opsonofagocítica del suero de ratones inmunizados con MAPS se compara favorablemente con la actividad destructora del suero de ratones inmunizados con la vacuna PCV13 autorizada. Se analizó y comparó la capacidad del suero de ratones inmunizados con PCV13 o MAPS para mediar *in vitro* la destrucción opsonofagocítica del neumococo por neutrófilos. Los neutrófilos humanos se diferenciaron de las células de la línea celular HL-60. La destrucción opsonofagocítica se realizó incubando el suero, en diferentes diluciones, con serotipo 1 (Figura 11B), serotipo 5 (Figura 11C) o serotipo 13 (Figura 11D), neumococo y células HL-60 diferenciadas a 37 °C durante 1 hora (en presencia de complemento de crías de conejo). Se sembró una alícuota de la mezcla después de la incubación para contar las bacterias supervivientes. La unidad de destrucción opsonofagocítica se definió como las veces de dilución del suero en la que se observa una destrucción del 50 % de las bacterias. Para todos los serotipos probados, el suero de ratones inmunizados con MAPS mostró una actividad destructora (título de OPA) al menos 4 veces mayor que la del suero de ratones inmunizados con PCV13. Figuras 11B-11D: Suero de ratones inmunizados con Alum (línea discontinua); PCV13 (línea negra); o MAPS (línea gris).

Las Figuras 12A-12D demuestran que la inmunización con un complejo MAPS induce una respuesta robusta de anticuerpos y celular contra antígenos proteicos. El complejo MAPS bivalente se preparó a partir de dextrano biotinilado (BD500) y dos antígenos neumocócicos, rhavi-Pdt y rhavi-PsaA. Las vacunas subcutáneas se administraron cada dos semanas, tres veces. La Figura 12A muestra los resultados de los anticuerpos IgG en

suero medidos contra PsaA o Pdt 2 semanas después de la última inmunización. Los ratones inmunizados con el complejo MAPS produjeron títulos significativamente más altos de anticuerpos anti-Pdt y anti-PsaA que los ratones que recibieron la mezcla. Las respuestas de linfocitos T específicas de antígeno se evaluaron mediante estimulación *in vitro* de la sangre completa de animales inmunizados. La producción de IL-17A (Figura 12B) e IFN- γ (Figura 12C) *in vitro* se midió en muestras de sangre incubadas 6 días con PsaA purificado, Pdt o antígeno de células completas (WCA) neumocócicas. En comparación con los ratones inmunizados con la mezcla, los animales que recibieron el complejo MAPS mostraron una respuesta de IL-17A e IFN- γ significativamente más fuerte. La Figura 12D muestra una correlación de la producción de IL-17A e IFN- γ por estimulación de WCA. En todos los paneles, las barras representan las medias con la desviación estándar y el análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Mann-Whitney o utilizando el R de Spearman para la correlación.

La Figura 13 muestra la evaluación de la inmunogenicidad del complejo MAPS en diferentes tamaños. Los complejos MAPS se prepararon a partir de dos antígenos de fusión neumocócicos, rhavi-PsaA y rhavi-Pdt, y usando dextrano de diferentes longitudes como esqueleto (BD500, Pm de 425-500 kDa; BD90, Pm de 60-90 kDa). Se midieron y compararon las respuestas de anticuerpos al dextrano y a dos antígenos proteicos Pdt y PsaA, así como las respuestas de linfocitos T específicas de antígeno después de 3 inmunizaciones. Como se muestra, los ratones que fueron inmunizados con el complejo más grande (MAPS BD500) generaron un nivel similar de anticuerpos anti-PsaA y anti-Pdt (Figura 13B), pero un título significativamente más alto de anticuerpos anti-dextrano (Figura 13A), así como la respuesta de linfocitos T asociada a IL-17A (Figura 13C) que los animales que recibieron el complejo más pequeño (MAPS BD90).

La Figura 14 muestra que la adición de factores coestimuladores (ligandos de TLR) al complejo MAPS facilita las respuestas de linfocitos T asociadas a IL-17A e IFN- γ . Los complejos MAPS se prepararon a partir de dextrano biotinilado y un antígeno proteico neumocócico, rhavi-0435, con o sin el ligando/agonista de TLR adicional: rhavi-Pdt, ligando de TLR4; Pam3CSK4, agonista de TLR2. La incorporación de rhavi-Pdt se realiza mediante la interacción de afinidad entre rhavi y biotina, mientras que Pam3CSK4 está unido covalentemente al esqueleto de dextrano. La inmunización se administró por vía subcutánea tres veces y se midieron y compararon las respuestas de linfocitos T contra la proteína 0435. Se observó que la adición de un agonista de TLR2 o una combinación de ligandos de TLR4 y TLR2 mejoró significativamente las respuestas de linfocitos T asociadas a IL-17A e IFN- γ al antígeno proteico.

La Figura 15 muestra un ejemplo de vacuna combinada multivalente contra neumococos/Mycobacterium tuberculosis (TB). La vacuna MAPS de combinación SP/TB multivalente se preparó utilizando SP de serotipo 3 y cargando una proteína SP (toxóide de neumolisina, Pdt) y seis proteínas TB (en cuatro construcciones de fusión) (Figura 15A). La inmunización de ratones con MAPS SP/TB indujo un título elevado de anticuerpos IgG contra CPS tipo 3 (Figura 15B, panel izquierdo), así como contra Pdt (Figura 15B, panel derecho), y dio lugar a una protección del 100 % de los ratones frente a la infección pulmonar letal por neumococo de serotipo 3 (Figura 15C). Las Figuras 15D-15J muestran los antígenos B de inmunidad de linfocitos B y linfocitos T inducidos por la vacunación con MAPS SP/TB. La Figura 15D muestra las respuestas de anticuerpos a diferentes antígenos proteicos de TB. Las Figuras 15E-15F muestran fuertes respuestas de linfocitos T asociadas a IL-17A (Figura 15E) e IFN- γ (Figura 15F) en una muestra de sangre completa de ratones inmunizados con MAPS después de la estimulación *in vitro* con antígenos proteicos de TB purificados. Las Figuras 15G y 15H muestran las respuestas de linfocitos T asociadas a IL-17A (Figura 15G) e IFN- γ (Figura 15H) de esplenocitos de animales inmunizados con MAPS a la mezcla de antígenos proteicos de TB purificada o al extracto de células completas de TB. Las Figuras 15I y 15J proporcionan datos adicionales con respecto a los linfocitos T de memoria/efectores específicos de TB inducidos por la inmunización con MAPS. Los resultados mostraron que el agotamiento de los linfocitos T CD4+ pero no de los linfocitos T CD8+ tuvo un impacto significativo en la producción de citocinas específicas del antígeno de TB, lo que indica que la inmunización con la vacuna MAPS había estimulado principalmente una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD4+ (linfocitos T colaboradores).

La Figura 16 demuestra que un prototipo de composición inmunogénica multivalente basada en MAPS previene la infección invasiva y la colonización nasofaríngea de neumococo. Se preparó MAPS de SP multivalente utilizando polisacárido de pared celular (CWPS) de SP como esqueleto y se cargó con cinco antígenos proteicos neumocócicos (Figura 16A). Los ratones se inmunizaron con este MAPS de SP tres veces, con dos semanas de diferencia, y los anticuerpos séricos y las respuestas de linfocitos T específicas contra neumococos se analizaron dos semanas después de la última inmunización. La Figura 16B muestra el anticuerpo IgG en suero contra CWPS (panel izquierdo) o contra el antígeno de células completas (WCA) neumocócicas (panel derecho). Los ratones inmunizados con MAPS de SP produjeron títulos significativamente más altos de anticuerpos contra CWPS o WCA que los ratones de los grupos de control que recibieron adyuvante solo (Sin Ag) o una mezcla de PS/proteína desacoplada (Mezcla). Las Figuras 16C y 16D muestran respuestas de linfocitos T específicas de SP inducidas por vacunación con MAPS SP. La sangre periférica de ratones de diferentes grupos de inmunización se estimuló con proteínas neumocócicas purificadas (mezcla de antígenos) o WCA. Las células de los ratones vacunados con MAPS, pero no de los grupos de control, respondieron en un alto nivel a los antígenos SP y produjeron una producción robusta de IL-17A (Figura 16C) e IFN- γ (Figura 16D). Las Figuras 16E y 16F muestran que la vacunación con el complejo MAPS protege a los ratones de la infección invasiva, así como de la colonización nasofaríngea de neumococo. Se estimularon ratones de diferentes grupos de inmunización con la cepa WU2 de SP de serotipo 3 en un modelo de aspiración pulmonar (Figura 16E), o con la cepa neumocócica 603 de serotipo 6 en un modelo de colonización nasal (Figura 16F). La protección contra la sepsis o la colonización solo se observó en ratones inmunizados con MAPS.

Descripción detallada de la divulgación

Debe entenderse que la presente divulgación no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares, etc., descritos en el presente documento y, como tal, pueden variar. La terminología usada en el presente documento tiene la finalidad única de describir divulgaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente divulgación, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, las formas en singular incluyen las referencias en plural y viceversa a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "o" es inclusivo a menos que se modifique, por ejemplo, por "cualquiera". Excepto en los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes o condiciones de reacción usados en el presente documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Se entiende además que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos y todos los valores de pesos moleculares o masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción.

Todas las patentes y otras publicaciones identificadas tienen el propósito de describir y divulgar, por ejemplo, las metodologías descritas en dichas publicaciones que podrían usarse en conexión con la presente divulgación. Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este sentido se ha de interpretar como un reconocimiento de que los inventores no tengan derecho a preceder tal divulgación en virtud de la divulgación anterior o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones sobre la fecha o la representación sobre el contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen un reconocimiento en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

A menos que defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende normalmente un experto habitual en la materia a la que pertenece esta divulgación. Aunque puede usarse cualquier método, dispositivo y material conocido en la práctica o prueba de la divulgación, los métodos, dispositivos y materiales a este respecto se describen en el presente documento.

La presente divulgación se refiere a composiciones inmunogénicas y composiciones que comprenden un complejo inmunogénico que comprende al menos un antígeno, o múltiples antígenos, unidos a un armazón polimérico para su uso en la provocación de una respuesta inmunitaria a cada uno de los antígenos unidos al propio polímero y, cuando se administra a un sujeto. Este sistema presentador de antígenos múltiples (MAPS), estimula una respuesta inmunitaria humoral y celular: puede generar anticuerpos anti-polisacáridos y respuestas de linfocitos B/Th1/Th17 a múltiples antígenos proteicos utilizando una única construcción inmunogénica MAPS. Una combinación de inmunidad de linfocitos B y T frente al organismo podría representar una estrategia de vacuna óptima contra muchas enfermedades, incluida la infección invasiva asociada a la enfermedad neumocócica y el transporte nasofaríngeo. En algunas divulgaciones, la composición inmunogénica es una vacuna o está incluida en una vacuna.

Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición inmunogénica (sistema presentador de múltiples antígenos, o MAPS) que comprende al menos un polímero, por ejemplo, un polisacárido, al menos un antígeno proteico o peptídico, y al menos un par de moléculas de afinidad- complementaria que comprende (i) una primera molécula de afinidad asociada con el polímero, y (ii) una molécula de afinidad complementaria asociada con el antígeno, que sirve para unir indirectamente el antígeno al polímero (por ejemplo, la primera molécula de afinidad se asocia con la molécula de afinidad complementaria para unir el antígeno al polímero). Por consiguiente, el polímero puede usarse como un andamio para unir al menos 1, o al menos 2, o más (por ejemplo, una pluralidad) de los mismos o diferentes antígenos. Las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento se pueden usar para provocar inmunidad tanto humoral como celular frente a múltiples antígenos al mismo tiempo.

Por consiguiente, las divulgaciones del presente documento proporcionan una composición inmunogénica y métodos útiles para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que se puede usar por sí sola o junto con o mezclarse con esencialmente cualquier enfoque de vacuna existente.

Definiciones:

Por conveniencia, determinados términos empleados en toda la solicitud (incluyendo la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas) se recopilan aquí. A menos que defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente divulgación.

La expresión "composición inmunogénica" utilizada en el presente documento se define como una composición capaz de provocar una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta inmunitaria de anticuerpos o celular, cuando se administra a un sujeto. Las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación pueden ser inmunoprotectoras o terapéuticas. Cuando las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación previenen, mejoran, alivian o eliminan la enfermedad del sujeto, entonces la composición inmunogénica puede denominarse opcionalmente vacuna.

Tal como se usa en el presente documento, sin embargo, no se pretende que la expresión composición inmunogénica se limite a vacunas.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia que provoca una respuesta inmunitaria dirigida contra la sustancia. En algunas divulgaciones, un antígeno es un péptido o un polipéptido, y en otras divulgaciones, puede ser cualquier sustancia química o resto, por ejemplo, un hidrato de carbono, que provoca una respuesta inmunitaria dirigida contra la sustancia.

10 El término "asocia", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de dos o más moléculas mediante enlaces covalentes o no covalentes. En algunas divulgaciones, cuando se produce la unión de dos o más moléculas mediante un enlace covalente, las dos o más moléculas pueden fusionarse o reticularse entre sí. En algunas divulgaciones, cuando se produce la unión de dos o más moléculas mediante un enlace no covalente, las dos o más moléculas pueden formar un complejo.

15 El término "complejo" como se usa en el presente documento se refiere a una colección de dos o más moléculas, conectadas espacialmente por medios distintos a una interacción covalente; por ejemplo pueden estar conectadas por interacciones electrostáticas, enlace de hidrógeno o por interacciones hidrófobas (es decir, fuerzas de van der Waals).

20 El término "reticulado" como se usa en el presente documento se refiere a un enlace covalente formado entre una cadena de polímero y una segunda molécula. La expresión "reactivo de reticulación" se refiere a una entidad o agente que es una molécula intermedia para catalizar el enlace covalente de un polímero con una entidad, por ejemplo, primera molécula de afinidad o factor coestimulador.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "fusionado" significa que al menos una proteína o péptido está asociado físicamente con una segunda proteína o péptido. En algunas divulgaciones, la fusión es normalmente un enlace covalente, sin embargo, otros tipos de enlaces que están abarcados en el término "fusionado" incluyen, por ejemplo, unión mediante una interacción electrostática o una interacción hidrófoba y similares. El enlace covalente puede abarcar el enlace como una proteína de fusión o un enlace acoplado químicamente, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro formado entre dos restos de cisteína.

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido de fusión" o "proteína de fusión" significa una proteína creada uniendo dos o más secuencias de polipéptidos. Los polipéptidos de fusión abarcados en esta divulgación incluyen productos de traducción de una construcción génica quimérica que une las secuencias de ADN que codifican uno o más antígenos, o fragmentos o mutantes de los mismos, codificando la secuencia de ADN un segundo polipéptido para formar un único marco de lectura abierto. En otras palabras, un "polipéptido de fusión" o "proteína de fusión" es una proteína recombinante de dos o más proteínas que están unidas por un enlace peptídico o mediante varios péptidos. En algunas divulgaciones, la segunda proteína a la que se fusionan los antígenos es una molécula de afinidad complementaria que es capaz de interactuar con una primera molécula de afinidad del par de afinidad complementaria.

40 Los términos "polipéptido" y "proteína" pueden usarse indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y para los propósitos de la divulgación reivindicada, tienen una longitud mínima típica de al menos 25 aminoácidos. El término "polipéptido" y "proteína" puede abarcar una proteína multimérica, por ejemplo, una proteína que contiene más de un dominio o subunidad. El término "péptido", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos que contienen menos de 25 aminoácidos, por ejemplo, entre aproximadamente 4 aminoácidos y 25 aminoácidos de longitud. Las proteínas y los péptidos pueden estar compuestos de aminoácidos dispuestos linealmente unidos por enlaces peptídicos, y ya sean producidos de forma biológica, recombinante o sintética o compuestos de aminoácidos de origen natural o no natural, se incluyen en esta definición. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas de más de 25 aminoácidos están abarcados por la definición de proteína. Los términos también incluyen polipéptidos que tienen modificaciones cotraduccionales (por ejemplo, escisión del péptido de señal) y postraduccionales del polipéptido, tales como, por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, acetilación, fosforilación, lipidación, escisión proteolítica (por ejemplo, escisión por metaloproteasas), y similares. Asimismo, tal como se usa en el presente documento, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa como sería conocido por una persona experta en la materia) en la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como por mutaciones de hospedadores que producen las proteínas, o errores debidos a la amplificación por PCR u otros métodos de ADN recombinantes.

60 Por "secuencia de señal" se entiende una secuencia de ácido nucleico que, cuando se une operativamente a una molécula de ácido nucleico, facilita la secreción del producto (por ejemplo, proteína o péptido) codificado por la molécula de ácido nucleico. En algunas divulgaciones, la secuencia de señal se localiza preferiblemente en 5' con respecto a la molécula de ácido nucleico.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "N-glicosilado" o "N-glicosilación" se refiere a la unión covalente

de un resto de azúcar a restos de asparagina en un polipéptido. Los restos de azúcar pueden incluir, pero no se limitan a glucosa, manosa y N-acetilglucosamina. También se incluyen modificaciones de los glicanos, por ejemplo, sialilación.

5 Una "célula presentadora de antígeno" o "APC" es una célula que expresa las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y puede presentar un antígeno extraño que forma un complejo con MHC en su superficie. Los ejemplos de células presentadoras de antígenos son células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, fibroblastos (piel), células epiteliales tímicas, células epiteliales tiroideas, células gliales (cerebro), células beta pancreáticas y células endoteliales vasculares.

10 La expresión "parte funcional" o "fragmento funcional" como se usa en el contexto de una "parte funcional de un antígeno" se refiere a una parte del antígeno o polipéptido de antígeno que media el mismo efecto que el resto de antígeno completo, por ejemplo, provoca una respuesta inmunitaria en un sujeto, o media una asociación con otra molécula, por ejemplo, comprende al menos un epítipo.

15 Una "parte" de un antígeno diana, como se usa en el presente documento, tendrá al menos 3 aminoácidos de longitud y puede tener, por ejemplo, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 14, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20 o al menos 25 aminoácidos más, inclusive.

20 Las expresiones "linfocito T citotóxico" o "CTL" se refieren a linfocitos que inducen la muerte mediante apoptosis u otros mecanismos en células diana. Los CTL forman conjugados específicos de antígeno con las células diana mediante la interacción de los TCR con el antígeno (Ag) procesado en las superficies de las células diana, lo que da como resultado la apoptosis de la célula diana. Los cuerpos apoptóticos son eliminados por macrófagos. La expresión "respuesta de CTL" se usa para referirse a la respuesta inmunitaria primaria mediada por células CTL.

25 La expresión "inmunidad mediada por células" o "CMI" como se usa en el presente documento se refiere a una respuesta inmunitaria que no implica anticuerpos o complemento, sino que implica la activación de, por ejemplo, macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno (linfocitos T), linfocitos T colaboradores, neutrófilos y la liberación de varias citocinas en respuesta a un antígeno diana. Dicho de otra manera, la CMI se refiere a las células inmunitarias (como los linfocitos T y otros linfocitos) que se unen a la superficie de otras
30 células que presentan un antígeno diana (como las células presentadoras de antígeno (APC)) y desencadenan una respuesta. La respuesta puede implicar a otros linfocitos y/o cualquiera de los otros glóbulos blancos (leucocitos) y la liberación de citocinas. La inmunidad celular protege al cuerpo: (i) activando los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígeno que pueden destruir células corporales que presentan epítopos de antígenos extraños en su superficie, tales como células infectadas por virus y células con bacterias intracelulares; (2) activando los macrófagos
35 y los linfocitos NK, permitiéndoles destruir patógenos intracelulares; y (3) estimulando las células para que secreten una variedad de citocinas o quimiocinas que influyen en la función de otros linfocitos tales como linfocitos T, macrófagos o neutrófilos implicados en respuestas inmunitarias adaptativas y respuestas inmunitarias innatas.

40 La expresión "célula inmunitaria" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier célula que pueda liberar una citocina, quimiocina o anticuerpo en respuesta a una estimulación antigénica directa o indirecta. Incluidos en la expresión "células inmunitarias" en el presente documento son los linfocitos, incluyendo linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T (linfocitos CD4+ y/o CD8+), linfocitos B, macrófagos; leucocitos; células dendríticas; mastocitos; monocitos; y cualquier otra célula que sea capaz de producir una molécula de citocina o quimiocina en respuesta a la estimulación antigénica directa o indirecta. Normalmente, una célula inmunitaria es un linfocito, por ejemplo, un linfocito
45 T.

El término "citocina", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula liberada de una célula inmunitaria en respuesta a la estimulación con un antígeno. Los ejemplos de dichas citocinas incluyen, pero sin limitación: GM-CSF; IL-1 α ; IL-1 β ; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-10; IL-12; IL-17A, IL-17F u otros miembros de
50 la familia IL-17, IL-22, IL-23, IFN- α ; IFN- β ; IFN- γ ; MIP-1 α ; MIP-1 β ; TGF- β ; TNF α , o TNF β . El término "citocina" no incluye anticuerpos.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal en el que sea útil para provocar una respuesta inmunitaria. El sujeto puede ser un animal salvaje, doméstico, comercial o de compañía, tal como un ave o un mamífero. El sujeto puede ser un ser humano. Aunque en una divulgación de la divulgación se contempla que las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento también pueden ser adecuadas para el tratamiento terapéutico o preventivo en humanos, también es aplicable a vertebrados de sangre caliente, por ejemplo, mamíferos, tales como primates no humanos, (particularmente primates superiores), oveja, perro, roedor (por ejemplo, ratón o rata), cobaya, cabra, cerdo, gato, conejos, vacas y no mamíferos, tales como pollos, patos o pavos. En otra divulgación, el sujeto es un animal salvaje, por ejemplo, un ave tal como para el diagnóstico de la gripe aviar. En algunas divulgaciones, el sujeto es un animal de experimentación o un sustituto de animal como modelo de enfermedad. El sujeto puede ser un sujeto que necesite tratamiento veterinario, donde provocar una respuesta inmunitaria a un antígeno es útil para prevenir una enfermedad y/o para controlar la propagación de una enfermedad, por ejemplo, SIV, STL1, o en el caso de la enfermedad del ganado, enfermedad de las pezuñas y la boca, o en el caso de las aves, enfermedad de Marek o gripe aviar, y otras enfermedades similares.
65

Tal como se usa en el presente documento, el término "patógeno" se refiere a un organismo o molécula que causa una enfermedad o trastorno en un sujeto. Por ejemplo, los patógenos incluyen, pero no se limitan a virus, hongos, bacterias, parásitos y otros organismos infecciosos o moléculas de los mismos, así como organismos macroscópicos taxonómicamente relacionados dentro de las categorías de algas, hongos, levaduras, protozoos, o similares.

5 Una "célula de cáncer" se refiere a una célula cancerosa, precancerosa, o transformada, ya sea *in vivo*, *ex vivo*, o en cultivo tisular, que tiene cambios fenotípicos espontáneos o inducidos que no implican necesariamente la absorción de nuevo material genético. Aunque la transformación puede surgir de la infección con un virus transformante y la incorporación de nuevo ácido nucleico genómico, o la captación de ácido nucleico exógeno, también puede surgir
10 espontáneamente o después de la exposición a un carcinógeno, mutando así un gen endógeno. La transformación/cáncer se asocia, por ejemplo, cambios morfológicos, inmortalización de células, control del crecimiento aberrante, formación de focos, independencia de anclaje, malignidad, pérdida de inhibición por contacto y limitación de la densidad de crecimiento, factor de crecimiento o independencia del suero, marcadores tumorales específicos, invasividad o metástasis y crecimiento tumoral en hospedadores animales adecuados, tales como ratones desnudos. Véase, por ejemplo, Freshney, CULTURE ANIMAL CELLS: MANUAL BASIC TECH. (3ª ed., 1994).

La expresión "tipo silvestre" se refiere a la secuencia de polinucleótidos normal de origen natural que codifica una proteína, o una parte de la misma, o una secuencia de proteína, o parte de la misma, respectivamente, como normalmente existe *in vivo*.

20 El término "mutante" se refiere a un organismo o célula con cualquier cambio en su material genético, en particular un cambio (es decir, delección, sustitución, adición o alteración) con respecto a una secuencia de polinucleótidos de tipo silvestre o cualquier cambio con respecto a una secuencia de proteínas de tipo silvestre. El término "variante" puede usarse indistintamente con "mutante". Aunque a menudo se asume que un cambio en el material genético da como resultado un cambio en la función de la proteína, los términos "mutante" y "variante" se refieren a un cambio en la
25 secuencia de una proteína de tipo silvestre independientemente de si ese cambio altera la función de la proteína (por ejemplo, aumenta, disminuye, imparte una nueva función), o si ese cambio no tiene efecto sobre la función de la proteína (por ejemplo, la mutación o variación es silenciosa).

30 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a compuestos y composiciones que pueden administrarse a mamíferos sin una toxicidad excesiva. La expresión "vehículos farmacéuticamente aceptables" excluye el medio de cultivo de tejidos. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares, y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien
35 conocidos en la técnica.

Se apreciará que las proteínas o polipéptidos contienen a menudo aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos comúnmente denominados como los 20 aminoácidos naturales, y que muchos aminoácidos, incluidos los aminoácidos terminales, se puede modificar en un polipéptido dado, ya sea por procesos naturales tales como glicosilación y otras modificaciones postraduccionales, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Las modificaciones conocidas que pueden estar presentes en los polipéptidos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un polinucleótido o derivado de polinucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación,
45 formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formulación, gamma-carboxilación, glicación, glicosilación, formación de anclaje a GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación.

50 Tal como se usa en el presente documento, los términos "homólogo" u "homología" se usan indistintamente, y cuando se usan para describir un polinucleótido o polipéptido, indican que dos polinucleótidos o polipéptidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean óptimamente y se comparan, por ejemplo utilizando BLAST, versión 2.2.14 con parámetros predeterminados para una alineación son idénticos, con inserciones o delecciones de nucleótidos apropiadas o inserciones o delecciones de aminoácidos, normalmente en al menos el 70 % de los nucleótidos de los nucleótidos en el caso de una homología elevada. En el caso de un polipéptido, debe haber al menos un 30 % de identidad de aminoácidos en el polipéptido, o al menos un 50 % para una homología más elevada. El término "homólogo" un "homología" como se usa en el presente documento también se refiere a homología con respecto a la estructura. La determinación de homólogos de genes o polipéptidos puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia. Cuando está en el contexto con un porcentaje definido, el porcentaje de homología
55 definido significa al menos ese porcentaje de similitud de aminoácidos. Por ejemplo, el 85 % de homología se refiere a al menos el 85 % de similitud de aminoácidos.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" con referencia a secuencias de ácidos nucleicos, proteínas o polipéptidos significa que estas moléculas no se encuentran de forma natural en esa célula. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de antígeno de fusión descrito en el presente documento que se inserta en una célula, por ejemplo en el contexto de un vector de expresión de proteínas, es una secuencia de
65

ácido nucleico heteróloga.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la o las secuencias de prueba respecto a la secuencia de referencia, basándose más en los parámetros del programa designados. En los casos en los que sea necesario o se desee, la alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse mediante diferentes enfoques, como son bien conocidos en la técnica.

El término "variante", como se usa en el presente documento, puede referirse a un polipéptido o ácido nucleico que difiere del polipéptido o ácido nucleico de origen natural en una o más deleciones, adiciones, sustituciones o modificaciones de la cadena lateral de los aminoácidos o ácidos nucleicos, pero que conserva uno o más funciones o actividades biológicas más específicas de la molécula de origen natural. Las sustituciones de aminoácidos incluyen alteraciones en las que un aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido diferente de origen natural o no convencional. Tales sustituciones pueden clasificarse como "conservativas", en cuyo caso un resto de aminoácido contenido en un polipéptido se reemplaza con otro aminoácido natural de carácter similar en relación con la polaridad, la funcionalidad de la cadena lateral o el tamaño. Las sustituciones abarcadas por variantes como se describe en el presente documento también pueden ser "no conservativas", en las que un resto de aminoácido que está presente en un péptido se sustituye con un aminoácido que tiene propiedades diferentes (por ejemplo, sustituyendo un aminoácido cargado o hidrófobo con alanina), o como alternativa, en el que un aminoácido de origen natural se sustituye por un aminoácido no convencional. También incluidas dentro del término "variante", cuando se usa en referencia a un polinucleótido o polipéptido, son las variaciones en la estructura primaria, secundaria o terciaria, en comparación con un polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente (por ejemplo, en comparación con un polinucleótido o polipéptido de tipo silvestre).

La expresión "sustancialmente similar", cuando se usa en referencia a una variante de un antígeno o un derivado funcional de un antígeno en comparación con el antígeno original, significa que una secuencia objeto particular varía respecto a la secuencia del polipéptido antigénico en una o más sustituciones, deleciones o adiciones, pero retiene al menos el 50 %, o más, por ejemplo, al menos el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o más, inclusive, de la función del antígeno para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Al determinar las secuencias de polinucleótidos, todas las secuencias de polinucleótidos objeto capaces de codificar secuencias de aminoácidos sustancialmente similares se consideran sustancialmente similares a una secuencia de polinucleótidos de referencia, independientemente de las diferencias en la secuencia de codones. Una secuencia de nucleótidos es "sustancialmente similar" a una secuencia de ácido nucleico de antígeno dada si:

- (a) la secuencia de nucleótidos se hibrida con las regiones codificantes de la secuencia del antígeno nativo, o
- (b) la secuencia de nucleótidos es capaz de hibridar con la secuencia de nucleótidos del antígeno nativo en condiciones moderadamente rigurosas y tiene una actividad biológica similar a la proteína del antígeno nativo; o
- (c) las secuencias de nucleótidos están degeneradas como resultado del código genético con respecto a las secuencias de nucleótidos definidas en (a) o (b). Las proteínas sustancialmente similares serán normalmente más de aproximadamente un 80 % similares a la secuencia correspondiente de la proteína nativa.

Las variantes pueden incluir cambios de aminoácidos conservativos o no conservativos, como se describe a continuación. Los cambios de polinucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia. Las variantes también pueden incluir inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, incluyendo inserciones y sustituciones de aminoácidos y otras moléculas que normalmente no ocurren en la secuencia del péptido que es la base de la variante, por ejemplo, pero sin limitarse a la inserción de ornitina que normalmente no se encuentra en las proteínas humanas. Las "sustituciones conservativas de aminoácidos" son el resultado de reemplazar un aminoácido por otro que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los seis grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: (1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); (2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); (3) Asparagina (N), Glutamina (Q); (4) Arginina (R), Lisina (K); (5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y (6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W). Véase, por ejemplo, Creighton, PROTEINS (W.H. Freeman & Co., 1984).

La elección de aminoácidos conservativos se puede seleccionar en función de la ubicación del aminoácido que se sustituirá en el péptido, por ejemplo, si el aminoácido está en el exterior del péptido y se expone a disolventes, o en el interior y no se expone a disolventes. La selección de tales sustituciones conservativas de aminoácidos está dentro del conocimiento de un experto en la materia. Por consiguiente, se pueden seleccionar sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas para los aminoácidos en el exterior de una proteína o péptido (es decir, aminoácidos expuestos a un disolvente). Estas sustituciones incluyen, pero sin limitación, las siguientes: sustitución de Y con F, T con S o K, P con A, E con D o Q, N con D o G, R con K, G con N o A, T con S o K, D con N o E, I con L o V, F con Y, S con T o A, R con K, G con N o A, K con R, A con S, K o P.

Como alternativa, también se pueden seleccionar sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas para los aminoácidos en el interior de una proteína o péptido (es decir, los aminoácidos no están expuestos a un disolvente). Por ejemplo, pueden utilizarse las siguientes sustituciones conservativas: donde Y está sustituido con F, T con A o S, I con L o V, W con Y, M con L, N con D, G con A, T con A o S, D con N, I con L o V, F con Y o L, S con A o T y A con S, G, T o V. En algunas divulgaciones, los polipéptidos LF que incluyen sustituciones de aminoácidos no conservativas también se incluyen dentro del término "variantes". Tal como se usa en el presente documento, la expresión sustitución "no conservativa" se refiere a la sustitución de un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente que tiene diferentes propiedades químicas. Los ejemplos no limitantes de sustituciones no conservativas incluyen el reemplazo de ácido aspártico (D) por glicina (G); el reemplazo de asparagina (N) por lisina (K); y el reemplazo de alanina (A) por arginina (R).

El término "derivado", como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas o péptidos que se han modificado químicamente, por ejemplo, mediante ubiquitinación, marcaje, pegilación (derivatización con polietilenglicol) o adición de otras moléculas. Una molécula también es un "derivado" de otra molécula cuando contiene restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Dichos restos pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica etc. de la molécula. Los restos pueden como alternativa disminuir la toxicidad de la molécula o eliminar o atenuar un efecto secundario indeseable de la molécula, etc. Los restos capaces de mediar dichos efectos se divulgan en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (21ª ed., Tory, ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006).

El término "funcional" cuando se usa junto con "derivado" o "variante" se refiere a una molécula de proteína que posee una actividad biológica que es sustancialmente similar a una actividad biológica de la entidad o molécula de la que es un derivado o variante. "Sustancialmente similar" en este contexto significa que la actividad biológica, por ejemplo, antigenicidad de un polipéptido, es al menos 50 % tan activa como una referencia, por ejemplo, un polipéptido de tipo silvestre correspondiente, por ejemplo, al menos 60 % tan activa, 70 % tan activa, 80 % tan activa, 90 % tan activa, 95 % tan activa, 100 % tan activa o incluso mayor (es decir, la variante o derivado tiene mayor actividad que el tipo silvestre), por ejemplo, 110 % tan activa, 120 % tan activa, o más, inclusive.

El término "recombinante" cuando se usa para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, viral, semisintético, y/o sintético, que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado con todo o con una parte de las secuencias de polinucleótidos con las que está asociado en la naturaleza. El término recombinante, como se usa con respecto a un péptido, polipéptido, proteína o proteína de fusión recombinante, significa un polipéptido producido por expresión de un polinucleótido recombinante. El término recombinante, tal como se utiliza con respecto a una célula hospedadora, significa una célula hospedadora en la que se ha introducido un polinucleótido recombinante. Recombinante también se usa en el presente documento para referirse, con referencia a un material (por ejemplo, una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector) que ha sido modificado mediante la introducción de un material heterólogo (por ejemplo, una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector).

El término "vectores" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar o mediar la expresión de un ácido nucleico heterólogo al que se ha unido a una célula hospedadora; un plásmido es una especie del género abarcado por el término "vector". El término "vector" se refiere normalmente a una secuencia de ácido nucleico que contiene un origen de replicación y otras entidades necesarias para la replicación y/o mantenimiento en una célula hospedadora. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes y/o secuencias de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad a menudo están en forma de "plásmidos" que se refieren a moléculas de ADN bicatenario circular que, en su forma de vector, no están unidas al cromosoma y normalmente comprenden entidades para la expresión estable o transitoria del ADN codificado. Otros vectores de expresión que se pueden usar en los métodos como se divulgan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a plásmidos, episomas, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas de levadura artificiales, bacteriófagos o vectores virales, y dichos vectores pueden integrarse en el genoma del hospedador o replicarse de forma autónoma en la célula particular. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. También pueden usarse otras formas de vectores de expresión conocidas por los expertos en la materia que cumplen funciones equivalentes, por ejemplo, vectores extracromosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en un genoma hospedador. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos.

El término "reducido" o "reducir" o "disminuir" como se usa en el presente documento generalmente significa una disminución en una cantidad estadísticamente significativa con respecto a una referencia. Para evitar dudas, "reducido" significa una disminución estadísticamente significativa de al menos un 10 % en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo una disminución de al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 %, al menos el 90 % o más, hasta e incluyendo una disminución del 100 % (es decir, nivel ausente en comparación con una muestra de referencia), o cualquier disminución entre 10-100 % en comparación con un nivel de referencia, según se usa esta expresión en el presente documento.

El término "bajo" como se usa en el presente documento generalmente significa menor en una cantidad

estadísticamente significativa; para disipar cualquier duda, "bajo" significa un valor estadísticamente significativo al menos un 10 % menor que un nivel de referencia, por ejemplo un valor al menos un 20 % menor que un nivel de referencia, al menos un 30 % menor que un nivel de referencia, al menos un 40 % menor que un nivel de referencia, al menos un 50 % menor que un nivel de referencia, al menos un 60 % menor que un nivel de referencia, al menos un 70 % menor que un nivel de referencia, al menos un 80 % menor que un nivel de referencia, al menos un 90 % menor que un nivel de referencia, hasta e incluso un 100 % menor que un nivel de referencia (es decir, nivel ausente en comparación con una muestra de referencia).

Los términos "aumentado" o "aumento", como se usan en el presente documento, generalmente significan un aumento en una cantidad estadísticamente significativa; tal como un aumento estadísticamente significativo de al menos un 10 % en comparación con un nivel de referencia, incluyendo un aumento de al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 100 % o más, inclusive, incluyendo, por ejemplo al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces de aumento o mayor en comparación con un nivel de referencia, según se usa esta expresión en el presente documento.

El término "alto" como se usa en el presente documento generalmente significa mayor en una cantidad estadísticamente significativa con respecto a una referencia; tal como un valor estadísticamente significativo al menos un 10 % mayor que un nivel de referencia, por ejemplo, al menos un 20 % mayor, al menos un 30 % mayor, al menos un 40 % mayor, al menos un 50 % mayor, al menos un 60 % mayor, al menos un 70 % mayor, al menos un 80 % mayor, al menos un 90 % mayor, al menos un 100 % mayor, inclusive, tal como al menos 2 veces mayor, al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor o más, en comparación con un nivel de referencia.

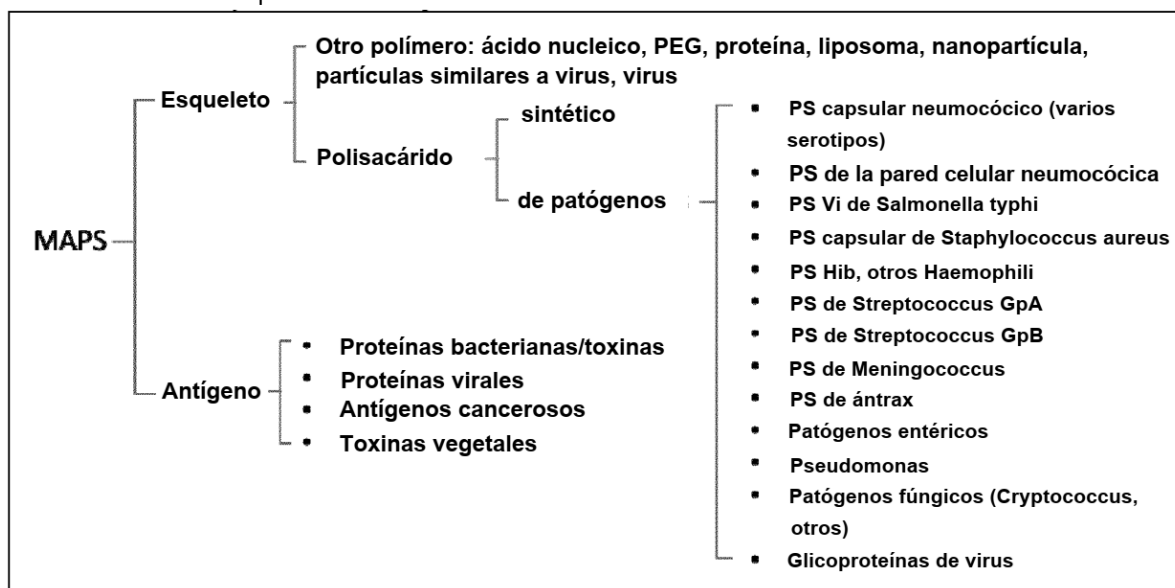
Tal como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" significa que también pueden estar presentes otros elementos además de los elementos definidos presentados. El uso de "que comprende" indica inclusión en lugar de limitación.

La expresión "que consiste en" se refiere a composiciones, métodos, y componentes respectivos de los mismos como se describe en el presente documento, que son exclusivos de cualquier elemento no mencionado en esa descripción.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a aquellos elementos requeridos para una divulgación dada. La expresión permite la presencia de elementos que no afectan materialmente a la o las características básicas y novedosas o funcionales de esa divulgación de la divulgación.

La presente divulgación proporciona una composición flexible y versátil que puede diseñarse y fabricarse para provocar un amplio espectro particular, o una variedad de dianas antigénicas. La Tabla 1 proporciona una guía de ejemplo simple para visualizar la flexibilidad de las divulgaciones de MAPS:

Tabla 1. Versatilidad de la plataforma de MAPS



Polímeros

Un componente de MAP consiste en un "esqueleto", normalmente un polímero. El polímero puede ser antigénico o no

antigénico. Puede estar constituido por una amplia variedad de sustancias, como se describe en el presente documento, con la salvedad de que el polímero sirve como un medio para presentar el o los antígenos asociados al sistema inmunitario de forma inmunogénica. En algunas divulgaciones, el polímero es un polímero sintético. En algunas divulgaciones, el polímero es un polímero natural, por ejemplo, un polisacárido derivado o purificado de células bacterianas. En algunas divulgaciones, el polisacárido se obtiene o se purifica a partir de células eucariotas, por ejemplo, hongos, células de insecto o células vegetales. En aún otras divulgaciones, el polímero se obtiene de células de mamífero, tales como células infectadas por virus o células cancerosas. En general, dichos polímeros son bien conocidos en la técnica y se incluyen para su uso en los métodos y composiciones como se divulga en el presente documento.

En algunas divulgaciones, un polímero es un polisacárido seleccionado de cualquiera de los siguientes, dextrano, polisacárido Vi de *Salmonella typhi*, polisacárido capsular neumocócico, polisacárido de la pared celular (CWPS) neumocócica, polisacárido meningocócico, polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b, o cualquier otro polisacárido de origen viral, procariota o eucariota.

En algunas divulgaciones, el polisacárido consiste en o comprende un resto de azúcar antigénico. Por ejemplo, en algunas divulgaciones, un polisacárido para su uso en los métodos y composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento es un polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. El polisacárido capsular Vi se ha desarrollado contra las infecciones entéricas bacterianas, tal como la fiebre tifoidea. Robbins *et al.*, 150 J. Infect. Dis. 436 (1984); Levine *et al.*, 7 Baillieres Clin. Gastroenterol. 501 (1993). Vi es un polímero del ácido α -1 \rightarrow 4-galacturónico con un N acetilo en la posición C-2 y O-acetilación variable en C-3. La virulencia de *S. typhi* se correlaciona con la expresión de esta molécula. Sharma *et al.*, 101 PNAS 17492 (2004). La vacuna de polisacárido Vi de *S. typhi* tiene varias ventajas: Los efectos secundarios son poco frecuentes y leves, una sola dosis produce inmunogenicidad y eficacia consistentes. El polisacárido Vi puede estandarizarse de manera fiable mediante métodos fisicoquímicos verificados para otras vacunas de polisacárido, Vi es estable a temperatura ambiente y puede administrarse simultáneamente con otras vacunas sin afectar a la inmunogenicidad y la tolerabilidad. Azze *et al.*, 21 Vaccine 2758 (2003).

Por lo tanto, el polisacárido Vi de *S. typhi* puede reticularse con una primera molécula de afinidad como se divulga en el presente documento, para unir al menos un antígeno al polisacárido. En algunas divulgaciones, el antígeno puede ser del mismo organismo o de otro, de modo que la composición inmunogénica resultante confiera al menos algún nivel de inmunidad contra un patógeno, o dos patógenos diferentes: si el antígeno confiere protección contra neumococos, una composición inmunogénica donde el armazón polimérico es un polisacárido Vi que puede generar una respuesta inmunogénica tanto contra *S. typhi* como contra neumococos. Otros ejemplos incluyen la combinación de azúcares de bacterias encapsuladas (tales como meningococo, *S. aureus*, neumococo, Hib, etc.) y antígenos de tuberculosis, para proporcionar una composición inmunogénica que genera una respuesta inmunitaria contra dos patógenos diferentes.

Otros restos de polisacáridos (PS) que pueden usarse en la presente divulgación como alternativa al dextrano, polisacáridos de la pared celular bacteriana (CWPS), etc., incluyen antígenos de hidratos de carbono de cánceres.

Además, con respecto a los polisacáridos neumocócicos, el polisacárido puede obtenerse de cualquiera de los más de 93 serotipos de neumococo que se han identificado hasta la fecha, por ejemplo, incluyendo pero sin limitación, los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Se pueden identificar e incluir serotipos adicionales en la presente composición inmunogénica como se describe en el presente documento. Puede incluirse más de un polisacárido neumocócico como el esqueleto polimérico de las presentes composiciones inmunogénicas o en una vacuna que comprende las presentes composiciones MAPS.

El polisacárido también puede obtenerse a partir de la divulgación, la composición inmunogénica comprende polisacáridos capsulares de *N. meningitidis* de al menos uno, dos, tres o cuatro de los serogrupos A, C, W, W135, o Y.

Una divulgación adicional comprende el Tipo 5, Tipo 8 o cualquiera de los polisacáridos u oligosacáridos de *Staphylococcus aureus*.

En algunas divulgaciones, el polímero es un polímero quimérico que comprende más de un tipo de polímero. Por ejemplo, un polímero de la composición inmunogénica como se divulga en el presente documento puede comprender una parte del polímero A y la parte restante del polímero B. No hay límite para la cantidad de diferentes tipos de polímeros que se pueden usar en un único esqueleto MAPS. En algunas divulgaciones, donde el polímero es un polímero ramificado, el polímero de cadena puede ser el polímero A y las ramificaciones pueden ser al menos 1 o al menos 2 o al menos 3 o más polímeros diferentes.

En algunas divulgaciones, el polímero es un polímero ramificado. En algunas divulgaciones, el polímero es un polímero de cadena sencilla.

En algunas divulgaciones, el polímero es un polisacárido que comprende al menos 10 unidades repetidas de hidratos de carbono, o al menos 20, o al menos 50, o al menos 75, o al menos 100, o al menos 150, o al menos 200, o al

menos 250, o al menos 300, o al menos 350, o al menos 400, o al menos 450, o al menos 500, o más de 500 unidades repetidas, inclusive.

5 En un aspecto de la divulgación, el polisacárido (PS) puede tener una masa molecular de <500 kDa o >500 kDa. En otro aspecto de la divulgación, el PS tiene una masa molecular de <70 kDa.

10 En algunas divulgaciones, un polímero es un polímero de peso molecular elevado, por ejemplo, un polímero puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 425-500 kDa, inclusive, por ejemplo, al menos 300 kDa, o al menos 350 kDa, o al menos 400 kDa, o al menos 425 kDa, o al menos 450 kDa, o al menos 500 kDa o más de 500 kDa, inclusive, pero normalmente menos de 500 kDa.

15 En algunas divulgaciones, un polímero puede ser un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo, un polímero puede tener un peso molecular promedio de entre aproximadamente 60 kDa y aproximadamente 90 kDa, por ejemplo, al menos 50 kDa, o al menos 60 kDa, o al menos 70 kDa, o al menos 80 kDa, o al menos 90 kDa, o al menos 100 kDa o más de 100 kDa, inclusive, pero generalmente menos de aproximadamente 120 kDa.

20 En algunas divulgaciones, el polímero se recoge y purifica a partir de una fuente natural; y en otras divulgaciones, el polímero es sintético. Los métodos para producir polímeros sintéticos, incluidos los polisacáridos sintéticos, son conocidos por los expertos en la materia y están incluidos en las composiciones y métodos como se divulgan en el presente documento.

En la Tabla 2 se ilustran solo algunos de los polímeros de polisacáridos que pueden servir como esqueleto para uno o más antígenos o tipos de antígenos:

25 Tabla 2. Ejemplo de esqueleto de MAPS de polímero de polisacárido y antígenos de ejemplo asociados

Polisacárido		Antígenos proteicos	
		Número de antígenos	Orígenes del antígeno
Dextrano	D90 (60-90KD)	dos	neumococo
	D150 (150 KD)	tres	neumococo
	D270 (270 KD)	tres	neumococo
	D500 (425-575 KD)	dos; tres; seis	neumococo
Polisacárido capsular neumocócico	Serotipo 1	uno, dos, tres, cinco	neumococo, tuberculosis, estafilococo
	Serotipo 3	cinco	neumococo, tuberculosis
	Serotipo 5	uno; dos; tres; cinco	neumococo, tuberculosis
	Serotipo 6B	dos	neumococo
	Serotipo 7	tres	neumococo
	Serotipo 14	uno; dos; tres; cinco	neumococo, tuberculosis
	Serotipo 19	tres	neumococo
Polisacárido de la pared celular neumocócica		cinco	neumococo
Polisacárido Vi de <i>S. typhi</i>		cinco	neumococo

30 Los polímeros adicionales que se pueden usar en las composiciones de MAPS inmunogénicas descritas en el presente documento incluyen polímeros a base de polietilenglicol, polímeros de poli(orto éster), vehículos de poliacrilo, PLGA, polietilenimina (PEI), dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), polímeros de β-amino éster, polifosfoéster (PPE), liposomas, polimerosomas, ácidos nucleicos, oligonucleótidos fosforotioados, quitosano, seda, micelas poliméricas, polímeros proteicos, partículas de virus, partículas similares a virus (VLP) u otras micropartículas. Véase, por ejemplo, El-Sayed *et al.*, Smart Polymer Carriers for Enhanced Intracellular Delivery of Therapeutic Molecules, 5 Exp. Op. Biol. Therapy, 23 (2005). Los polímeros biocompatibles desarrollados para la administración de ácidos nucleicos pueden adaptarse para su uso como esqueleto en el presente documento. Véase, por ejemplo, BIOCOPATIBLE POL. NUCL. ACID. DELIV. (Domb *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, 2011).

35 Por ejemplo, Las VLP se parecen a virus, pero no son infecciosas porque no contienen ningún material genético viral. La expresión, incluida la expresión recombinante, de proteínas estructurales virales, tal como los componentes de la envoltura o la cápside, puede dar como resultado el autoensamblaje de las VLP. Las VLP se han producido a partir

de componentes de una amplia variedad de familias de virus que incluyen Parvoviridae (por ejemplo, virus adenoasociados), Retroviridae (por ejemplo, VIH), y Flaviviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis B o C). Las VLP se pueden producir en una variedad de sistemas de cultivo celular que incluyen líneas celulares de mamíferos, líneas celulares de insectos, levadura y células vegetales. Las VLP recombinantes son particularmente ventajosas porque el componente viral puede fusionarse con antígenos recombinantes como se describe en el presente documento.

Antígenos

Las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento pueden comprender cualquier antígeno que provoque una respuesta inmunitaria en un sujeto. En algunas divulgaciones, al menos uno o más antígenos están asociados con el polímero de la composición. En algunas divulgaciones, al menos 2, o al menos 3, o al menos 5, o al menos 10, o al menos 15, o al menos 20, o al menos 50, o al menos 100, o más de 100 antígenos pueden estar asociados con el polímero como se divulga en el presente documento. En algunas divulgaciones, cuando la composición inmunogénica comprende más de un antígeno, los antígenos pueden ser el mismo antígeno o puede ser una variedad de diferentes antígenos asociados con el polímero. En algunas divulgaciones, cuando la composición inmunogénica comprende más de un antígeno, los antígenos pueden ser antígenos del mismo patógeno o de diferentes patógenos, o como alternativa, pueden ser diferentes antígenos del mismo patógeno o antígenos similares de diferentes serotipos de patógenos.

Un antígeno para su uso en las composiciones y métodos inmunogénicos descritos en el presente documento puede ser cualquier antígeno, incluyendo, pero sin limitarse a péptidos patogénicos, toxinas, toxoides, subunidades de los mismos o combinaciones de los mismos (por ejemplo, toxina del cólera, toxoide tetánico).

En algunas divulgaciones, un antígeno, que puede fusionarse con la molécula de afinidad complementaria, puede ser cualquier antígeno asociado con una enfermedad infecciosa, o cáncer o enfermedad inmunitaria. En algunas divulgaciones, un antígeno puede ser un antígeno expresado por cualquiera de una variedad de agentes infecciosos, incluyendo virus, bacteria, hongo o parásito.

En algunas divulgaciones, un antígeno deriva (por ejemplo, se obtiene) de un organismo patógeno. En algunas divulgaciones, el antígeno es un antígeno de cáncer o tumoral, por ejemplo, un antígeno derivado de una célula tumoral o cancerosa.

En algunas divulgaciones, un antígeno derivado de un organismo patógeno es un antígeno asociado con una enfermedad infecciosa; puede derivarse de una variedad de agentes infecciosos, incluyendo virus, bacteria, hongo o parásito.

En algunas divulgaciones, un antígeno diana es cualquier antígeno asociado con una patología, por ejemplo, una enfermedad o patógeno infeccioso, o cáncer o una enfermedad inmunitaria tal como una enfermedad autoinmunitaria. En algunas divulgaciones, un antígeno puede ser expresado por cualquiera de una variedad de agentes infecciosos, incluyendo virus, bacteria, hongo o parásito. Un antígeno para su uso en los métodos y composiciones como se divulgan en el presente documento puede incluir también, por ejemplo, péptidos patogénicos, toxinas, toxoides, subunidades de los mismos o combinaciones de los mismos (por ejemplo, toxina del cólera, toxoide tetánico).

Los ejemplos no limitantes de virus infecciosos incluyen: *Retroviridae*; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); *Calciviridae* (tal como cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de la paragripe, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bungaviridae* (por ejemplo, Virus Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus de Nairo); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (Virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (VHS) 1 y VHS-2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus (CMV), virus de la enfermedad de Marek y herpesvirus); *Poxviridae* (virus variola, virus vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (tal como virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1 = transmisión interna; clase 2 = transmisión por vía parenteral (es decir, hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados y astrovirus). Las composiciones y métodos descritos en el presente documento se contemplan para su uso en el tratamiento de infecciones con estos agentes virales.

Ejemplos de infecciones fúngicas que pueden tratarse mediante la inclusión de antígenos en las divulgaciones anteriores incluyen aspergilosis; aftas (causadas por *Candida albicans*); criptococcosis (causada por *Cryptococcus*); e histoplasmosis. Por lo tanto, los ejemplos de enfermedades fúngicas infecciosas incluyen, pero no se limitan a, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Los componentes de estos organismos pueden incluirse como antígenos en los MAPS

descritos en el presente documento.

En un aspecto de la divulgación, un antígeno deriva de un microbio infeccioso tal como *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Enterococci* sp., *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella*, *Haemophilus*, tipificable o no tipificable, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Clostridia*, *Bacteroides*, *Chlamydiaceae*, *Vibrio cholera*, *Mycoplasma*, *Treponemes*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (tal como *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*, *M. leprae*), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (Streptococcus Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps. anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp., patógeno, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leptospira* sps., *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, y *Actinomyces israelii*. Las composiciones y métodos descritos en el presente documento se contemplan para su uso en el tratamiento o prevención de infecciones con estos agentes virales.

Los patógenos parásitos adicionales de los que se pueden derivar antígenos incluyen, por ejemplo: *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* sp., *Toxoplasma gondii*, *Rickettsia*, y *Helminths*.

En otro aspecto de la divulgación, un antígeno es una proteína PsaA neumocócica truncada, serina/treonina proteína quinasa (StkP) neumocócica asociada a toxoide neumolisina, unidad de repetición de serina/treonina proteína quinasa neumocócica (StkPR), proteína PcsBcal neumocócica, hemolisina alfa estafilocócica, proteína mtb ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*, antígeno del núcleo de la pared celular de *M. tuberculosis*, Polipéptidos de *Chlamydia* CT144, CT242 o CT812 o fragmentos de estos, Subunidad B de la ADN girasa de *Chlamydia*, síntesis de sulfito/bifosfato fosfatasa de *Chlamydia*, proteína de división celular FtsY de *Chlamydia*, metionil-ARNt sintetasa de *Chlamydia*, ADN helicasa (uvrD) de *Chlamydia*, ATP sintasa subunidad I (atpI) de *Chlamydia*, o hidrolasa dependiente de metal de *Chlamydia*.

Algunas divulgaciones proporcionan una composición inmunogénica dirigida al patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (TB), un parásito bacteriano intracelular. Un ejemplo de un antígeno de TB es TbH9 (también conocido como Mtb 39A). Otros antígenos de TB incluyen, pero no se limitan a, DPV (también conocida como Mtb8.4), 381, Mtb41, Mtb40, Mtb32A, Mtb64, Mtb83, Mtb9.9A, Mtb9.8, Mtb16, Mtb72f, Mtb59f, Mtb88f, Mtb71f, Mtb46f y Mtb31f, donde "f" indica que es una fusión o dos o más proteínas.

Como se ha indicado anteriormente, un antígeno se puede obtener de una especie de *Chlamydia* para su uso en las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación. Las *Chlamydiaceae* (que consisten en *Chlamydiae* y *Chlamydophila*), son bacterias gramnegativas intracelulares. Las infecciones por *Chlamydia trachomatis* se cuentan entre las infecciones bacterianas de transmisión sexual más prevalentes, y cada año se producen quizás 89 millones de nuevos casos de infección por *Chlamydia* genital. La *Chlamydia* de la presente divulgación incluye, por ejemplo, *C. trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *C. muridarum*, *C. suis*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila pecorum*, y *C. pneumoniae*. Los modelos animales de infección clamidial han establecido que los linfocitos T desempeñan un papel fundamental tanto en la eliminación de la infección inicial como en la protección contra la reinfección de hospedadores susceptibles. Por tanto, las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento se pueden utilizar para proporcionar un valor particular provocando respuestas inmunitarias celulares contra la infección clamidial.

Más específicamente, Los antígenos de *Chlamydia* útiles en la presente divulgación incluyen la subunidad B de la ADN girasa, síntesis de sulfito/bifosfato fosfatasa, proteína de división celular FtsY, metionil-ARNt sintetasa, ADN helicasa (uvrD); subunidad I de la ATP sintasa (atpI) o una hidrolasa dependiente de metal (Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20090028891). Otros antígenos adicionales de *Chlamydia trachomatis* incluyen el polipéptido CT144, un péptido que tiene los restos de aminoácidos 67-86 de CT144, un péptido que tiene los restos de aminoácidos 77-96 de CT144, La proteína CT242, un péptido que tiene los restos de aminoácidos 109-117 de CT242, un péptido que tiene los restos de aminoácidos 112-120 del polipéptido CT242, proteína CT812 (del gen *pmpD*), un péptido que tiene los restos de aminoácidos 103-111 de la proteína CT812; y varios otros péptidos antigénicos de *C. trachomatis*: NVTQDLTSSTAKLECTQDLI (SEQ ID NO:2), AKLECTQDLIAQGKLVITNP (SEQ ID NO:3), SNLKRMQKI (SEQ ID NO:4), AALYSTEDL (SEQ ID NO:5), FQEKDADTL (SEQ ID NO:6), QSVNELVYV (SEQ ID NO:7), LEFASCSSL (SEQ ID NO:8), SQAEGQYRL (SEQ ID NO:9), GQSVNELVY (SEQ ID NO: 10), y QAVLLLDQI (SEQ ID NO:11). Véase el documento WO 2009/020553. Adicionalmente, los antígenos de *Chlamydia pneumoniae* que incluyen homólogos de los polipéptidos anteriores (véase la patente de Estados Unidos n.º 6.919.187) se pueden usar como antígenos en las composiciones y métodos inmunogénicos como se divulgan en el presente documento.

Los antígenos fúngicos pueden obtenerse de especies de *Candida* y otra levadura; u otros hongos (aspergillus, otros hongos ambientales). En cuanto a otros parásitos, la malaria, así como los gusanos y las amebas, pueden proporcionar el antígeno antigénico para su uso en las composiciones y métodos inmunogénicos como se divulga en el presente documento.

En algunas divulgaciones, cuando el antígeno va a generar un inmunógeno antigripal, las glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) son generalmente los antígenos de elección. Tanto el polipéptido de nucleoproteína (NP) como de matriz (M) son proteínas virales internas y, por lo tanto, no se suelen considerar en el diseño de vacunas para la inmunidad basada en anticuerpos. Las vacunas contra la gripe se usan de manera rutinaria en humanos e incluyen vacunas derivadas del virus de la gripe completo inactivado, el virus de la gripe atenuado vivo, o los materiales purificados o inactivados de cepas virales. Por ejemplo, se puede fabricar una vacuna tradicional contra la gripe utilizando tres cepas potencialmente peligrosas del virus de la gripe. Estas cepas habitualmente se cultivan en huevos de gallina fertilizados, lo que requiere un procesamiento extenso que incluye la inoculación e incubación de huevos, la recogida de huevos, la purificación e inactivación del virus, el procesamiento y la combinación del virus o los componentes virales en la formulación final de la vacuna y el llenado aséptico en los recipientes apropiados. Normalmente, este ciclo de producción a base de huevos tarda más de 70 semanas. En caso de una gran epidemia de gripe, la disponibilidad de una vacuna potente y segura es una preocupación importante. Adicionalmente, existen riesgos asociados con las impurezas en los huevos, tales como antibióticos y contaminantes, que afectan negativamente a la esterilidad de la vacuna. Además, las vacunas contra la gripe derivadas del huevo están contraindicadas para las personas con alergias graves a las proteínas del huevo y las personas con antecedentes del síndrome de Guillain-Barré. La presente divulgación proporciona una alternativa a las vacunas contra la gripe basadas en huevo, no solo evita las secuelas asociadas con los huevos, sino que también proporciona una plataforma para el uso de múltiples antígenos de la gripe en una plataforma muy controlada.

En algunas divulgaciones, un antígeno para su uso en las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento también puede incluir los usados en la guerra biológica, tales como ricina, que puede provocar una respuesta CMI.

Adicionalmente, la presente divulgación también proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden antígenos que provocan una respuesta inmunitaria contra el cáncer. En estos conjugados, un antígeno es un antígeno expresado por un cáncer o tumor, o derivado de un tumor. En algunas divulgaciones, dichos antígenos se denominan en el presente documento "antígeno canceroso" y son normalmente una proteína que se expresa predominantemente en las células cancerosas, de manera que el conjugado provoca tanto una potente inmunidad humoral como una potente inmunidad celular a esta proteína. Se ha identificado un gran número de antígenos asociados al cáncer, varios de los cuales se están utilizando ahora para fabricar vacunas experimentales para el tratamiento del cáncer y, por tanto, son adecuados para su uso en las presentes divulgaciones. Los antígenos asociados con más de un tipo de cáncer incluyen el antígeno carcinoembrionario (CEA); antígenos de cáncer/testículos, tal como NY-ESO-1; Mucina-1 (MUC1) tal como Sialil Tn (STn); gangliósidos, tales como GM3 y GD2; proteína p53; y la proteína HER2/neu (también conocida como ERBB2). Los antígenos exclusivos de un tipo específico de cáncer incluyen una forma mutante del receptor del factor de crecimiento epidérmico, denominado EGFRvIII; antígenos de diferenciación de melanocitos/melanoma, tales como tirosinasa, MART1, gp100, el grupo de cáncer de testículo relacionado con el linaje (MAGE) y antígenos relacionados con la tirosinasa; antígeno de específico de la próstata; antígenos asociados a leucemia (LAA), tales como la proteína de fusión BCR-ABL, proteína tumoral de Wilms y proteinasa 3; y anticuerpos de idiotipo (Id). Véase, por ejemplo, Mitchell, 3 Curr. Opin. Investig. Drugs 150 (2002); Dao & Scheinberg, 21 Best Pract. Res. Clin. Haematol. 391 (2008).

Otro enfoque para generar una respuesta inmunitaria contra el cáncer emplea antígenos de microbios que causan o contribuyen al desarrollo del cáncer. Estas vacunas se han utilizado contra cánceres, incluido el carcinoma hepatocelular (virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, *Opisthorchis viverrin*), linfoma y carcinoma nasofaríngeo (virus de Epstein Barr), cáncer colorrectal, cáncer de estómago (*Helicobacter pylori*), cáncer de vejiga (*Schistosoma hematobium*), leucemia de linfocitos T (virus linfotrópico de linfocitos T humanos), cáncer de cuello uterino (virus del papiloma humano) y otros. Hasta la fecha, se han realizado ensayos clínicos de vacunas dirigidas contra el cáncer de vejiga, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de riñón, melanoma, mieloma múltiple, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata y tumores sólidos. Véase Pardoll *et al.*, ABELOFF'S CLIN. ONCOL. (4.^a ed., Churchill Livingstone, Philadelphia 2008); Sioud, 360 Methods Mol. Bio. 277 (2007); Pazdur *et al.*, 30 J. Infusion Nursing 30(3): 173 (2007); Parmiani *et al.*, 178 J. Immunol. 1975 (2007); Lollini *et al.*, 24 Trends Immunol. 62 (2003); Schlom *et al.*, 13 Clin. Cancer Res. 3776 (2007); Banchereau *et al.*, 392 Nature 245 (1998); Finn, 358 New Engl. J. Med. 2704 (2008); Curigliano *et al.*, 7 Exp. Rev. Anticancer Ther. 1225 (2007). El virus de la enfermedad de Marek, un herpesvirus que causa tumores en las aves de corral, se ha utilizado durante mucho tiempo en una vacuna. Por lo tanto, las presentes divulgaciones abarcan composiciones inmunogénicas contra el cáncer tanto preventivas como profilácticas y vacunas de tratamiento/terapéuticas.

Las enfermedades proliferativas y los cánceres contemplados incluyen cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoquístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide angiogénica, alopecia, sarcoma alveolar de las partes blandas, cáncer de ano, angiosarcoma, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres óseos, cáncer de intestino, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores carcinoides, cáncer de cuello uterino, tumores cerebrales infantiles, cánceres infantiles, leucemia infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer del conducto

biliar extrahepático, cáncer ocular, incluyendo, por ejemplo, melanoma ocular y retinoblastoma, cáncer de las trompas de Falopio, anemia de Fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor carcinoide gastrointestinal, cánceres urogenitales, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, enfermedad de Hodgkin, cáncer de cuello uterino relacionado con el papilomavirus humano, mola hidatiforme, cáncer de la hipofaringe, cáncer de células de islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leiomiomasarcoma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de Nijmegen, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de la cavidad oral, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, cáncer de ovario por ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer paratiroideo, cáncer de las glándulas parótidas, cáncer de pene, tumores neuroectodérmicos periféricos, cáncer de la hipófisis, policitemia vera, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón microcítico (CPM), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales (vejiga), cáncer de células transicionales (pelvis renal/uréter), cáncer trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer del sistema urinario, sarcoma de útero, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms.

En algunas divulgaciones, un antígeno para su uso en las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento también puede incluir antígeno de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, también pueden ser "auto-antígenos". Las enfermedades autoinmunitarias contempladas para el diagnóstico de acuerdo con los ensayos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison, anemia aplásica, esclerosis múltiple, enfermedades autoinmunitarias de las glándulas suprarrenales, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, miocardiopatía, esprúe celiaco-dermatitis, síndrome de fatiga crónica, síndrome desmielinizante inflamatorio crónico (CFIDS), polineuropatía inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de las aglutininas frías, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, enfermedad de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes insulino dependiente (tipo I), liquen plano, lupus, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, miastenia grave, miocarditis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, síndrome de Wegener, vasculitis y vitiligo. En general, es importante evaluar la capacidad de respuesta CMI potencial o real en sujetos que tienen o se sospecha que tienen o son susceptibles a una enfermedad autoinmunitaria.

En algunas divulgaciones, un antígeno para su uso en las composiciones inmunogénicas como se divulga en el presente documento puede ser un antígeno que está asociado con una enfermedad o afección inflamatoria. Ejemplos de enfermedades inflamatorias en las que los antígenos pueden ser útiles incluyen, pero no se limitan a, angina, artritis, neumonía por aspiración, empiema, gastroenteritis, enterocolitis necrosante, enfermedad inflamatoria pélvica, faringitis, pleuresía, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, entre otros.

En algunas divulgaciones, un antígeno puede ser un antígeno intacto (es decir, un antígeno entero o completo), o una parte funcional de un antígeno que comprende más de un epítipo. En algunas divulgaciones, un antígeno es una porción funcional peptídica de un antígeno. Por "intacto" en este contexto se entiende que el antígeno es el antígeno de longitud completa, ya que ese polipéptido de antígeno se encuentra en la naturaleza. Esto contrasta directamente con la administración de solo una pequeña parte o péptido del antígeno. La administración de un antígeno intacto a una célula permite o facilita la provocación de una respuesta inmunitaria a una gama completa de epítopos del antígeno intacto, en lugar de solo un único o unos pocos epítopos peptídicos seleccionados. Por consiguiente, los métodos y las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento abarcan antígenos intactos asociados con el polímero para una respuesta inmunitaria más sensible y tienen mayor especificidad en comparación con el uso de un antígeno basado en un péptido de un solo epítipo.

Como alternativa, en algunas divulgaciones, un antígeno intacto se puede dividir en muchas partes, dependiendo del tamaño del antígeno inicial. Normalmente, cuando el antígeno completo es un polipéptido multimérico, la proteína completa se puede dividir en subunidades y/o dominios donde cada subunidad o dominio individual del antígeno se puede asociar con el polímero de acuerdo con los métodos como se divulgan en el presente documento. Como alternativa, en algunas divulgaciones, un antígeno intacto se puede dividir en fragmentos o partes funcionales, del antígeno completo, por ejemplo, al menos dos, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7,

o al menos 8, o al menos 9, o al menos 10, o al menos 11, o al menos 12, o al menos 13, o al menos 15, o al menos 20, o al menos 25, o más de 25 partes (por ejemplo, piezas o fragmentos), inclusive, y donde cada fragmento funcional individual del antígeno puede asociarse con el polímero de acuerdo con los métodos que se divulgan en el presente documento.

5 La fragmentación o división de un polipéptido de antígeno de longitud completa puede ser una división igual del polipéptido de antígeno de longitud completa o, como alternativa, en algunas divulgaciones, la fragmentación es asimétrica o desigual. Como ejemplo no limitante, cuando un antígeno se divide en dos fragmentos superpuestos, un antígeno se puede dividir en fragmentos de aproximadamente el mismo (igual) tamaño, o como alternativa un fragmento puede ser aproximadamente el 45 % del antígeno total y el otro fragmento puede ser aproximadamente del 10 65 %. Como ejemplos no limitantes adicionales, un antígeno completo se puede dividir en una combinación de fragmentos de diferentes tamaños, por ejemplo, cuando un antígeno se divide en dos fragmentos, los fragmentos se pueden dividir en aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 70 %, o aproximadamente el 45 % y aproximadamente el 15 85 %; o aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 75 %; o aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 85 %, inclusive, del antígeno completo. Cualquier combinación de fragmentos superpuestos de un antígeno completo de longitud completa se incluye para su uso en la generación de un panel de polipéptidos superpuestos de un antígeno. Como ejemplo ilustrativo solamente, cuando un antígeno se divide en 5 partes, las partes se pueden dividir por igual (es decir, cada fragmento superpuesto es aproximadamente del 21 % al 25 % de la longitud total si el antígeno) o de manera desigual (es decir, un antígeno puede dividirse en los siguientes cinco 20 fragmentos superpuestos; el fragmento 1 es aproximadamente 25 %, el fragmento 2 es aproximadamente 5 %, el fragmento 3 es aproximadamente 35 %, el fragmento 4 es aproximadamente 10 % y el fragmento 5 es aproximadamente 25 % del tamaño del antígeno de longitud completa, siempre que cada fragmento se superponga con al menos otro fragmento).

25 Normalmente, un panel de partes de antígeno puede cubrir sustancialmente toda la longitud del polipéptido antigénico completo (o intacto). Por consiguiente, en algunas divulgaciones, una composición inmunogénica comprende un polímero con muchos fragmentos diferentes y/o superpuestos del mismo antígeno intacto. Los fragmentos de proteína superpuestos de un antígeno se pueden producir de forma mucho más rápida y económica, y con mayor estabilidad en comparación con el uso de antígenos peptídicos solos. Además en algunas divulgaciones, se prefieren los 30 antígenos que son polipéptidos más grandes que los péptidos simples ya que la conformación es importante para el reconocimiento de epítomos, y los polipéptidos o fragmentos de antígenos más grandes proporcionarán un beneficio sobre los fragmentos de péptidos.

Un experto en la materia puede dividir un antígeno completo en proteínas superpuestas de un antígeno para crear un panel de polipéptidos del antígeno. Solo a modo de ejemplo limitativo únicamente, Solo a modo de ejemplo ilustrativo, el antígeno TB1 específico de TB (CFP también conocido como cultivo filtrado-10 o CFP-10) se puede dividir en, por ejemplo, al menos diecisiete partes para generar un panel de diecisiete polipéptidos diferentes, cada uno de los cuales comprende un fragmento de antígeno TB1 (CFP) específico de TB diferente pero superpuesto. La proteína de filtrado de cultivo (CFP-10) (Genbank AAC83445) es un fragmento de proteína de 10 kDa y 100 restos de aminoácidos de *M. tuberculosis*. También se conoce como proteína homóloga del antígeno L45 (LHP). 40

Un antígeno diana para usar en los métodos y composiciones descritos en el presente documento puede expresarse por medios recombinantes y puede incluir opcionalmente una etiqueta de afinidad o epítomo para facilitar la purificación, métodos que son bien conocidos en la técnica. Puede usarse la síntesis química de un oligopéptido, ya sea libre o 45 conjugado con proteínas vehículo, para obtener el antígeno de la divulgación. Los oligopéptidos se consideran un tipo de polipéptido. Un antígeno puede expresarse como una fusión con una molécula de afinidad complementaria, por ejemplo, pero sin limitarse a, rizavidina o un derivado o fragmento funcional de la misma. Como alternativa, también es posible preparar el antígeno diana y luego conjugarlo con una molécula de afinidad complementaria, por ejemplo, pero sin limitarse a, rizavidina o un derivado o fragmento funcional de la misma. 50

Los polipéptidos también pueden sintetizarse como estructuras ramificadas, tales como las divulgadas en las patentes de Estados Unidos n.º 5.229.490 y n.º 5.390.111. Los polipéptidos antigénicos incluyen, por ejemplo, epítomos de linfocitos B y linfocitos T sintéticos o recombinantes, epítomos de linfocitos T universales y epítomos de linfocitos T mixtos de un organismo o enfermedad y epítomos de linfocitos B de otro. 55

Un antígeno que se puede obtener por medios recombinantes o síntesis química de polipéptidos, así como un antígeno obtenido de fuentes naturales o extractos, se puede purificar mediante las características físicas y químicas del antígeno, tal como por fraccionamiento o cromatografía. Estas técnicas son bien conocidas en la técnica.

60 En algunas divulgaciones, un antígeno puede solubilizarse en agua, un disolvente tal como metanol o un tampón. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, solución salina normal (NaCl 150 mM en agua) y tampón Tris. El antígeno no soluble en tampón neutro puede solubilizarse en ácido acético 10 mM y luego diluirse al volumen deseado con un tampón neutro como PBS. En el caso de antígeno soluble solo a pH ácido, se puede usar acetato-PBS a pH ácido como diluyente después de la solubilización en ácido acético diluido. El glicerol puede ser un disolvente no acuoso adecuado para usar las 65 composiciones, métodos y kits descritos en el presente documento.

Normalmente, cuando se diseña una vacuna de proteína contra un patógeno, una proteína extracelular o una expuesta al entorno en un virus suele ser la candidata ideal como componente antigénico de la vacuna. Los anticuerpos generados contra esa proteína extracelular se convierten en la primera línea de defensa contra el patógeno durante la infección. Los anticuerpos se unen a la proteína del patógeno para facilitar la opsonización del anticuerpo y marcar el patógeno para su ingestión y destrucción por un fagocito tal como un macrófago. La opsonización de anticuerpos también puede destruir al patógeno por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. El anticuerpo desencadena la liberación de productos de lisis de células tales como monocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos citolíticos naturales.

En algunas divulgaciones, los antígenos para su uso en las composiciones como se divulgan en el presente documento, todas las proteínas de tipo silvestre, como en los restos de aminoácidos, tienen las secuencias que se encuentran en virus de origen natural y no se han alterado por condiciones de crecimiento selectivo o métodos biológicos moleculares.

En una divulgación, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden comprender antígenos que son proteínas glicosiladas. En otras palabras, cada antígeno de interés puede ser una proteína glicosilada. En una divulgación de las composiciones inmunogénicas como se describe en el presente documento, los antígenos o polipéptidos de fusión de antígeno están O-glicosilados. En otra divulgación de las composiciones inmunogénicas como se describe en el presente documento, antígenos o polipéptidos de fusión de antígeno están N-glicosilados. En otra divulgación más de las composiciones inmunogénicas como se describe en el presente documento, antígenos o fusión de antígeno están glicosilados tanto O-glicosilados como N-glicosilados. En otras divulgaciones, son posibles otros tipos de glicosilaciones, por ejemplo, C-manosilación. La glicosilación de las proteínas se produce principalmente en células eucariotas. La N-glicosilación es importante para el plegamiento de algunas proteínas eucariotas, proporcionando un mecanismo de modificación cotraduccional y postraduccional que modula la estructura y función de la membrana y las proteínas secretadas. La glicosilación es el proceso enzimático que une los sacáridos para producir glicanos y los une a proteínas y lípidos. En la N-glicosilación, los glicanos se unen al nitrógeno amídico de la cadena lateral de la asparagina durante la traducción de la proteína. Los tres sacáridos principales que forman glicanos son las moléculas de glucosa, manosa y N-acetilglucosamina. El consenso de N-glicosilación es AsnXaa-Ser/Thr, donde Xaa puede ser cualquiera de los aminoácidos conocidos. La O-glicosilación se produce en una etapa posterior durante el procesamiento de proteínas, probablemente en el aparato de Golgi. En la O-glicosilación, se añade N-acetil-galactosamina, O-fucosa, O-glucosa y/o N-acetilglucosamina a los restos de serina o treonina. Un experto en la materia puede usar software bioinformático tal como NetNGlyc 1.0 y software de predicción NetOGlyc de la Universidad Técnica de Dinamarca para encontrar los sitios de N- y O-glicosilación en un polipéptido en la presente divulgación. El servidor NetNGlyc predice los sitios de N-glicosilación en proteínas que utilizan redes neuronales artificiales que examinan el contexto de secuencia de los sequeones Asn-Xaa-Ser/Thr. El software de predicción NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 3.1 se puede obtener en el sitio web EXPASY. En una divulgación, la N-glicosilación se produce en el polipéptido de antígeno diana del polipéptido de fusión descrito en el presente documento.

Pares de moléculas de afinidad:

Como se divulga en el presente documento, en algunas divulgaciones, un antígeno está conectado a un polímero a través de pares de afinidad complementarios. Esta conexión del antígeno al polímero está mediada por la conexión del polímero a una primera molécula de afinidad, que asocia una segunda molécula de afinidad (por ejemplo, complementaria), que está unida al antígeno. Un ejemplo de par de afinidad complementaria es biotina/proteína de unión a biotina.

Los ejemplos ilustrativos de pares de afinidad complementarios de afinidad incluyen, pero sin limitación, proteínas de unión a biotina o proteínas de tipo avidina que se unen a biotina. Por ejemplo, cuando la primera molécula de unión por afinidad es biotina (que se asocia con el polímero), la molécula de afinidad complementaria puede ser una proteína de unión a biotina o una proteína similar a la avidina o un derivado de la misma, por ejemplo, pero sin limitación, avidina, rizavidina, o estreptavidina o variantes, derivados o partes funcionales de la misma.

En algunas divulgaciones, la primera molécula de unión por afinidad es biotina, un derivado de biotina o un imitador de biotina, por ejemplo, pero sin limitación, amina-PEG3-biotina (((+)-biotinilación-3-6,9-trixaundecanodiamina) o un derivado o fragmento funcional de la misma. Un imitador de biotina específico tiene un motivo peptídico específico que contiene la secuencia de DX_aAX_bPX_c (SEQ ID NO: 12), o CDX_aAX_bPX_cCG (SEQ ID NO: 13), donde X_a es R o L, X_b es S o T, y X_c es Y o W. Estos motivos pueden unir avidina y neutravidina, pero no estreptavidina. Véase, por ejemplo, Gaj *et al.*, 56 Prot. Express. Purif. 54 (2006).

El enlace de la primera molécula de afinidad al polímero y la molécula de afinidad complementaria al antígeno puede ser un enlace no covalente o un mecanismo químico, por ejemplo, unión covalente, unión por afinidad, intercalación, enlace coordinado y formación de complejos. La unión covalente proporciona una unión muy estable y es particularmente adecuada para las presentes divulgaciones. La unión covalente se puede lograr mediante la condensación directa de las cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas puente externas.

Por ejemplo, en algunas divulgaciones, un antígeno puede unirse de forma no covalente a uno de los pares en un par de fijación complementario. En divulgaciones alternativas, un antígeno puede unirse o fusionarse covalentemente a uno de los pares en un par de fijación complementario. Los métodos para la generación de proteínas de fusión son bien conocidos en la técnica y se describen en el presente documento.

En otras divulgaciones, una primera molécula de unión por afinidad se une al polímero mediante un enlace no covalente o mediante un enlace covalente. En algunas divulgaciones, se usa un reactivo de reticulación para unir covalentemente la primera molécula de unión por afinidad al polímero como se divulga en el presente documento.

En algunas divulgaciones, la primera molécula de unión por afinidad se asocia con la molécula de afinidad complementaria mediante asociación de enlaces no covalentes como se conoce en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, interacción electrostática, enlace de hidrógeno, interacción hidrófoba (es decir, fuerzas de van der Waals), interacciones hidrófilas y otras interacciones no covalentes. También se contemplan otras interacciones de orden superior con restos intermedios.

En algunas divulgaciones, la molécula de afinidad complementaria es un polipéptido relacionado con la avidina. En divulgaciones específicas, la molécula de afinidad complementaria es rizavidina, tal como rizavidina recombinante. En particular, la rizavidina recombinante es una rizavidina modificada que se puede expresar en *E. coli* con un alto rendimiento. El rendimiento típico es >30 mg por litro de cultivo de *E. coli*. La rizavidina tiene una menor homología de secuencia con la avidina de huevo (22,4 % de identidad de secuencia y 35,0 % de similitud) en comparación con otras proteínas similares a la avidina. El uso de la rizavidina modificada reduce el riesgo de que el MAPS induzca una reacción alérgica relacionada con el huevo en un sujeto. Además, el anticuerpo contra la rizavidina modificada recombinante no tiene una reactividad cruzada aparente con la avidina de huevo (y viceversa).

Más específicamente, algunas divulgaciones comprenden una rizavidina modificada diseñada para expresión recombinante en *E. coli*. Esta secuencia codificante del gen de rizavidina se optimizó usando los codones de expresión de *E. coli*, para evitar cualquier dificultad durante la expresión en *E. coli* debido a la presencia de codones raros en el gen original. Para simplificar la construcción, después de un análisis bioinformático y basado en la estructura, se eliminaron los primeros 44 restos de rizavidina de longitud completa, ya que se encontró que eran innecesarios para la estructura y función del núcleo. El plegamiento correcto de la proteína recombinante se mejoró mediante la adición de una secuencia de señal de secreción de *E. coli* al N-terminal de la rizavidina acortada (45-179), para facilitar la translocación de la proteína recombinante en el espacio periplásmico de las células de *E. coli* donde se puede formar correctamente el enlace disulfuro funcionalmente importante en la rizavidina. La rizavidina recombinante modificada forma un dímero, en comparación con las proteínas similares a la avidina conocidas que forman tetrámeros, mejorando aún más la expresión de la fusión rizavidina recombinante-antígeno como una proteína soluble en *E. coli*.

Además, como se describe con más detalle en otras partes del presente documento, para mejorar la expresión y solubilidad de los antígenos de fusión en *E. coli*, se añadió una región enlazadora flexible entre la rizavidina y la proteína antigénica. Adicionalmente, basándose en la bioinformática y el análisis estructural, se clonaron y expresaron diferentes construcciones de antígenos: antígeno de longitud completa, o el dominio funcional importante, o proteínas quimeras que comprenden dos antígenos diferentes.

Los pares de afinidad adicionales que pueden ser útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen antígeno-anticuerpo, metal/ion-metal/ion-proteína de unión, lípido/proteína de unión a lípido, sacárido/proteína de unión a sacárido, aminoácido/péptido/aminoácido o proteína de unión a péptido, enzima-sustrato o enzima-inhibidor, ligando-agonista/receptor, o imitador de biotina. Cuando se usan pares de afinidad alternativos, también se pueden emplear medios alternativos para unir el polímero y el antígeno respectivos, tales como reacciones enzimáticas *in vitro* en lugar de fusión genética. Más específicamente, el par de afinidad antígeno-anticuerpo proporciona una interacción muy fuerte y específica. El antígeno puede ser cualquier epítipo que incluye proteína, péptido, ácido nucleico, lípido, poli/oligosacárido, ion, etc. El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina o la parte de unión a Ag de una inmunoglobulina, tal como un fragmento Fab. En cuanto al metal/ion-metal/ion-proteína de unión, los ejemplos incluyen Ni NTA frente a proteína marcada con histidina, o Zn frente a proteína de unión a Zn. En cuanto al lípido/proteína de unión a lípido, los ejemplos incluyen colesterol frente a proteína de unión a colesterol. En cuanto al sacárido/proteína de unión a sacárido, los ejemplos incluyen maltosa frente a proteína de unión a maltosa, manosa/glucosa/oligosacárido frente a lectina. Enzima-sustrato/inhibidores incluyen sustratos de una amplia gama de sustancias, incluyendo proteína, péptido, aminoácido, lípido, azúcares o iones. El inhibidor puede ser el análogo del sustrato real que generalmente se puede unir a las enzimas de forma más estrecha e incluso irreversible. Por ejemplo, tripsina frente al inhibidor de tripsina de soja. El inhibidor puede ser una molécula natural o sintética. En cuanto a otro ligando/agonista-receptor, el ligando puede ser de una amplia gama de sustancias, incluyendo proteína, péptido, aminoácido, lípido, azúcar, ion, el agonista puede ser el análogo del ligando real. Los ejemplos incluyen la interacción LPS frente a TLR4.

Reactivos de reticulación:

Muchos agentes de enlace bivalentes o polivalentes son útiles para acoplar moléculas de proteína a otras moléculas.

Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehídos, diazobencenos y hexametilén diaminas. Esta lista no pretende ser exhaustiva de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica, sino que, más bien, es un ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes. Véase Killen & Lindstrom, 133 J. Immunol. 1335 (1984); Jansen *et al.*, 62 Imm. Rev. 185 (1982); Vitetta *et al.*

En algunas divulgaciones, los agentes reactivos de reticulación descritos en la bibliografía se incluyen para su uso en los métodos, composiciones inmunogénicas y kits como se divulgan en el presente documento. Véase, *p. ej.*, Ramakrishnan, *et al.*, 44 Cancer Res. 201 (1984) (describen el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoiil-N-hidroxisuccinimida)); Umemoto *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.030.719 (que describe el uso de una acetil hidrazida halogenada acoplada a un anticuerpo mediante un enlace de oligopeptídico). Enlazadores particulares incluyen: (a) EDC clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida; (b) SMPT (4-succinimidioxiacarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (c) SPDP (succinimidil-6-[3-(2-piridiltio) propionamido] hexanoato (Pierce Chem. Co., N.º de cat 21651G); (d) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil-6-[3-(2-piridiltio)-propionamida] hexanoato (Pierce Chem. Co. N.º de cat 2165-G); y (f) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., N.º de cat 24510) conjugado con EDC.

Los enlaces o agentes de enlace descritos anteriormente contienen componentes que tienen diferentes atributos, lo que conduce a conjugados con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, los ésteres sulfo-NHS de carboxilatos de alquilo son más estables que los ésteres sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Los enlazadores que contienen éster NHS son menos solubles que los ésteres sulfo-NHS. Asimismo, el enlazador SMPT contiene un enlace disulfuro impedido estéricamente y puede formar conjugados con mayor estabilidad. Los enlaces disulfuro, en general, son menos estables que otros enlaces porque el enlace disulfuro se puede escindir *in vitro*, dando como resultado menos conjugado disponible. El sulfo-NHS, en particular, puede mejorar la estabilidad de los acoplamientos de carbodiimida. Los acoplamientos de carbodiimida (tal como EDC) cuando se usan junto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodiimida sola.

Las moléculas de reticulación de ejemplo para su uso en los métodos y composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las enumeradas en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Ejemplos de reticulantes homobifuncionales*

Objetivo de reticulación	Grupos reactivos con el reticulante, Características	Productos de ejemplo
Amina con Amina	Ésteres de NHS	DSG; DSS; BS3; TSAT (trifuncional); Pares de reactivos Bioconjugate Toolkit
	Ésteres de NHS, Espaciador de PEG	BS(PEG)5; BS(PEG)9
	Ésteres de NHS, escindible con tiol	DSP; DTSSP
	Ésteres de NHS, escindible con varios	DST; BSOEES; EGS; Sulfo-EGS
	Imidoésteres	DMA; DMP; DMS
	Imidoésteres, escindible con tiol	DTBP
	Otro	DFDNB; THPP (trifuncional); Kit de dextrano activado con aldehído
Sulfhidrilo con sulfhidrilo	Maleimidias	BMOE; BMB; BMH; TMEA (trifuncional)
	Maleimidias, Espaciador de PEG	BS(PEG)2; BM(PEG)3
	Maleimidias, escindible	BMDB; DTME
	Piridiltioles (escindible)	DPDPB
	Otro	HBVS (vinilsulfona)
No selectivo	Aril azidas	BASED (escindible con tiol)

*reactivos de reticulación que tienen el mismo tipo de grupo reactivo en cada extremo. Los reactivos se clasifican según los grupos químicos que reticulan (columna de la izquierda) y su composición química (columna central). Los productos se enumeran en orden de longitud creciente dentro de cada celda.

Tabla 4. Ejemplos de reticulantes heterobifuncionales*

Objetivos de reticulación	Grupos reactivos con el reticulante, Características	Productos de ejemplo
Amina con Sulfhidrilo	éster de NHS / Maleimida	AMAS; BMPS; GMBS y Sulfo-GMBS; MBS y Sulfo-MBS; SMCC y Sulfo-SMCC; EMCS y Sulfo-EMCS; SMPB y Sulfo-SMPB; SMPH; LC-SMCC; Sulfo-KMUS
	Éster de NHS / Maleimida, Espaciador de PEG	SM(PEG)2; SM(PEG)4; SM(PEG)6; SM(PEG)8; SM(PEG)12; SM(PEG)24
	Éster de NHS / Piridiltiol, escindible	SPDP; LC-SPDP y Sulfo-LC-SPDP; SMPT; Sulfo-LC-SMPT
	Ésteres de NHS / Maleimida	SIA; SBAP; SIAB; Sulfo-SIAB
Amina con No selectivo	Éster de NHS / Aril azida	NHS-ASA ANB-NOS Sulfo-HSAB Sulfo-NHS-LC-ASA SANPAH y Sulfo-SANPAH
	Éster de NHS / Aril azida, escindible	Sulfo-SFAD; Sulfo-SAND; Sulfo-SAED
	Éster de NHS / Diazirina	SDA y Sulfo-SDA; LC-SDA y Sulfo-LC-SDA
	Éster de NHS / Diazirina, escindible	SDAD y Sulfo-SDAD
Amina con Carboxilo	Carbodiimida	DCC; EDC
Sulfhidrilo con No selectivo	Piridiltiol / Aril azida	APDP
Sulfhidrilo con Carbohidrato	Maleimida / Hidrazida	BMPH; EMCH; MPBH; KMUH
	Piridiltiol / Hidrazida	BMPH; EMCH; MPBH; KMUH
Carbohidrato con No selectivo	Hidrazida / Aril azida	ABH
Hidroxilo con Sulfhidrilo	Isocianato / Maleimida	PMPI
Amina con ADN	Éster de NHS / Psoraleno	SPB
*reactivos de reticulación que tienen diferentes grupos reactivos en cada extremo. Los reactivos se clasifican según los grupos químicos que reticulan (columna de la izquierda) y su composición química (columna central). Los productos se enumeran en orden de longitud creciente dentro de cada celda.		

Factor coestimulador

5 En algunas divulgaciones, la composición inmunogénica como se divulga en el presente documento comprende al menos una molécula coestimuladora. En algunas divulgaciones, el factor coestimulador está reticulado con el polímero. En algunas divulgaciones, el factor coestimulador está asociado al polímero por un par de afinidad complementario similar a como un antígeno está asociado con el polímero. En algunas divulgaciones, el par de afinidad complementario que une el factor coestimulador al polímero es el mismo, o es un par de afinidad complementario diferente que une el antígeno al polímero.

10 En algunas divulgaciones, al menos uno, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 5, o al menos 10, o al menos 15, o al menos 20, o al menos 50, o al menos 100, o más de aproximadamente 100, inclusive, factores coestimuladores pueden asociarse con el polímero como se divulga en el presente documento. En algunas divulgaciones, los factores coestimuladores pueden ser el mismo factor coestimulador, o pueden ser una variedad de factores coestimuladores diferentes asociados con el polímero.

20 En algunas divulgaciones, el factor coestimulador es un ligando/agonista de receptores de tipo Toll, por ejemplo, pero sin limitación TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, etc. En algunas divulgaciones, un factor coestimulador es un ligando/agonista NOD, o un activador/agonista del inflammasoma. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, el inflammasoma es un oligómero multiproteico que consiste en caspasa 1, PYCARD, NALP y, a veces, caspasa 5 o caspasa 11 y promueve la maduración de citocinas inflamatorias interleucina 1- β e interleucina 18.

25 En algunas divulgaciones, un factor coestimulador es una citocina. En algunas divulgaciones, una citocina se

selecciona del grupo que consiste en: GM-CSF; IL-1 α ; IL-1 β ; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-10; IL-12; IL-23; IFN- α ; IFN- β ; IFN- γ ; MIP-1 α ; MIP-1 β ; TGF- β ; TNF α , y TNF β . En algunas divulgaciones, el factor de coestimulación es un adyuvante, que puede asociarse con el polímero, como se acaba de describir, o puede añadirse a la composición MAPS antes o al mismo tiempo que la administración a un sujeto. Los adyuvantes se describen adicionalmente en otra parte del presente documento.

Producción de antígenos y antígenos fusionados con la molécula de afinidad complementaria

Las proteínas recombinantes pueden ser expresadas y purificadas convenientemente por una persona experta en la materia, o usando kits comercializados, por ejemplo PROBOND™ Purification System (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). En algunas divulgaciones, los antígenos recombinantes pueden sintetizarse y purificarse mediante métodos de purificación de proteínas usando sistemas de expresión bacteriana, sistemas de expresión de levaduras, sistema de expresión de baculovirus/células de insectos, sistemas de expresión de células de mamíferos o sistemas vegetales o animales transgénicos como los conocen el experto habitual en la materia.

Todos los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento pueden sintetizarse y purificarse mediante métodos proteicos y moleculares que son bien conocidos por los expertos en la materia. Se utilizan métodos de biología molecular y sistemas de expresión de proteínas heterólogas recombinantes. Por ejemplo, la proteína recombinante se puede expresar en células de bacterias, de mamífero, insectos, levadura o células vegetales; o en hospedadores vegetales o animales transgénicos.

En una divulgación, se proporciona en el presente documento un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de fusión o un polipéptido que no es de fusión descrito en el presente documento. Pueden usarse técnicas de clonación de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencionales para construir una secuencia codificante de fusión o quimérica que codifique un polipéptido de fusión como se divulga en el presente documento. Se puede clonar una secuencia codificante en un vector de clonación de uso general tal como los vectores pUC19, pBR322, pBLUESCRIPT® (Stratagene, Inc.) o pCR TOPO® (Invitrogen). El vector recombinante resultante que lleva el ácido nucleico que codifica un polipéptido como se divulga en el presente documento puede usarse a continuación para manipulaciones biológicas moleculares adicionales tales como mutagénesis dirigida al sitio para crear un polipéptido de fusión variante como se divulga en el presente documento o puede subclonarse en vectores de expresión de proteínas o vectores virales para síntesis de proteínas en una variedad de sistemas de expresión de proteínas usando células hospedadoras seleccionadas del grupo que consiste en líneas celulares de mamíferos, líneas celulares de insectos, levaduras, bacterias y células vegetales.

Cada cebador de PCR debe tener al menos 15 nucleótidos superpuestos con sus correspondientes moldes en la región a amplificar. La polimerasa utilizada en la amplificación por PCR debe tener una alta fidelidad, tal como la *Pfu*ULTRA® polimerasa (Stratagene) para reducir errores de secuencia durante el proceso de amplificación por PCR. Para facilitar la ligadura de varios fragmentos de PCR separados, por ejemplo, en la construcción de un polipéptido de fusión, y posteriormente insertarlos en un vector de clonación, los cebadores de PCR también deben tener sitios de digestión de restricción distintos y únicos en sus extremos flanqueantes que no se hibridan con el molde de ADN durante la amplificación por PCR. La elección de los sitios de digestión de restricción para cada par de cebadores específicos debe ser tal que la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de fusión esté en marco y codifique el polipéptido de fusión de principio a fin sin codones de parada. Al mismo tiempo, los sitios de digestión de restricción elegidos no deben encontrarse dentro de la secuencia de ADN codificante del polipéptido de fusión. La secuencia de ADN codificante del polipéptido pretendido se puede ligar en el vector de clonación pBR322 o uno de sus derivados, para amplificación, verificación de la fidelidad y autenticidad de la secuencia codificante quimérica, sustituciones/o mutagénesis dirigida al sitio específico para mutaciones y sustituciones de aminoácidos específicos en el polipéptido.

Como alternativa, la secuencia de ADN codificante para el polipéptido se puede clonar por PCR en un vector usando, por ejemplo, el método de clonación TOPO® que comprende vectores TA asistidos por topoisomerasa tales como pCR®-TOPO, pCR®-Blunt II-TOPO, pENTR/D-TOPO®, y pENTR/SD/D-TOPO®.(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Tanto pENTR/D-TOPO® como pENTR/SD/D-TOPO® son vectores de entrada TOPO direccionales que permiten la clonación de la secuencia de ADN en la orientación 5'→3' en un vector de expresión GATEWAY®. La clonación direccional en la orientación 5'→3' facilita la inserción unidireccional de la secuencia de ADN en un vector de expresión de proteína de manera que el promotor está en dirección 5' del codón de inicio ATG 5' de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de fusión, lo que permite la expresión de la proteína impulsada por el promotor. El vector recombinante que lleva la secuencia de ADN codificante del polipéptido de fusión se puede transfectar y propagar en células de *E. coli* para la clonación general tal como XL1Blue, SURE® (STRATAGENE®) y células TOP-10 (Invitrogen).

Un experto en la materia podrá clonar y ligar la región codificante del antígeno de interés con la región codificante de la molécula de afinidad complementaria para construir una secuencia codificante quimérica de un polipéptido de fusión que comprende el antígeno o un fragmento del mismo y la molécula de afinidad complementaria de un derivado del mismo usando sondas de oligonucleótidos especialmente diseñadas y metodologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que son bien conocidas en la técnica. Un experto en la materia también podría clonar y ligar la secuencia codificante quimérica de una proteína de fusión en un vector seleccionado, por ejemplo, vector de expresión

bacterianos, un vector de expresión de insectos o un vector de expresión de baculovirus. Las secuencias codificantes del antígeno y el polipéptido del antígeno diana o fragmento del mismo deben ligarse en marco y la secuencia codificante quimérica debe ligarse en dirección 3' del promotor, y entre el promotor y el terminador de la transcripción. Posteriormente a esto, el vector recombinante se transfecta en *E. coli* para clonación general, tal como XL1Blue. *E. coli* recombinante que alberga el ADN del vector de transferencia se selecciona a continuación por resistencia a antibióticos para eliminar cualquier ADN plasmídico no recombinante que aloje *E. coli*. Las células de *E. coli* transformantes seleccionadas se cultivan y el ADN del vector recombinante se puede purificar a continuación para la transfección en células de *S. frugiperda*.

En algunas divulgaciones, los antígenos como se divulgan en el presente documento pueden comprender un péptido de señal para la translocación en el espacio periplásmico de las bacterias. El péptido de señal también se denomina péptido líder en el extremo N, que puede o no escindirse después de la translocación a través de la membrana. Un ejemplo de un péptido señal es MKKIWLALAGLVLAFSASA (SEQ ID NO:1) como se divulga en el presente documento. Otra secuencia de señal es MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRA (SEQ ID NO:14). Se pueden encontrar otros ejemplos de péptidos de señal en SPdb, una base de datos de péptidos de señal, que se encuentra en el sitio web mundial de "proline.bic.nus.edu.sg/spdb/".

En algunas divulgaciones, cuando el antígeno se fusiona con una proteína de afinidad complementaria, la secuencia de señal puede ubicarse en el extremo N-terminal de la proteína de afinidad complementaria. Por ejemplo, si un antígeno se fusiona con una proteína similar a la avidina, la secuencia de señal puede ubicarse en el extremo N-terminal de la proteína de afinidad complementaria. En algunas divulgaciones, la secuencia de señal se escinde de la proteína de afinidad complementaria antes de que la proteína de afinidad complementaria se asocie con la primera molécula de afinidad.

En algunas divulgaciones, un antígeno y/o una proteína de afinidad complementaria como se divulga en el presente documento carece de una secuencia de señal.

Los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden expresar en una variedad de células hospedadoras de expresión, por ejemplo, bacterias, levaduras, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, células de algas tales como *Chlamydomonas*, o en sistemas de expresión sin células. En algunas divulgaciones, el ácido nucleico puede subclonarse a partir del vector de clonación en un vector de expresión recombinante que sea apropiado para la expresión del polipéptido de fusión en células de bacterias, de mamífero, insectos, levaduras o vegetales o un sistema de expresión libre de células como un sistema de expresión de reticulocitos de conejos. Algunos vectores están diseñados para transferir ácido nucleico codificante para expresión en células de mamífero, células de insectos y levaduras en una sola reacción de recombinación. Por ejemplo, algunos de los vectores de destino GATEWAY® (Invitrogen) están diseñados para la construcción de baculovirus, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), retrovirus, y lentivirus, que al infectar sus respectivas células hospedadoras, permiten la expresión heteróloga de polipéptidos de fusión en las células hospedadoras apropiadas. La transferencia de un gen a un vector de destino se logra en solo dos etapas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Hay vectores de expresión GATEWAY® para la expresión de proteínas en células de insectos, células de mamíferos y levaduras. Tras la transformación y selección en *E. coli*, el vector de expresión está listo para usarse para la expresión en el hospedador apropiado.

Ejemplos de otros vectores de expresión y células hospedadoras son los vectores pcDNA3.1 (Invitrogen) y pCINEO (Promega) basados en el promotor de CMV fuerte para la expresión en líneas celulares de mamíferos tales como CHO, COS, HEK-293, Jurkat y MCF-7; vectores del vector adenoviral incompetente pADENO-X™, pAd5F35, pLP-ADENO™-X-CMV (CLONTECH®), pAd/CMV/V5-DEST, vector pAd-DEST (Invitrogen) para la transferencia y expresión génica mediada por adenovirus en células de mamífero; pLNCX2, vectores de retrovirus pLXSN y pLAPSN para su uso con el sistema RETRO-X™ de Clontech para la transferencia y expresión génica mediada por retrovirus en células de mamífero; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™, y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para la transferencia y expresión génica mediada por lentivirus en células de mamífero; vectores de expresión de virus asociados a adenovirus tales como pAAV-MCS, pAAV-IRES-hrGFP y el vector pAAV-RC (Stratagene) para la transferencia y expresión génica mediada por virus adenoasociados y la expresión en células de mamífero; baculovirus BACpak6 (Clontech) y pFASTBAC™ HT (Invitrogen) para la expresión en *S. frugiperda* 9 (Sf9), Sf11, Tn-368 y líneas celulares de insecto BTI-TN-5B4-1; pMT/BiP/V5-His (Invitrogen) para la expresión de células S2 de *Drosophila schneideri*; vectores de expresión de *Pichia* pPICZα, pPICZ, pFLDa y pFLD (Invitrogen) para la expresión en *P. pastoris* y vectores pMETα y pMET para la expresión en *P. methanolicus*; vectores pYES2/GS y pYD1 (Invitrogen) para la expresión en levadura *S. cerevisiae*.

Se describen los últimos avances en la expresión a gran escala de proteínas heterólogas en *Chlamydomonas reinhardtii*. Griesbeck., 34 Mol. Biotechnol. 213 (2006); Fuhrmann, 94 Methods Mol Med. 191 (2006). Las secuencias codificantes heterólogas extrañas se insertan en el genoma del núcleo, el cloroplasto y las mitocondrias mediante recombinación homóloga. El vector de expresión de cloroplasto p64 que lleva el marcador seleccionable de cloroplasto más versátil aminoglucósido adenil transferasa (aadA), que confiere resistencia a espectinomomicina o estreptomomicina, puede usarse para expresar proteína extraña en el cloroplasto. El método de pistola génica biolística se puede utilizar para introducir el vector en las algas. Tras su entrada en los cloroplastos, el ADN extraño se libera de las partículas de la pistola génica y se integra en el genoma del cloroplasto mediante recombinación homóloga.

También se incluyen en la descripción una molécula de afinidad complementaria fusionada con un antígeno. En algunas divulgaciones, la construcción de fusión también puede comprender opcionalmente etiquetas de purificación y/o péptidos señal de secreción. Estas proteínas de fusión se pueden producir mediante cualquier método estándar.

5 Por ejemplo, para la producción de una línea celular estable que expresa una proteína de fusión de antígeno-molécula de afinidad complementaria, se pueden clonar ácidos nucleicos de antígeno amplificados por PCR en el sitio de restricción de un vector de expresión de mamífero. Por ejemplo, KA, que es un derivado de pcDNA3 (Invitrogen) contiene un fragmento de ADN que codifica una etiqueta de hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. Como alternativa, se pueden usar derivados de vector que codifican otras etiquetas, tales como etiquetas c-myc o de polihistidina.

10 La construcción de expresión de fusión de antígeno-molécula de afinidad complementaria se puede cotransfectar, con un plásmido marcador, en una línea celular de mamífero apropiada (por ejemplo, COS, células HEK293T o NIH 3T3) usando, por ejemplo, LIPOFECTAMINE™ (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, o cualquier otra técnica de transfección adecuada conocida en la técnica. Los marcadores de transfección adecuados incluyen, por ejemplo, plásmidos de expresión de β-galactosidasa o proteína verde fluorescente (GFP) o cualquier plásmido que no contenga el mismo marcador detectable que la proteína de fusión antígeno-molécula de afinidad complementaria.

15 Las células que expresan la proteína de fusión se pueden clasificar y cultivar adicionalmente, o se puede purificar la proteína de fusión antígeno-molécula de afinidad complementaria marcada. En algunas divulgaciones, una proteína de fusión de antígeno-molécula de afinidad complementaria se amplifica con un péptido señal. En divulgaciones alternativas, un ADNc que codifica una proteína de fusión de antígeno-molécula de afinidad complementaria puede amplificarse sin el péptido de señal y subclonarse en un vector (pSecTagHis) que tiene un péptido de señal de secreción fuerte. En otro ejemplo, la proteína de fusión antígeno-molécula de afinidad complementaria puede tener una etiqueta de fosfatasa alcalina (AP) o una etiqueta de histidina (His) para la purificación. Cualquier método conocido por los expertos en la materia para la purificación de proteínas del antígeno y/o la proteína de fusión de antígeno-molécula de afinidad complementaria se incluye para su uso en los

25 métodos de la divulgación.

En algunas divulgaciones, cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento se produce mediante la expresión de un vector de baculovirus recombinante. En otra divulgación, cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento es expresado por una célula de insecto. En otra divulgación más, cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento se aísla de una célula de insecto. Existen varios beneficios de la expresión de proteínas con baculovirus en células de insectos, incluyendo niveles de expresión altos, facilidad de escalado, producción de proteínas con modificaciones postraduccionales y crecimiento celular simplificado. Las células de insectos no requieren CO₂ para el crecimiento y se pueden adaptar fácilmente al cultivo en suspensión de alta densidad para la expresión a gran escala. Muchas de las vías de modificación postraduccional presentes en sistemas de mamíferos también se utilizan en células de insectos, lo que permite la producción de proteína recombinante que es antigénica, inmunogénica y funcionalmente similar a la proteína de mamífero nativa.

30

35

Los baculovirus son virus de ADN de la familia *Baculoviridae*. Se sabe que estos virus tienen una variedad de hospedadores pequeña que se limita principalmente a especies de insectos lepidópteros (mariposas y polillas). El baculovirus *Autographa californica*, virus de la poliedrosis nuclear (AcNPV), que se ha convertido en el prototipo de baculovirus, se replica eficazmente en células de insectos cultivadas susceptibles. El AcNPV tiene un genoma de ADN circular cerrado de doble hebra de aproximadamente 130.000 pares de bases y está bien caracterizado con respecto a la variedad de hospedadores, biología molecular y genética. El sistema de vector de expresión de baculovirus (BEVS) es un método seguro y rápido para la producción abundante de proteínas recombinantes en células de insectos e insectos.

40

45

50

Los sistemas de expresión de baculovirus son sistemas potentes y versátiles para la expresión de proteínas recombinantes de alto nivel en células de insectos. Se han descrito niveles de expresión de hasta 500 mg/l utilizando el sistema de expresión de baculovirus, lo que lo convierte en un sistema ideal para la expresión de alto nivel. Los baculovirus recombinantes que expresan genes extraños se construyen mediante recombinación homóloga entre ADN de baculovirus y plásmidos quiméricos que contienen la secuencia del gen de interés. Los virus recombinantes se pueden detectar en virtud de su morfología de placa distinta y se pueden purificar en placa hasta homogeneidad.

Las proteínas de fusión recombinantes descritas en el presente documento se pueden producir en células de insectos, incluidas, pero sin limitación, células derivadas de las especies de *Lepidoptera S. frugiperda*. Otras células de insectos que pueden infectarse por baculovirus, tales como las de las especies *Bombyx mori*, *Galleria mellanoma*, *Trichoplusia ni*, o *Lamantiria dispar*, también se pueden usar como un sustrato adecuado para producir proteínas recombinantes descritas en el presente documento. La expresión de baculovirus de proteínas recombinantes es bien conocida en la técnica. Véase las patentes de Estados n.º 4.745.051; n.º 4.879.236; n.º 5.179.007; n.º 5.516.657; n.º 5.571.709; n.º 5.759.809. Los expertos en la materia entenderán que el sistema de expresión no se limita a un sistema de expresión de baculovirus. Lo importante es que el sistema de expresión dirige la N-glicosilación de proteínas recombinantes expresadas. Las proteínas recombinantes descritas en el presente documento también se pueden expresar en otros sistemas de expresión, tales como los virus Entomopox (los poxvirus de los insectos), los virus de la poliedrosis citoplasmática (CPV) y la transformación de células de insectos con el gen o genes recombinantes de expresión constitutiva. En el mercado existe un buen número de vectores de transferencia de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras modificadas apropiadamente, por ejemplo, pAcGP67, pAcSECG2TA, pVL1392, pVL1393, pAcGHLT, y pAcAB4 de BD Biosciences; pBAC-3, pBAC-6, pBACgus-6, y pBACsurf-1 de NOVAGEN®, y pPolh-FLAG y pPolh-MAT de SIGMA ALDRICH®.

55

60

65

La región entre el promotor y el terminador transcripcional puede tener múltiples sitios de digestión con enzimas de restricción para facilitar la clonación de la secuencia codificante extraña, en este caso, la secuencia de ADN codificante de un polipéptido antigénico y una molécula de afinidad complementaria. Se pueden incluir secuencias adicionales, por ejemplo, péptidos de señal y/o secuencias de codificación de etiquetas, tales como etiqueta de His, etiqueta MAT, etiqueta FLAG, secuencia de reconocimiento de enteroquinasa, señal de secreción de melitina de abeja, beta-galactosidasa, etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST) corriente arriba de MCS para facilitar la secreción, identificación, inserción adecuada, selección positiva del virus recombinante y/o purificación de la proteína recombinante.

En algunas divulgaciones, la proteína de fusión puede comprender una secuencia de señal N-terminal como se divulga en el presente documento. En algunas divulgaciones, la secuencia de señal se une al extremo N-terminal de la molécula de afinidad complementaria como se divulga en el presente documento.

En algunas divulgaciones, un polipéptido de fusión como se divulga en el presente documento tiene un péptido espaciador, por ejemplo, un espaciador de 14 restos (GSPGISGGGGILE) (SEQ ID NO: 15) que separa el antígeno de la molécula de afinidad complementaria. La secuencia codificante de un espaciador tan corto se puede construir hibridando un par complementario de cebadores. Un experto en la materia puede diseñar y sintetizar oligonucleótidos que codificarán el espaciador seleccionado. Los péptidos espaciadores generalmente deben tener restos de aminoácidos no polares, tales como glicina y prolina.

Se pueden usar técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia para introducir mutaciones (para crear sustituciones de aminoácidos en una secuencia de polipéptido de antígeno del polipéptido de fusión descrito en el presente documento, por ejemplo, en el antígeno en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de fusión descrito en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, el polipéptido de fusión variante tiene sustituciones de menos de 50 aminoácidos, sustituciones de menos de 40 aminoácidos, sustituciones de menos de 30 aminoácidos, sustituciones de menos de 25 aminoácidos, sustituciones de menos de 20 aminoácidos, sustituciones de menos de 15 aminoácidos, sustituciones de menos de 10 aminoácidos, sustituciones de menos de 5 aminoácidos, sustituciones de menos de 4 aminoácidos, sustituciones de menos de 3 aminoácidos, o sustituciones de menos de 2 aminoácidos, inclusive, respecto a los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento.

También se pueden realizar ciertas mutaciones silenciosas o neutras sin sentido en la secuencia de codificación de ADN que no cambian la secuencia de aminoácidos codificada o la capacidad de promover la liberación transmembrana. Estos tipos de mutaciones son útiles para optimizar el uso de codones o para mejorar la expresión y producción de proteínas recombinantes.

Puede usarse mutagénesis dirigida al sitio específico de una secuencia codificante del polipéptido de fusión en un vector para crear mutaciones y sustituciones de aminoácidos específicas. La mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, el kit de mutagénesis dirigida al sitio QUICKCHANGE® de Stratagene de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En una divulgación, se describen en el presente documento vectores de expresión que comprenden la secuencia de ADN codificante de los polipéptidos descritos en el presente documento para la expresión y purificación del polipéptido recombinante producido a partir de un sistema de expresión de proteínas utilizando células hospedadoras seleccionadas de, por ejemplo, bacterias, de mamífero, insectos, levadura o células vegetales. El vector de expresión debe tener los elementos reguladores necesarios en dirección 5' y en dirección 3' tales como secuencias promotoras, reconocimiento de ribosomas y caja TATA, y secuencia de terminación de la transcripción 3' UTR AAUAAA para una transcripción y traducción génica eficiente en su respectiva célula hospedadora. El vector de expresión es, preferentemente, un vector que tiene el promotor de la transcripción seleccionado de un grupo que consiste en promotor de CMV (citomegalovirus), el promotor del RSV (virus del sarcoma de Rous), el promotor de β -actina, el promotor de SV40 (virus de simio 40) y el promotor de la creatina quinasa muscular, y el terminador de la transcripción seleccionado de un grupo que consiste en el terminador SV40 poli (A) y BGH; más preferentemente, un vector de expresión que tenga la secuencia promotora/potenciadora temprana de citomegalovirus y la secuencia líder/intrón tripartita de adenovirus y que contenga el origen de replicación y la secuencia poli (A) de SV40. El vector de expresión puede tener regiones codificantes adicionales, como las que codifican, por ejemplo, 6X-histidina, V5, tiorredoxina, glutatión-S-transferasa, c-Myc, VSV-G, HSV, FLAG, péptido de unión a maltosa, péptido de unión a metal, HA y señales de "secreción" (melitina de abeja, factor α , PHO, Bip), que pueden incorporarse en el polipéptido de fusión expresado. Adicionalmente, puede haber sitios de digestión enzimática incorporados después de estas regiones codificantes para facilitar su eliminación enzimática si no son necesarias. Estos ácidos nucleicos adicionales son útiles para la detección de la expresión del polipéptido de fusión, para la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad, la solubilidad mejorada de la proteína recombinante en el citoplasma del hospedador y/o para secretar el polipéptido de fusión expresado en el medio de cultivo o el esferoplasto de las células de levadura. La expresión del polipéptido de fusión puede ser constitutiva en las células hospedadoras o puede inducirse, por ejemplo, con sulfato de cobre, azúcares, tales como galactosa, metanol, metilamina, tiamina, tetraciclina, infección con baculovirus e (isopropil-beta-D- tiogalactopiranosido) IPTG, un análogo sintético estable de lactosa.

En otra divulgación, el vector de expresión que comprende un polinucleótido descrito en el presente documento es un vector viral, tales como vectores de adenovirus, virus adenoasociado (AAV), retrovirus y lentivirus, entre otros. Los virus recombinantes proporcionan un sistema versátil para estudios de expresión génica y aplicaciones terapéuticas.

5 En algunas divulgaciones, los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento se expresan a partir de una infección viral de células de mamífero. Los vectores virales pueden ser, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), retrovirus y lentivirus. Un sistema simplificado para generar adenovirus recombinantes fue presentado por He *et al.*, 95 PNAS 2509 (1998). El gen de interés se clona primero en un vector lanzadera, por ejemplo, pAdTrack-CMV. 10 El plásmido resultante se linealiza mediante la digestión con endonucleasa de restricción *PmeI*, y posteriormente es cotransformado en células de *E. coli*. BJ5183 con un plásmido de estructura adenoviral, por ejemplo pADEASY-1 del ADEASY™ Adenoviral Vector System de Stratagene. Los vectores de adenovirus recombinantes se seleccionan por su resistencia a la kanamicina y la recombinación se confirma mediante análisis con endonucleasas de restricción. Por último, el plásmido recombinante linealizado se transfecta en líneas celulares de empaquetamiento de adenovirus, 15 por ejemplo, células HEK 293 (células renales embrionarias humanas transformadas con E1) o 911 (células retinianas embrionarias humanas transformadas con E1). Fallaux, *et al.* 7 Human Gene Ther. 215 (1996). Los adenovirus recombinantes se generan dentro de las células HEK 293.

20 El lentivirus recombinante tiene la ventaja de suministrar y expresar polipéptidos de fusión en células de mamífero en división y no en división. El lentivirus basado en VIH-1 puede transducir eficazmente una variedad de hospedadores más amplia que los sistemas retrovirales basados en el virus de la leucemia de Moloney (MoMLV). La preparación del lentivirus recombinante se puede lograr usando, por ejemplo, los vectores pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ o pLenti junto con los sistemas de expresión lentivirales VIRAPOWERTM de Invitrogen, Inc.

25 Los vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) son aplicables a una amplia gama de células hospedadoras que incluyen muchas líneas celulares o de tejidos humanos y no humanos diferentes. Los rAAV son capaces de transducir una amplia gama de tipos de células y la transducción no depende de la división activa de la célula hospedadora. Unos títulos altos, > 10⁸ partícula viral/ml, se obtienen fácilmente en el sobrenadante y 10¹¹ -10¹² 30 partícula viral/ml con mayor concentración. El transgén está integrado en el genoma del hospedador, por lo que la expresión es estable y a largo plazo.

La preparación a gran escala de vectores AAV se realiza mediante una cotransfección de tres plásmidos de una línea celular de empaquetamiento: vector AAV que lleva el ácido nucleico codificante, vector AAV RC que contiene genes rep y cap de AAV, y plásmido auxiliar de adenovirus pDF6, en placas de 50 x 150 mm de células 293 subconfluentes. 35 Las células se recolectan tres días después de la transfección y los virus se liberan mediante tres ciclos de congelación-descongelación o mediante sonicación.

Los vectores AAV se pueden purificar mediante dos métodos diferentes dependiendo del serotipo del vector. El vector AAV2 se purifica mediante el método de purificación en columna de flujo por gravedad de una sola etapa en función de su afinidad por la heparina. Auricchio *et al.*, 12 Human Gene Ther. 71 (2001); Summerford & Samulski, 72 J. Virol. 1438 (1998); Summerford & Samulski, 5 Nat. Med. 587 (1999). Los vectores AAV2/1 y AAV2/5 se purifican actualmente mediante tres gradientes secuenciales de CsCl. 40

45 Sin desear quedar ligado a la teoría, cuando las proteínas se expresan en una célula hospedadora, incluyendo una célula bacteriana, las proteínas se dirigen a una parte particular de la célula o se secretan de la célula. Por lo tanto, el direccionamiento de proteínas o la clasificación de proteínas es el mecanismo por el cual una célula transporta proteínas a las posiciones apropiadas en la célula o fuera de ella. Los objetivos de clasificación pueden ser el espacio interno de un orgánulo, cualquiera de las diferentes membranas internas, la membrana externa de la célula o su exterior a través de la secreción. Este proceso de suministro se lleva a cabo basándose en la información contenida 50 en la propia proteína. La clasificación correcta es crucial para la célula; los errores pueden provocar enfermedades.

Con algunas excepciones, las bacterias carecen de orgánulos unidos a la membrana como los que se encuentran en los eucariotas, pero pueden ensamblar proteínas en varios tipos de inclusiones, tales como vesículas de gas y gránulos de almacenamiento. También, dependiendo de la especie de bacteria, las bacterias pueden tener una sola membrana plasmática (bacterias grampositivas), o una membrana interna (plasmática) y una membrana de la pared celular externa, con un espacio acuoso entre las dos llamado periplasma (bacterias gramnegativas). Las proteínas pueden secretarse al medio ambiente, según haya o no membrana externa. El mecanismo básico de la membrana plasmática es similar al eucariota. Adicionalmente, las bacterias pueden dirigir a proteínas dentro o a través de la membrana externa. Los sistemas para secretar proteínas a través de la membrana externa bacteriana pueden ser bastante complejos y desempeñar funciones clave en la patogénesis. Estos sistemas pueden describirse como secreción de tipo I, secreción de tipo II, etc. 60

En la mayoría de las bacterias grampositivas, ciertas proteínas se dirigen a la exportación a través de la membrana plasmática y la posterior unión covalente a la pared celular bacteriana. Una enzima especializada, la sortasa, escinde la proteína diana en un sitio de reconocimiento característico cerca del extremo C de la proteína, tal como un motivo LPXTG (SEQ ID NO: 16) (donde X puede ser cualquier aminoácido), a continuación transfiere la proteína a la pared 65

celular. Se propone que existe un sistema análogo a la sortasa/LPXTG, que tiene el motivo PEP-CTERM (SEQ ID NO: 17), denominado exosortasa/PEP-CTERM, en una amplia variedad de bacterias gramnegativas.

5 Las proteínas con señales de dirección N-terminal apropiadas se sintetizan en el citoplasma y luego se dirigen a una vía de transporte de proteínas específica. Durante o poco después de su translocación a través de la membrana citoplasmática, la proteína se procesa y se pliega en su forma activa. A continuación, la proteína translocada se retiene en el lado periplásmico de la célula o se libera al medio ambiente. Dado que los péptidos de señal que dirigen las proteínas a la membrana son determinantes clave para la especificidad de la vía de transporte, estos péptidos de señal se clasifican según la vía de transporte a la que dirigen las proteínas. La clasificación del péptido de señal se basa en el tipo de peptidasa señal (SPasa) responsable de la eliminación del de péptido señal. La mayoría de las proteínas exportadas se exportan del citoplasma a través de la "vía secretora (Sec)" general. Los factores de virulencia más conocidos (por ejemplo, exotoxinas de *Staphylococcus aureus*, antígeno protector de *Bacillus anthracis*, listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*) que son secretados por patógenos grampositivos tienen un péptido de señal N-terminal típico que los conduciría a la vía Sec. Las proteínas que se secretan a través de esta vía se traslocan a través de la membrana citoplasmática en un estado desplegado. El procesamiento y el plegado posteriores de estas proteínas tienen lugar en el entorno de la pared celular en el lado trans de la membrana. Además del sistema Sec, algunas bacterias grampositivas también contienen el sistema Tat que es capaz de traslocar proteínas plegadas a través de la membrana. Las bacterias patógenas pueden contener ciertos sistemas de exportación para fines especiales que están específicamente involucrados en el transporte de solo unas pocas proteínas. Por ejemplo, se han identificado varios grupos de genes en micobacterias que codifican proteínas que se secretan al medio ambiente a través de vías específicas (ESAT-6) y son importantes para la patogénesis de las micobacterias. Los transportadores específicos del casete de unión a ATP (ABC) dirigen la exportación y el procesamiento de pequeños péptidos antibacterianos llamados bacteriocinas. Los genes de las endolisinas que son responsables del inicio de la lisis bacteriana a menudo se encuentran cerca de los genes que codifican proteínas similares a las holinas, lo que sugiere que estas holinas son responsables de la exportación de endolisina a la pared celular. Wooldridge, BACT. SECRETED PROTS: SECRETORY MECHS. & ROLE IN PATHOGEN. (Caister Academic Press, 2009)

15 En algunas divulgaciones, la secuencia de señal útil en la presente divulgación es la secuencia de señal OmpA, sin embargo, cualquier secuencia de señal comúnmente conocida por un experto habitual en la materia que permita el transporte y secreción de agentes antimicrobianos fuera de la célula infectada con bacteriófago se incluye para su uso en la presente divulgación.

20 La secuencia de señal que dirige la secreción de proteínas a partir de células bacterianas es bien conocida en la técnica, por ejemplo como se divulga en la solicitud internacional WO 2005/071088. Por ejemplo, se pueden usar algunos de los ejemplos no limitados de péptido de señal que se muestran en la Tabla 5, que se pueden unir al extremo amino o al extremo carboxilo del péptido antimicrobiano (Amp) o polipéptido antimicrobiano para ser expresado por el bacteriófago modificado por ingeniería genética como agente antimicrobiano, por ejemplo, bacteriófago modificado por ingeniería genética como AMP. La unión puede ser mediante fusión o composición de quimera con antígeno seleccionado o proteína de fusión de antígeno-molécula de afinidad complementaria dando como resultado la secreción de la bacteria infectada con el bacteriófago modificado por ingeniería genética como agente antimicrobiano, por ejemplo bacteriófago modificado por ingeniería genética como AMP.

Tabla 5: Ejemplo de péptidos señal para dirigir la secreción de un antígeno proteico o peptídico o proteína de fusión de antígeno-molécula de afinidad complementaria de una célula bacteriana

Vía de secreción	Secuencia de aminoácidos del péptido de señal (NH ₂ -CO ₂)	Gen	Género/Especie
secA1	MKKIMLVITLILVSPIAQQTEAK D (SEQ ID NO:18)	<i>Hly</i> (LLO)	<i>Listeria monocytogenes</i>
	MKKKIISAILMSTVILSAAAPLSG VYADT (SEQ ID NO:19)	<i>Usp45</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
	MKKRKVLIPLMALSTILVSSTGN LEVIQAEV (SEQ ID NO: 20)	<i>Pag</i> (antígeno protector)	<i>Bacillus anthracis</i>

45

(continuación)

Vía de secreción	Secuencia de aminoácidos del péptido de señal (NH ₂ -CO ₂)	Gen	Género/Especie
secA2	MNMKKATIAATAGIAVTFAAAP TIASAST (SEQ ID NO:21)	lap (proteína p60 asociada a la invasión)	<i>Listeria monocytogenes</i>
	MQKTRKERILEALQEEKKNKKS KKFKTGATIAGVTAIATSITVPGI EVIVSADE (SEQ ID NO:22)	NamA Imo2691 (autolisina)	<i>Listeria monocytogenes</i>
	MKKLKMASCALVAGLMFSGLT PNAFAED (SEQ ID NO:23)	*BA_0281 (familia NLP/P60)	<i>Bacillus anthracis</i>
	MAKKFNYKLPSMVALTLVGSA VTAHQVQAAE (SEQ ID NO:24)	*atl (autolisina)	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tat	MTDKKSENQTEKTETKENKGM TRREMLKLSAVAGTGIAVGATG LGTILNVVDQVDKALT (SEQ ID NO:25)	Imo0367	<i>Listeria monocytogenes</i>
	MAYDSRFDEWVQKLKEESFQN NTFDRRKFIQGAGKIAGLGLGLT IAQSVGAFG (SEQ ID NO:26)	PhoD (fosfatasa alcalina)	<i>Bacillus subtilis</i>

Los polipéptidos descritos en el presente documento, por ejemplo, antígenos o proteína de fusión de antígeno-molécula de afinidad complementaria pueden expresarse y purificarse mediante una variedad de métodos conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento pueden purificarse a partir de cualquier sistema de expresión adecuado. Los polipéptidos de fusión se pueden purificar hasta una pureza sustancial mediante técnicas estándar, incluida la precipitación selectiva con sustancias tales como sulfato de amonio; cromatografía en columna, métodos de inmunopurificación y otros; que son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Scopes, PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES & PRACTICE (1982); patente de los Estados Unidos n.º 4.673.641.

Se pueden emplear varios procedimientos cuando se purifican proteínas recombinantes. Por ejemplo, las proteínas que tienen propiedades de adhesión molecular establecidas se pueden fusionar de forma reversible a la proteína de elección. Con el ligando apropiado, la proteína puede adsorberse selectivamente en una columna de purificación y luego liberarse de la columna en una forma relativamente pura. La proteína fusionada se elimina mediante actividad enzimática. Por último, la proteína de elección se puede purificar usando columnas de afinidad o inmunofinidad.

Una vez expresada la proteína en las células hospedadoras, las células hospedadoras se pueden lisar para liberar la proteína expresada para su purificación. Los métodos de lisis de las diversas células hospedadoras se describen en "Sample Preparation-Tools for Protein Research" EMD Bioscience and in the Current Protocols in Protein Sciences (CPPS). Un ejemplo de método de purificación es la cromatografía de afinidad, tal como la cromatografía de afinidad de iones metálicos que utiliza resinas de afinidad de níquel, cobalto o zinc para polipéptidos de fusión marcados con histidina. Clontech describe métodos para purificar proteínas recombinantes etiquetadas con histidina utilizando su resina de cobalto TALON® y NOVAGEN® en su manual del sistema pET, 10ª edición. Otra estrategia de purificación preferida es la cromatografía de inmunofinidad, por ejemplo, se puede usar resina conjugada con anticuerpo anti-myc para purificar por afinidad polipéptidos de fusión marcados con myc. Cuando están presentes secuencias de reconocimiento de proteasas apropiadas, los polipéptidos de fusión se pueden escindir de la etiqueta de histidina o myc, liberando el polipéptido de fusión de la resina de afinidad mientras que las etiquetas de histidina y las etiquetas myc se dejan unidas a la resina de afinidad.

Las técnicas estándar de separación de proteínas para purificar proteínas recombinantes y de origen natural son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, fraccionamiento por solubilidad, filtración en gel de exclusión por tamaño y diversas cromatografías en columna.

35 Fraccionamiento por solubilidad: Frecuentemente como etapa inicial, particularmente si la mezcla de proteínas es compleja, un fraccionamiento de sal inicial puede separar muchas de las proteínas de la célula hospedadora no deseadas (o proteínas derivadas del medio de cultivo celular) de la proteína de interés. La sal preferida es el sulfato de amonio. El sulfato de amonio precipita las proteínas al reducir eficazmente la cantidad de agua en la mezcla de

proteínas. A continuación, las proteínas precipitan en función de su solubilidad. Cuanto más hidrófoba es una proteína, más probable es que precipite a concentraciones más bajas de sulfato de amonio. Un protocolo típico incluye agregar sulfato de amonio saturado a una solución de proteína de modo que la concentración de sulfato de amonio resultante esté entre el 20 y el 30 %. Esta concentración precipitará la más hidrófoba de las proteínas. A continuación, se desecha el precipitado (a menos que la proteína de interés sea hidrófoba) y se añade sulfato de amonio al sobrenadante hasta una concentración que se sabe que precipita la proteína de interés. A continuación, el precipitado se solubiliza en tampón y el exceso de sal se elimina si es necesario, ya sea mediante diálisis o diafiltración. Otros métodos que se basan en la solubilidad de proteínas, tales como precipitación con etanol frío, son bien conocidos por los expertos en la materia y pueden usarse para fraccionar mezclas de proteínas complejas.

Filtración de exclusión por tamaño: El peso molecular de la proteína de elección se puede utilizar para aislarla de proteínas de mayor y menor tamaño mediante ultrafiltración a través de membranas de diferente tamaño de poro (por ejemplo, membranas AMICON® o MILLIPORE®). Como primera etapa, la mezcla de proteínas se ultrafiltra a través de una membrana con un tamaño de poro que tiene un punto de corte de peso molecular más bajo que el peso molecular de la proteína de interés. El retenido de la ultrafiltración se ultrafiltra a continuación contra una membrana con un corte molecular mayor que el peso molecular de la proteína de interés. La proteína recombinante pasará a través de la membrana al filtrado. A continuación, el filtrado se puede cromatografiar como se describe a continuación.

Cromatografía en columna: La proteína de elección también se puede separar de otras proteínas en función de su tamaño, carga superficial neta, hidrofobicidad y afinidad por los ligandos. Adicionalmente, los anticuerpos producidos contra proteínas recombinantes o de origen natural se pueden conjugar con matrices de columna e inmunopurificar las proteínas. Todos estos métodos son bien conocidos en la técnica. Será evidente para un experto que las técnicas cromatográficas se pueden realizar a cualquier escala y utilizando equipos de muchos fabricantes diferentes (por ejemplo, Pharmacia Biotech). Por ejemplo, se puede purificar un polipéptido de antígeno usando una columna de afinidad de heptámero PA63. Singh *et al.*, 269, J. Biol. Chem. 29039 (1994).

En algunas divulgaciones, se puede utilizar una combinación de etapas de purificación que comprende, por ejemplo: (a) cromatografía de intercambio iónico, (b) cromatografía con hidroxipatito, (c) cromatografía de interacción hidrófoba y (d) cromatografía de exclusión por tamaño para purificar los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento.

Los sistemas de expresión sin células también se contemplan. Los sistemas de expresión sin células ofrecen varias ventajas sobre los métodos de expresión tradicionales basados en células, incluida la fácil modificación de las condiciones de reacción para favorecer el plegamiento de proteínas, la disminución de la sensibilidad a la toxicidad del producto y la idoneidad para estrategias de alto rendimiento, como la detección de expresión rápida o la producción de proteínas en grandes cantidades debido a volúmenes de reacción y tiempo de proceso reducidos. El sistema de expresión sin células puede utilizar ADN plasmídico o lineal. Además, las mejoras en la eficiencia de la traducción han dado como resultado rendimientos que superan un miligramo de proteína por mililitro de mezcla de reacción. Los sistemas de expresión sin células comercializados incluyen los sistemas de lisado de reticulocitos acoplados a TNT (Promega), que utilizan un sistema *in vitro* basado en reticulocitos.

Formulaciones de una composición inmunitaria y métodos de uso

Las divulgaciones específicas proporcionan el uso de las composiciones inmunogénicas como se divulgan en el presente documento para provocar una respuesta inmunitaria en un animal. Más específicamente, las composiciones provocan inmunidad tanto humoral como celular y, en muchos casos, inmunidad de las mucosas. Las presentes divulgaciones proporcionan al menos una protección parcial o una mejora parcial después de la infección, en particular, por neumococo. Los neumococos provocan varias enfermedades, tales como meningitis, neumonía, bacteriemia, y otitis media. Casi un millón de niños mueren cada año por enfermedades neumocócicas en todo el mundo. *S. pneumoniae* se ha estudiado exhaustivamente y se han secuenciado al menos algunos de los genomas. Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 7.141.418. Aunque los anticuerpos contra los polisacáridos capsulares, que definen los serotipos conocidos, confieren protección específica de serotipo, se han descrito otros mecanismos protectores de inmunidad. Véase Malley *et al.*, 88 J. Mol. Med. 135 (2010). Estos otros mecanismos protectores incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra antígenos no capsulares y respuestas de linfocitos T a constituyentes neumocócicos. La aplicación de la vacuna conjugada de proteína-polisacárido, PCV7, ha reducido significativamente las enfermedades. Black *et al.*, 24(S2) Vaccine 79 (2006); Hansen *et al.*, 25 Pediatr. Infect. Dis. J. 779 (2006)). No obstante, estudios recientes han demostrado que la falta de otros serotipos en PCV7 ha dado lugar a serotipos neumocócicos de reemplazo emergentes. Pichichero & Casey, 26(S10) Pediatr. Infect. Dis. J. S12 (2007).

Se ha demostrado que ciertos antígenos neumocócicos comunes a todos los serotipos de la especie tienen potencial inmunoprotector a pesar de la encapsulación, por ejemplo, las proteínas de superficie PspA, PspC, PsaA y la citotoxina neumolisina o mutantes neumolisoides (Basset *et al.*, 75 Infect. Immun. 5460 (2007); Briles *et al.*, 18 Vaccine 1707 (2000)); el uso de bibliotecas genómicas y mutacionales ha identificado varias docenas de proteínas comunes de especies adicionales (Hava & Camilli, 45 Mol. Microbiol. 1389 (2002); Wizemann *et al.*, 60 Infect. Immun. 1593 (2001)). La inmunidad ha sido inducida por antígenos individuales en modelos animales (Alexander *et al.*, 62 Infect. Immun. 5683 (1994); Balachandran *et al.*, 70 Infect. Immun. 2526 (2002); Chung *et al.*, 170 J. Immunol. 1958 (2003); Glover

et al., 76 *Infect. Immun.* 2767 (2008); Wu *et al.*, 175 *J. Infect. Dis.* 839 (1997)), pero hasta la fecha no se ha aprobado ninguna vacuna basada en un antígeno común para uso humano.

5 En una divulgación, se proporciona en el presente documento un método para vacunar a un mamífero que comprende administrar la composición inmunogénica que comprende al menos uno o varios antígenos unidos a al menos un tipo de armazón polimérico, por ejemplo, un polímero polisacárido o hidrato de carbono para su uso en la provocación de una respuesta inmunitaria al uno o más antígenos unidos al polímero cuando se administra a un sujeto. En algunas divulgaciones, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral y/o celular.

10 Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación se refiere a métodos para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición inmunogénica que comprende al menos un tipo de polímero, por ejemplo, un polisacárido, al menos un antígeno y al menos un par de molécula de afinidad-complementaria que comprende (i) una primera molécula de afinidad que se asocia con el polímero, por ejemplo, un polisacárido, y (ii) una molécula de afinidad complementaria que se asocia con el antígeno, para unir el antígeno al polímero, por ejemplo, un polisacárido, (por ejemplo, la primera molécula de afinidad se asocia con la molécula de afinidad complementaria para unir el antígeno al polímero, por ejemplo, polisacárido).

15 Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación se refiere a métodos para provocar una inmunidad humoral y/o celular a múltiples antígenos al mismo tiempo, por ejemplo, cuando la composición inmunogénica administrada al sujeto comprende un polímero que comprende al menos 1, o al menos 2, o más, por ejemplo, una pluralidad de antígenos iguales o diferentes.

20 Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de inmunización o vacunación de un sujeto, por ejemplo, un ave o un mamífero, por ejemplo, un ser humano contra un patógeno comprende administrar una composición inmunitaria como se divulga en el presente documento que comprende al menos un antígeno derivado de uno o más patógenos. En algunas divulgaciones, un sujeto puede inmunizarse contra al menos 1, o al menos 2, o al menos 2, o al menos 3, o al menos 5, o al menos 10, o al menos 15, o al menos aproximadamente 20, o al menos 50, o al menos aproximadamente 100, o más de 100 patógenos diferentes al mismo tiempo, donde el polímero de la composición inmunogénica se une a los correspondientes antígenos diferentes.

25 En algunas divulgaciones, se pueden administrar a un sujeto varias composiciones inmunogénicas diferentes como se divulga en el presente documento, por ejemplo, se puede administrar a un sujeto una composición que comprende un polímero con un antígeno, o una pluralidad de antígenos, por ejemplo, antígenos A, B, C y D, etc., y también se administra una composición que comprende un polímero que comprende un antígeno diferente, o un conjunto diferente de antígenos, por ejemplo, antígenos W, X, Y Z, etc. Como alternativa, se puede administrar a un sujeto una composición que comprende un polímero A con un antígeno, o una pluralidad de antígenos, por ejemplo, antígenos A, B, C y D, etc., y también se administra una composición que comprende un polímero B que comprende por ejemplo los mismos, antígenos A, B, C, y D etc., o un conjunto diferente de antígenos. Se prevé que la presente divulgación proporcione métodos para la inmunización de un sujeto con tantos antígenos como se desee, por ejemplo, con una variedad de complejos inmunogénicos diferentes como se divulga en el presente documento, para permitir la inmunización con hasta 100 o más antígenos.

30 En una divulgación, las composiciones inmunogénicas como se describen en el presente documento comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra divulgación, la composición inmunogénica descrita en el presente documento se formula para administrar a un ave, mamífero o ser humano, como o en una vacuna. Se pueden encontrar formulaciones adecuadas en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (2006), o Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms (4^a ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1985).

35 En una divulgación, las composiciones inmunogénicas como se describen en el presente documento comprenden vehículos farmacéuticamente aceptables que son inherentemente no tóxicos y no terapéuticos. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa y polietilenglicol. Para todas las administraciones, se utilizan adecuadamente formas de depósito convencionales. Dichas formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, emplastos, formas inhalables, aerosoles nasales, comprimidos sublinguales y preparaciones de liberación sostenida. Para ejemplos de composiciones de liberación sostenida, véase las patentes de Estados Unidos n.º 3.773.919, n.º 3.887.699, los documentos EP 58.481A, EP 158.277A, la patente canadiense n.º 1176565; Sidman *et al.*, 22 *Biopolymers* 547 (1983); Langer *et al.*, 12 *Chem. Tech.* 98 (1982). Las proteínas se formularán normalmente a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml por aplicación por paciente.

40 En una divulgación, se pueden añadir otros componentes a las formulaciones de vacuna, incluyendo antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez restos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros

hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; y alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol.

- 5 En algunas divulgaciones, las presentes composiciones de inmunógeno MAPS se administran con al menos un adyuvante. Los adyuvantes son un grupo heterogéneo de sustancias que potencian la respuesta inmunitaria contra un antígeno que se administra simultáneamente. En algunos casos, los adyuvantes mejoran la respuesta inmunitaria de modo que se necesita menos vacuna. Los adyuvantes sirven para poner en contacto el antígeno, sustancia que estimula la respuesta inmunitaria protectora específica, con el sistema inmunitario e influir en el tipo de inmunidad producida, así como en la calidad de la respuesta inmunitaria (magnitud o duración). Los adyuvantes también pueden disminuir la toxicidad de ciertos antígenos; y proporcionan solubilidad a algunos componentes de la vacuna. Casi todos los adyuvantes que se utilizan hoy en día para potenciar la respuesta inmunitaria contra los antígenos son partículas o forman partículas junto con el antígeno. En el libro VACCINE DESIGN - SUBUNIT & ADJUVANT APPROACH (Powell & Newman, Eds., Plenum Press, 1995), se describen muchos adyuvantes conocidos tanto con respecto a su actividad inmunológica como con respecto a sus características químicas. El tipo de adyuvantes que no forman partículas son un grupo de sustancias que actúan como sustancias señalizadoras inmunológicas y que en condiciones normales están constituidas por las sustancias que se forman por el sistema inmunitario como consecuencia de la activación inmunológica tras la administración de sistemas adyuvantes particulados.
- 10
- 15
- 20 Los adyuvantes para las composiciones inmunogénicas y las vacunas son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, monoglicéridos y ácidos grasos (por ejemplo, una mezcla de monooleína, ácido oleico y aceite de soja); sales minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio y geles de fosfato de aluminio o calcio; emulsiones oleosas y formulaciones a base de tensioactivos, por ejemplo, MF59 (emulsión de aceite en agua estabilizada con detergente microfluidizado), QS21 (saponina purificada), AS02 [SBAS2] (emulsión de aceite en agua + MPL + QS-21), MPL-SE, Montanide ISA-51 e ISA-720 (emulsión de agua en aceite estabilizada); adyuvantes particulados, por ejemplo, virosomas (vehículos liposomales unilaminares que incorporan hemaglutinina de la gripe), AS04 ([SBAS4] sal de Al con MPL), ISCOMS (complejo estructurado de saponinas y lípidos), polilactida co-glicólido (PLG); derivados microbianos (naturales y sintéticos), por ejemplo, monofosforil lípido A (MPL), Detox (MPL + esqueleto de la pared celular de *M. Phlei*), AGP [RC-529] (monosacárido acilado sintético), Detox-PC, DC_Chol (inmunoestimuladores lipoidales capaces de autoorganizarse en liposomas), OM-174 (derivado de lípido A), motivos CpG (oligonucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG inmunoestimuladores) u otras estructuras de ADN, LT y CT modificados (toxinas bacterianas modificadas genéticamente para proporcionar efectos adyuvantes no tóxicos); inmunomoduladores humanos endógenos, por ejemplo, hGM-CSF o hIL-12 (citocinas que pueden administrarse como proteínas o plásmidos codificados), Immudaptin (matriz en tándem C3d), MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjumer, PG-026, GSK-I, GcMAF, B-aletina, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, Betafectina, Alum, MF59 y vehículos inertes, tales como partículas de oro. Se conocen adyuvantes adicionales en la técnica, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6,890,540; la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2005; 0244420; PCT/SE97/01003.
- 25
- 30
- 35
- 40 En algunas divulgaciones, un adyuvante es un material particulado y puede tener la característica de ser lentamente biodegradable. Se debe tener precaución y asegurarse de que el adyuvante no forme metabolitos tóxicos. Preferentemente, en algunas divulgaciones, tales adyuvantes pueden ser matrices que utilizan principalmente sustancias que se originan en un organismo. Estos incluyen polímeros de ácido láctico, poliaminoácidos (proteínas), hidratos de carbono, lípidos y polímeros biocompatibles con baja toxicidad. También se pueden utilizar combinaciones de estos grupos de sustancias que se originan en un cuerpo o combinaciones de sustancias que se originan en un cuerpo y polímeros biocompatibles. Los lípidos son las sustancias preferidas ya que presentan estructuras que los hacen biodegradables, así como el hecho de que son un elemento crítico en todas las membranas biológicas.
- 45
- 50 En una divulgación, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento para su administración deben ser estériles para su administración a un sujeto. La esterilidad se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micrómetros) o mediante irradiación gamma.
- 55 En algunas divulgaciones, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento comprenden además excipientes farmacéuticos incluyendo, pero sin limitación, aceites biocompatibles, soluciones salinas fisiológicas, conservantes, hidrato de carbono, proteína, aminoácidos, agentes de control de la presión osmótica, gases portadores, agentes de control del pH, disolventes orgánicos, agentes hidrófobos, inhibidores enzimáticos, polímeros absorbentes de agua, tensioactivos, promotores de la absorción y agentes antioxidantes. Los ejemplos representativos de hidratos de carbono incluyen azúcares solubles tales como hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, ácido hialurónico, quitosano, alginato, glucosa, xilosa, galactosa, fructosa, maltosa, sacarosa, dextrano, sulfato de condroitina, etc. Los ejemplos representativos de proteínas incluyen albúmina, gelatina, etc. Los ejemplos representativos de aminoácidos incluyen glicina, alanina, ácido glutámico, arginina, lisina, y sus sales. Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica.
- 60
- 65 En algunas divulgaciones, la composición de MAPS inmunogénica se administra en combinación con otros componentes terapéuticos que incluyen, por ejemplo, γ -interferón, citocinas, agentes quimioterapéuticos o agentes antiinflamatorios o antivirales. En algunas divulgaciones, la composición inmunogénica como se divulga en el presente

documento puede administrarse con una o más moléculas coestimuladoras y/o adyuvantes como se divulga en el presente documento.

5 En algunas divulgaciones, la composición inmunogénica se administra en una forma pura o sustancialmente pura, pero se puede administrar como una composición, formulación o preparación farmacéutica. Tal formulación comprende MAPS descritos en el presente documento junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros componentes terapéuticos. Otros componentes terapéuticos incluyen compuestos que mejoran la presentación de antígenos, por ejemplo, interferón gamma, citocinas, agentes quimioterapéuticos o agentes antiinflamatorios. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, Plotkin and Mortimer, en VACCINES (2ª ed., W.B. Saunders Co., 1994) describe la vacunación de animales o seres humanos para inducir una respuesta inmunitaria específica de patógenos particulares, así como a métodos para preparar el antígeno, determinar una dosis adecuada de antígeno y ensayar la inducción de una respuesta inmunitaria.

15 Las formulaciones adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, intranasal, oral, sublingual, vaginal, rectal, subcutánea o intraperitoneal comprenden convenientemente soluciones acuosas estériles del principio activo con soluciones que son preferentemente isotónicas con la sangre del receptor. Tales formulaciones se pueden preparar convenientemente disolviendo el principio activo sólido en agua que contiene sustancias fisiológicamente compatibles tales como cloruro de sodio (por ejemplo, 0,1 M-2,0 M), glicina y similares, y que tienen un pH tamponado compatible con las condiciones fisiológicas para producir una solución acuosa y obtener la solución estéril. Estas se pueden presentar en recipientes unidos o multidosis, por ejemplo, ampollas o viales sellados.

También pueden usarse suspensiones liposómicas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.522.811.

Las formulaciones para la administración intranasal se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 5.427.782; n.º 5.843.451; n.º 6.398.774.

30 Las formulaciones de las composiciones inmunogénicas pueden incorporar un estabilizador. Los estabilizadores ilustrativos son polietilenglicol, proteínas, sacárido, aminoácidos, ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos que pueden usarse solos o como mezclas. Pueden usarse dos o más estabilizadores en soluciones acuosas a la concentración y/o pH apropiados. La presión osmótica específica en tal solución acuosa está generalmente en el intervalo de 0,1-3,0 de ósmosis, preferentemente en el intervalo de 0,80-1,2. El pH de la solución acuosa se ajusta para que esté dentro del intervalo de pH 5,0-9,0, preferentemente dentro del intervalo de pH 6-8.

40 Cuando se desean preparaciones orales, las composiciones inmunogénicas se pueden combinar con vehículos típicos, tales como lactosa, sacarosa, almidón, talco, estearato de magnesio, celulosa cristalina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, glicerina, alginato sódico o goma arábiga entre otros.

En algunas divulgaciones, las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden administrarse por vía intravenosa, intranasal, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, sublingual, vaginal, rectal u oral. En algunas divulgaciones, la vía de administración es oral, intranasal, subcutánea o intramuscular. En algunas divulgaciones, la vía de administración es la administración intranasal.

45 La vacunación puede realizarse por métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden usar composiciones inmunogénicas en un diluyente adecuado tal como solución salina o agua, o adyuvantes completos o incompletos. La composición inmunogénica se puede administrar por cualquier vía apropiada para provocar una respuesta inmunitaria. La composición inmunogénica se puede administrar una vez o a intervalos periódicos hasta que se provoque una respuesta inmunitaria. Las respuestas inmunitarias pueden detectarse mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, producción de anticuerpos, ensayos de citotoxicidad, ensayo de proliferación y ensayos de liberación de citocinas. Por ejemplo, se pueden extraer muestras de sangre del mamífero inmunizado y analizar la presencia de anticuerpos contra los antígenos de la composición inmunogénica mediante ELISA (véase de Boer et. al., 115 Arch Virol. 147 (1990) y el título de estos anticuerpos se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica.

La dosis exacta que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y debe decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Por ejemplo, se puede administrar un intervalo de 25 µg-900 µg de proteína total mensualmente durante tres meses.

60 Finalmente, el médico responsable del tratamiento decidirá la cantidad de composición inmunogénica o composición de vacuna a administrar a individuos particulares. Como con todas las composiciones inmunogénicas o vacunas, las cantidades inmunológicamente eficaces de los inmunógenos deben determinarse empíricamente. Factores a considerar incluyen la inmunogenicidad, vaya el inmunógeno a formar complejos o no con o adherirse covalentemente a un adyuvante o proteína de vehículo u otro vehículo o no, las vías de administración y el número de dosificaciones inmunizantes a administrar. Tales factores son conocidos en la técnica de las vacunas y está dentro de la habilidad

de los inmunólogos realizar tales determinaciones sin experimentación excesiva.

Kits

5 La presente divulgación también proporciona kits para producir una composición inmunogénica como se divulga en el presente documento que es útil para que un investigador adapte una composición inmunogénica con sus antígenos preferidos, por ejemplo, con fines de investigación para evaluar el efecto de un antígeno, o una combinación de antígenos en la respuesta inmunitaria. Estos kits se pueden preparar a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles. Por ejemplo, dichos kits pueden comprender uno cualquiera o más de los siguientes materiales: un
10 recipiente que comprende un polímero, por ejemplo, un polisacárido, reticulado con una pluralidad de primeras moléculas de afinidad; y un recipiente que comprende una molécula de afinidad complementaria que se asocia con la primera molécula de afinidad, en el que la molécula de afinidad complementaria se asocia con un antígeno.

15 En otra divulgación, el kit puede comprender un recipiente que comprende un polímero, por ejemplo, un polisacárido, un recipiente que comprende una pluralidad de primeras moléculas de afinidad, y un recipiente que comprende un reactivo de reticulación para reticular las primeras moléculas de afinidad con el polímero.

20 En algunas divulgaciones, el kit comprende adicionalmente un medio para unir la molécula de afinidad complementaria al antígeno, donde el medio puede ser un reactivo de reticulación o alguna proteína de fusión intermedia. En algunas divulgaciones, el kit puede comprender al menos un factor de coestimulación que se puede añadir al polímero. En algunas divulgaciones, el kit comprende un reactivo de reticulación, por ejemplo, pero sin limitación, CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio), EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida), cianoborohidruro sódico; bromuro de cianógeno; bicarbonato de amonio/ácido yodoacético para unir el cofactor al polímero.

25 Se puede preparar una variedad de kits y componentes para su uso en los métodos descritos en el presente documento, dependiendo del uso previsto del kit, el antígeno diana particular y las necesidades del usuario.

30 En una divulgación, una composición inmunogénica o composición de vacuna como se describe en el presente documento, cuando se administra a ratones, puede provocar una respuesta inmunitaria que previene un síntoma de enfermedad en al menos el 20 % de los animales estimulados con 5 DL₅₀ de la composición inmunogénica que comprende antígenos contra los cuales se previene el síntoma de la enfermedad. Los expertos en la materia conocen métodos de vacunación y estimulación de un animal inmunizado. Por ejemplo, se puede preparar una alícuota de
35 10 µg de una composición inmunogénica o composición de vacuna como se divulga en el presente documento en 100 µl de PBS y/o con la adición de adyuvante incompleto de Freund e inyectar por vía intramuscular por ratón por vacunación. Como alternativa, se pueden usar inyecciones parenterales, intraperitoneales y en la almohadilla plantar. Los volúmenes de inyecciones en la almohadilla plantar se reducen a 50 µl. Los ratones se pueden inmunizar con una composición inmunogénica o composición de vacuna como se divulga en el presente documento en tres ocasiones distintas con varios días, por ejemplo, 14 días de intervalo entre estas.

40 La eficacia de la vacunación puede probarse estimulando con el patógeno. Siete días después de la última dosis de una composición inmunogénica, los ratones inmunizados se estimularon por vía intranasal con un organismo patógeno del que se derivó el antígeno. Los ratones anestesiados con éter (10 g a 12 g) se pueden infectar por vía intranasal con 50 µl de líquido alantoideo diluido en PBS que contiene 5 DL₅₀ del organismo patógeno. La protección se puede
45 medir controlando la supervivencia de los animales y el peso corporal, que se evalúa durante un período de observación de 21 días. Los ratones gravemente afectados se sacrifican. Una DL₅₀ de A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 es igual a 100-1000 la dosis₅₀ (TCID₅₀) infecciosa del cultivo de tejidos.

50 En otras divulgaciones, los ratones inmunizados pueden estimularse con una variedad de diferentes organismos patógenos, por ejemplo, diferentes organismos patógenos de los que se deriva cada uno de los antígenos unidos al polímero. Por ejemplo, de una composición inmunogénica que comprende cinco antígenos diferentes unidos al polímero, por ejemplo, polisacárido, donde cada antígeno se deriva de cinco organismos patógenos diferentes, los ratones inmunizados pueden estimularse con una variedad de cinco diferentes organismos patógenos, ya sea secuencialmente (en cualquier orden) o simultáneamente. Un experto en la materia podrá determinar la DL₅₀ para
55 cada organismo patógeno utilizado para estimular los ratones inmunizados mediante métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, LaBarre & Lowy, 96 J. Virol. Meths. 107 (2001); Golub, 59J. Immunol. 7 (1948).

60 Se pretende que lo siguiente sea ilustrativo de la presente divulgación; sin embargo, la práctica de la invención no está limitada ni restringida de ninguna manera por los ejemplos.

Ejemplos

65 Los ejemplos presentados en el presente documento se refieren a métodos para generar un complejo inmunogénico como se describe en el presente documento y métodos y composiciones de los mismos. En particular, los ejemplos se refieren a métodos para producir un complejo de presentación de múltiples antígenos (MAP) como se divulga en el presente documento, y métodos de uso para generar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Ejemplo 1. Construcción de rizavidina recombinante y proteínas de fusión de rizavidina-antígeno

5 La rizavidina recombinante (rRhavi) utilizada en estos estudios es una versión modificada N-terminal que contiene solo los restos 45 a 179 de la proteína de tipo silvestre. Para optimizar el nivel de expresión de rRhavi en *E. coli*, la secuencia del gen que codifica los polipéptidos de rizavidina (45-179) fue rediseñada utilizando codones de expresión preferidos por *E. coli*, a continuación se sintetizó y se clonó en el vector PET21b. Para facilitar el plegado correcto y obtener un alto rendimiento de proteína recombinante soluble, se introdujo una secuencia de ADN que codifica una secuencia de señal de localización periplásmica de *E. coli* (19 aminoácidos, MKKIWLALAGLVLAFSASA, SEQ ID NO:1) en el extremo 5' del gen sintético de rRhavi. Se predice que esta secuencia de señal se elimine automáticamente de la proteína recombinante después de su direccionamiento al periplasma de *E. coli* durante el proceso de expresión.

15 Para construir una proteína de fusión de rizavidina-antígeno, se insertó directamente una secuencia de ADN que codifica una región enlazadora flexible que consiste en siete aminoácidos (GGGGSSS, SEQ ID NO:27) en el extremo 3' del gen sintético rRhavi, para ayudar a estabilizar la fusión. Los genes que codifican antígenos candidatos (longitud completa o fragmento deseado) se amplificaron a partir del ADN genómico de los patógenos de interés mediante procedimientos de PCR de rutina y se insertaron en el vector de expresión rRhavi justo más allá de la región enlazadora.

20 Para la expresión de proteínas, los plásmidos que contienen las construcciones diana se transformaron en *E. coli* cepa BL21 (DE3) usando el procedimiento estándar de choque térmico. Se recogió una única colonia fresca de la placa (o se utilizó una solución madre de glicerol más tarde) y se inoculó en 30 ml de medio Luria-Bertani (LB) que contenía ampicilina (Amp+) para un cultivo durante la noche a 37 °C. El día 2, se inoculó un cultivo de partida de 5 ml en 1 litro de medio LB/Amp+ y se cultivó a 37 °C hasta que se alcanzó una $DO_{600}=1$. Después de enfriar el medio a 16 °C, se añadió a los cultivos una concentración final 0,2 mM de IPTG para una inducción durante la noche.

30 Las proteínas se purificaron a partir de la fracción periplásmica usando un protocolo de choque osmótico modificado. Brevemente, se recogieron las células bacterianas del cultivo de 6 litros y se resuspendieron en 120 ml de tampón que contenía Tris 30 mM (pH 8,0), sacarosa al 20 % y EDTA 1 mM. Después de agitar a temperatura ambiente durante 20 min, las células se volvieron a sedimentar mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se recogió como fracción 1 y las células se resuspendieron en 80 ml de una solución helada que contenía $MgCl_2$ 5 mM, inhibidor de proteinasa y ADNasa. Después de agitar a 4 °C durante 20 min, la mezcla se sometió a centrifugación a 13.000 rpm durante 20 min y el sobrenadante se recogió como fracción 2. Después de añadir una concentración final de NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 10 mM e imidazol 10 mM, el sobrenadante que combina la fracción 1 y la fracción 2 se aplicó sobre una columna de Ni-NTA. Las proteínas eluidas de la columna Ni-NTA se purificaron adicionalmente mediante filtración en gel utilizando una columna Superdex 200 que funcionaba con un purificador AKTA. Las fracciones de los picos que contenían la proteína diana se agruparon y concentraron. La concentración de proteína se midió usando un kit de ensayo de proteína BCA de Bio-Rad. Las proteínas purificadas se dividieron en alícuotas, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C para uso futuro.

40 Ejemplo 2. Biotinilación de polisacárido

45 La biotinilación de polisacáridos se realizó utilizando tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) como reactivo de activación. Brevemente, los polisacáridos se disolvieron en agua sin LPS a 10 mg/ml (u otra concentración como se indica). A $t=0$, se añadió lentamente un volumen de CDAP (recién preparado a 100 mg/ml en acetonitrilo) a la solución de polisacárido en una relación de 1-2 mg de CDAP/mg de polisacárido, mientras se agitaba con vórtex. Treinta segundos después, se añadió un volumen de trietilamina (TEA) 0,2 M (igual o doble al volumen de CDAP, dependiendo de los diferentes tipos de polisacárido) para elevar el pH. A los 2,5 min, se añadió un volumen de derivado de biotina (EZ-Link Amine-PEG3-Biotin de Pierce, solubilizado a 20 mg/ml en agua sin LPS) hasta una relación final de 1-1,5 mg de biotina/mg de polisacárido para un acoplamiento durante la noche a 4 °C (o acoplamiento de 1-3 horas a 25 °C). El día 2, se añadió glicina o serina a una concentración final de 50 mM para terminar la reacción y a continuación se desaló la mezcla pasándola por una columna o se dializó contra un gran volumen de PBS para eliminar los derivados de biotina libres. El contenido de biotina en el polisacárido biotinilado se midió utilizando el kit de cuantificación de biotina de Pierce y la concentración de polisacárido se determinó mediante el ensayo de antrona.

55 Ejemplo 3. Ensamblaje y purificación de MAPS

60 Para ensamblar un complejo MAPS, se mezcló un volumen de polisacárido biotinilado con las proteínas de fusión de rRhavi-antígeno candidatas en una relación deseada y a continuación se incubó a 4 °C o 25 °C durante la noche. Tras la incubación, la mezcla se centrifugó a 13.200 rpm durante 3 min para eliminar los agregados de proteínas insolubles. El sobrenadante se aplicó a la cromatografía de filtración en gel, usando una columna Superpose-6 o Superdex-200, con PBS, tampón Tris o solución salina como solución para el análisis. Se recogieron y concentraron las fracciones de pico que contenían un complejo de peso molecular elevado. El contenido de proteína y la relación entre los diferentes antígenos en el complejo MAPS se probó mediante SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie, y la relación proteína/polisacárido de MAPS se determinó usando el kit de ensayo de proteína BCA y el ensayo de antrona.

65

Ejemplo 4. Inmunización; análisis de anticuerpos y citocinas; estimulación en ratones

5 Todas las composiciones inmunogénicas y vacunas se prepararon el día antes de la inmunización. La vacuna antineumocócica de células enteras, MAPS o una mezcla equimolar que contiene todos los antígenos específicos, rizavidina, polisacárido y biotina se diluyeron con solución salina a la concentración indicada y a continuación se mezclaron con Al(OH)₃ en un tubo cónico de 15 ml para adsorción durante la noche a 4 °C.

10 Se utilizaron ratones C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) en todos los experimentos de la inmunización. La edad en el momento de la primera inmunización era de 4 a 6 semanas. Los ratones no anestesiados y suavemente inmovilizados, recibieron 3 inyecciones subcutáneas de 200 µl de adyuvante con o sin la cantidad indicada de antígeno en la parte inferior del lomo a intervalos de 2 semanas. Se extrajo sangre 2 semanas después de la segunda y/o tercera inmunización, y se analizó la producción de anticuerpos y citocinas *in vitro* después de la estimulación con antígeno de células completas (WCA) neumocócicas, extracto de TB o antígeno proteico particular.

15 La estimulación se realizó 2 semanas después de la última inmunización o sangrado. En el modelo de colonización de NP, los ratones fueron estimulados por vía intranasal con 2x10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC) de cepa 0603 de serotipo 6B en 20 µl de PBS. Para determinar la presencia y el grado de colonización de NP, se realizó un cultivo de vías respiratorias superiores 10 días después instilando solución salina estéril retrógrada a través de la tráquea seccionada, recogiendo las primeras 6 gotas (aproximadamente 0,1 ml) de las fosas nasales y sembrando muestras puras o diluidas en placas de agar sangre que contienen 2,5 µg de gentamicina/ml.

20 En el modelo de provocación por aspiración-sepsis, los ratones se anestesiaron suavemente con isoflorano, se mantuvieron en decúbito supino y se les administró 100 µl de una inoculación intranasal que contiene 10⁶ de UFC de neumococos de la cepa WU-2 serotipo 3. Los ratones fueron controlados dos veces al día y sacrificados por inhalación de CO₂ y exanguinación terminal cuando presenta signos de enfermedad, tras lo cual se obtuvo un hemocultivo.

30 Los ensayos de anticuerpos murinos contra WCA o diferentes antígenos proteicos se realizaron en placas Immulon 2 HB de 96 micropocillos (Thermo Scientific, Waltham, MA) recubiertas con WCA (100 µg de proteína/ml de PBS) o con antígenos proteicos (1 µg de proteína/ml de PBS). Las placas se bloquearon con BSA al 1 % en PBS. Se añadió anticuerpo diluido en PBS-T y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Las placas se lavaron con PBS-T y se añadió anticuerpo secundario conjugado con HRP a inmunoglobulina G de ratón (de Sigma) y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se lavaron y revelaron con SureBlue TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL, Gaithersburg, MD).

35 Para la estimulación de citocinas, los estimulantes se diluyeron en medio de estimulación (DMEM (BioWhittaker, Walkersville, MD) que contenía FBS de definición baja en endotoxinas al 10 %, (Hyclone, Logan, UT), 2-mercaptoetanol 50 µM (Sigma) y ciprofloxacino (10 µg/ml, Cellgro, Manassas, VA)), a una concentración de 1 µg/ml-10 µg/ml para todos los antígenos proteicos, o para el WCA neumocócico. Se añadieron 25 µl de sangre heparinizada a 225 µl de medio DMEM con/sin estimulantes y se cultivó a 37 °C durante 6 días. Los sobrenadantes se recogieron después de la centrifugación y se almacenaron a -80 °C hasta que se analizaron mediante ELISA para determinar la concentración de IL-17A o IFN-γ (R&D Systems, Mineápolis, MN).

45 Para la estimulación de los esplenocitos, se aislaron esplenocitos de ratón, se resuspendieron en medio de estimulación y a continuación se sembraron en una placa de 48 pocillos (3x10⁶ células/pocillo, en 300 µl de volumen). Después de la incubación a 37 °C durante 2 h, se añadieron estímulos a la concentración indicada, para la estimulación a 37 °C durante 3 días. Los sobrenadantes se recogieron después de la centrifugación y se almacenaron a -80 °C hasta que se analizaron mediante ELISA para determinar la concentración de IL-17A o IFN-γ.

50 Las concentraciones de anticuerpos e IL-17A y las densidades de colonización de NP se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney usando PRISM (versión 4.0a para Macintosh, GraphPad Software, Inc). Las diferencias en la supervivencia se analizaron con la prueba de Kaplan-Meier, utilizando también PRISM.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de al menos un polisacárido antigénico, una cantidad inmunológicamente eficaz de al menos un antígeno peptídico o polipeptídico y al menos un par de moléculas de afinidad, en donde el o cada par comprende una primera molécula de afinidad y una segunda molécula de afinidad complementaria a la primera molécula de afinidad, en donde, en el o en cada par:
 - la primera molécula de afinidad está asociada a uno del al menos un polisacárido antigénico, y
 - la segunda molécula de afinidad complementaria está asociada a uno del al menos un antígeno peptídico o polipeptídico, y
 - la o cada primera molécula de afinidad se asocia de forma no covalente a la o a cada segunda molécula de afinidad complementaria para unir el o los antígenos peptídicos o polipeptídicos y el o los polisacáridos antigénicos; y
 - en donde la composición inmunogénica puede provocar (i) una respuesta inmunitaria a el al menos un polisacárido antigénico, y (ii) una respuesta inmunitaria al por lo menos un antígeno peptídico o polipeptídico, en un sujeto después de la administración de la composición al sujeto.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que la o cada primera molécula de afinidad está reticulada o unida covalentemente al polisacárido antigénico.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el al menos un par de moléculas de afinidad se selecciona del grupo que consiste en: biotina/proteína de unión a biotina, anticuerpo/antígeno, enzima/sustrato, receptor/ligando, metal/proteína de unión a metal, hidrato de carbono/proteína de unión a hidrato de carbono, lípido/proteína de unión a lípido y etiqueta His/sustancia de unión a etiqueta His.
4. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que la o cada primera molécula de afinidad es biotina o un derivado o imitador de la molécula de la misma, y en la que la o cada segunda molécula de afinidad complementaria se selecciona del grupo que consiste en: una proteína de unión a biotina, una proteína similar a avidina, tales como, rizavidina, avidina y estreptavidina, o un derivado o una parte funcional de las mismas.
5. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que al menos uno de los antígenos peptídicos o polipeptídicos es una proteína de fusión que comprende el antígeno peptídico o polipeptídico fusionado con la segunda molécula de afinidad complementaria.
6. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que la o cada segunda molécula de afinidad complementaria está unida de forma no covalente o covalente a al menos uno de los antígenos peptídicos o polipeptídicos.
7. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el polisacárido antigénico es un polisacárido antigénico de cadena ramificada o un polisacárido antigénico de cadena lineal.
8. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, que comprende además un péptido enlazador flexible unido al antígeno peptídico o polipeptídico, en la que el péptido enlazador flexible une el antígeno peptídico o polipeptídico a la segunda molécula de afinidad complementaria.
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que al menos uno de los antígenos peptídicos o polipeptídicos es de un organismo patógeno o un tumor, por ejemplo, en la que al menos uno de dichos antígenos peptídicos o polipeptídicos de un organismo patógeno se selecciona del grupo que consiste en: antígenos neumocócicos, antígenos de tuberculosis, antígenos del ántrax, antígenos del VIH, antígenos de *E. coli*, antígenos de Salmonella, antígenos de Enterobacter, antígenos de Klebsiella, antígenos de Citrobacter, antígenos de tos ferina, antígenos meningocócicos, antígenos de Haemophilus, antígenos de Pseudomonas, antígenos de *Staphylococcus aureus*, antígenos estacionales o epidémicos de la gripe, antígenos del VPH, toxoides, toxinas o partes de toxinas, antígenos fúngicos, antígenos víricos, antígenos de cáncer, o combinaciones de los mismos.
10. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende entre 2-10 antígenos peptídicos o polipeptídicos diferentes, o entre 10-20 antígenos peptídicos o polipeptídicos diferentes, o entre 20-50 antígenos peptídicos o polipeptídicos diferentes, o entre 50-100 antígenos peptídicos o polipeptídicos diferentes, o más de 100 antígenos peptídicos o polipeptídicos diferentes, en donde los antígenos peptídicos o polipeptídicos diferentes se seleccionan del grupo que consiste en: antígenos peptídicos o polipeptídicos distintos del mismo o diferente organismo patógeno o tumor, variantes diferentes del mismo antígeno peptídico o polipeptídico, o diferentes dominios o partes del mismo antígeno peptídico o polipeptídico.
11. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el polisacárido antigénico se selecciona del grupo que consiste en: polisacárido capsular Vi de *Salmonella typhi*, polisacáridos capsulares neumocócicos, polisacáridos de la pared celular neumocócica, polisacárido capsular de Tipo b (Hib) de *Haemophilus influenzae*, polisacárido de *Haemophili*, polisacárido meningocócico, polisacárido capsular de *Staphylococcus aureus*, polisacárido de *Bacillus anthracis*, polisacáridos de Streptococcus (por ejemplo, Gp A y Gp B), polisacárido de Pseudomonas, polisacáridos

fúngicos, polisacáridos virales (por ejemplo, glicoproteína) o polisacáridos derivados de células cancerosas.

12. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que además comprende al menos un factor de coestimulación asociado con el polisacárido antigénico.

5 13. Una composición de la reivindicación 1 para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto al por lo menos un antígeno peptídico o polipeptídico o al polisacárido antigénico, comprendiendo el método administrar la composición al sujeto.

10 14. La composición para su uso en la reivindicación 13, en la que la respuesta inmunitaria se selecciona de:

(i) un anticuerpo o una respuesta de linfocitos B;

(ii) un anticuerpo y una respuesta de linfocitos B;

(iii) un anticuerpo o una respuesta de linfocitos B y linfocitos T; o

15 (iv) una respuesta de linfocitos T CD4+, incluyendo respuesta de Th1, Th2 o Th17, o una respuesta de linfocitos T CD8+, o una respuesta de linfocitos T CD4+/CD8+.

15. Un kit que comprende:

20 (i) un recipiente que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de al menos un polisacárido antigénico asociado a al menos una primera molécula de afinidad; y

(ii) (a) un recipiente que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de al menos un antígeno peptídico o polipeptídico, en donde el o cada péptido o polipéptido está asociado a una segunda molécula de afinidad que es complementaria y puede asociarse a la primera molécula de afinidad, opcionalmente en donde la segunda molécula de afinidad complementaria está unida covalentemente a un antígeno peptídico o polipeptídico para formar una proteína de fusión; o

(b) un recipiente que comprende un vector de expresión para expresar una proteína de fusión que comprende un antígeno peptídico o polipeptídico fusionado con una segunda molécula de afinidad para expresar una cantidad inmunológicamente eficaz de la proteína de fusión, en donde la segunda molécula de afinidad es complementaria y se asocia a la primera molécula de afinidad, en donde el vector de expresión puede comprender opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido enlazador, en donde el vector de expresión puede expresar la proteína de fusión que comprende un péptido enlazador entre el antígeno peptídico o polipeptídico y la segunda molécula de afinidad complementaria, y

(iii) que comprende opcionalmente un recipiente que comprende al menos un factor de coestimulación y opcionalmente al menos un reactivo de reticulación seleccionado del grupo que consiste en: CDAP (tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio), EDC (clorhidrato de (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida), cianoborohidruro sódico, bromuro de cianógeno o bicarbonato de amonio/ácido yodoacético para unir el cofactor al polisacárido antigénico,

en donde la o cada primera molécula de afinidad se asocia de forma no covalente a la o cada segunda molécula de afinidad complementaria para unir el o los antígenos peptídicos o polipeptídicos y el o los polisacáridos antigénicos; y en donde la composición inmunogénica puede provocar (1) una respuesta inmunitaria al por lo menos un polisacárido antigénico, y (2) una respuesta inmunitaria al por lo menos un antígeno peptídico o polipeptídico, en un sujeto después de la administración de la composición al sujeto.

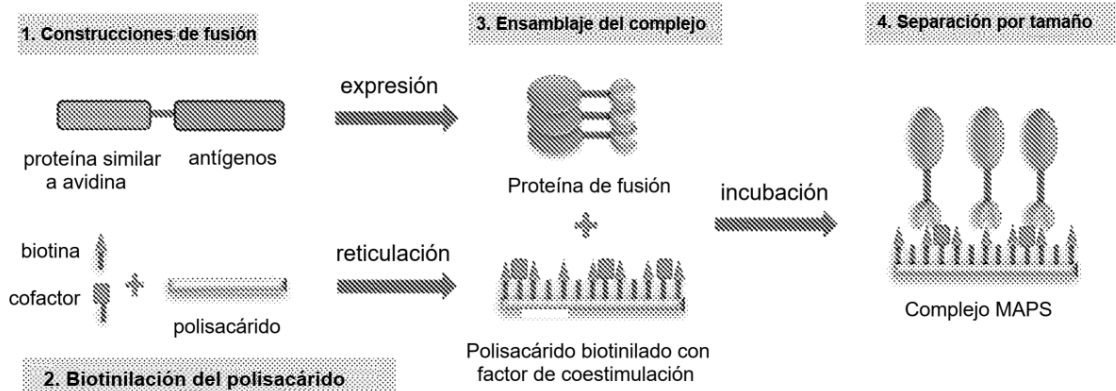


Figura 1

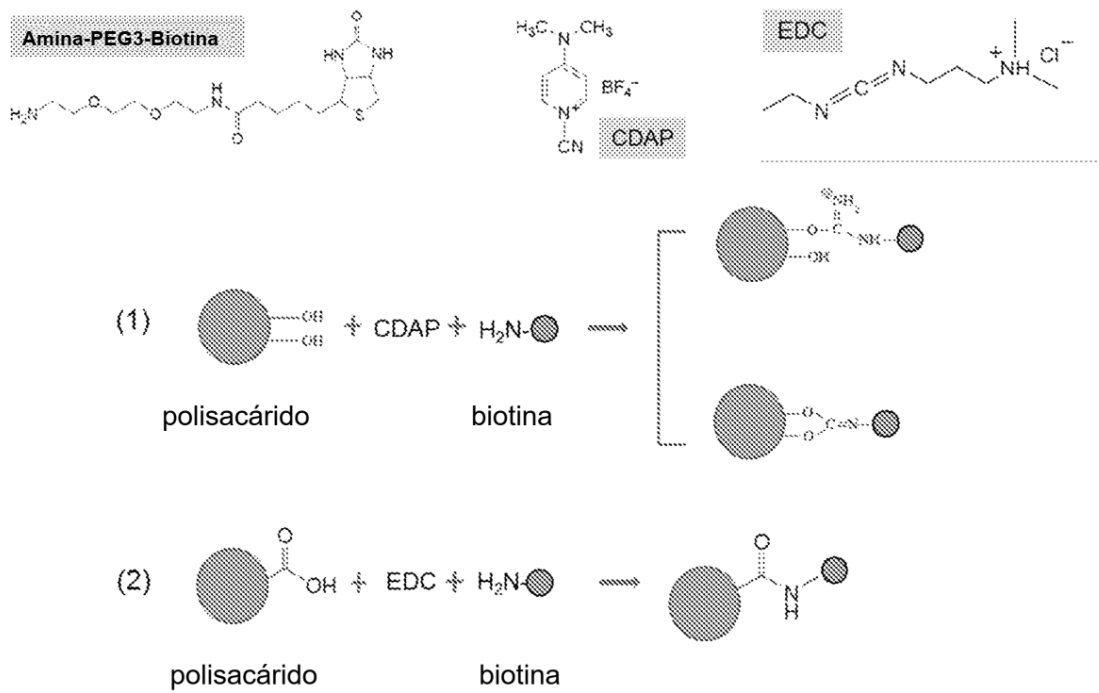


Figura 2

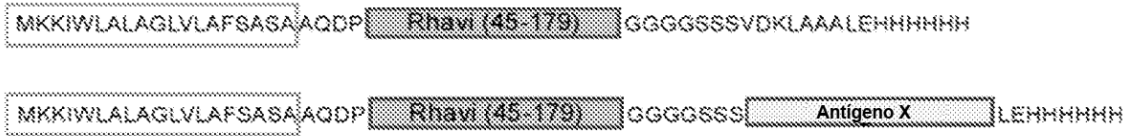


Figura 3A

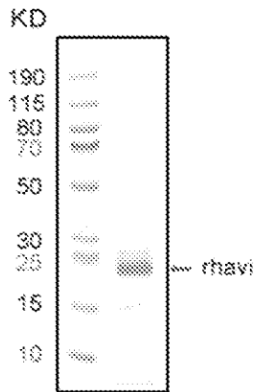


Figura 3B

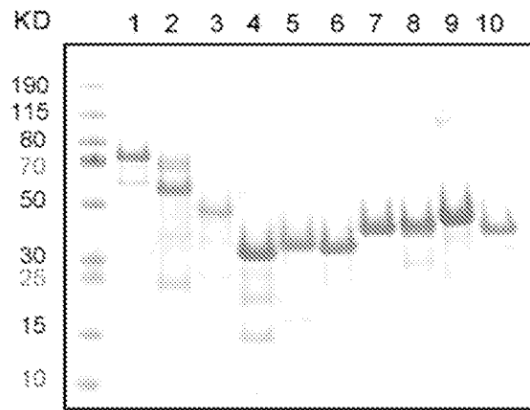


Figura 3C

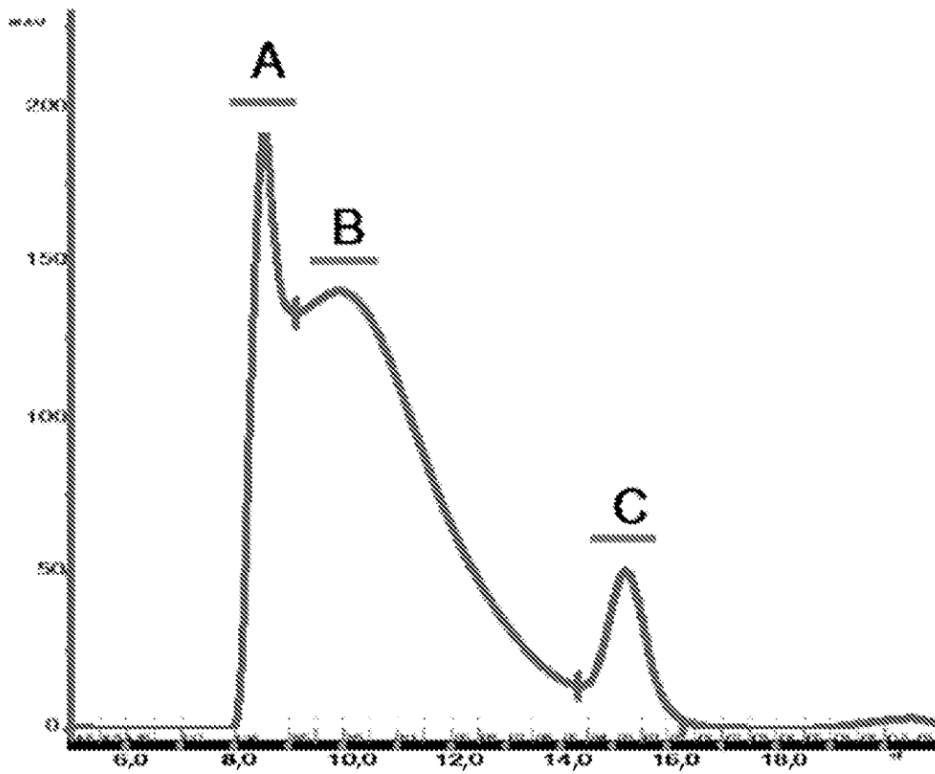


Figura 4A .

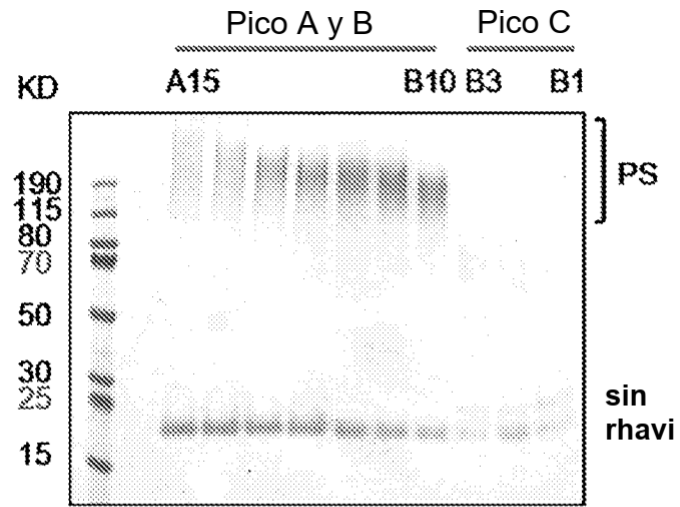


Figura 4B

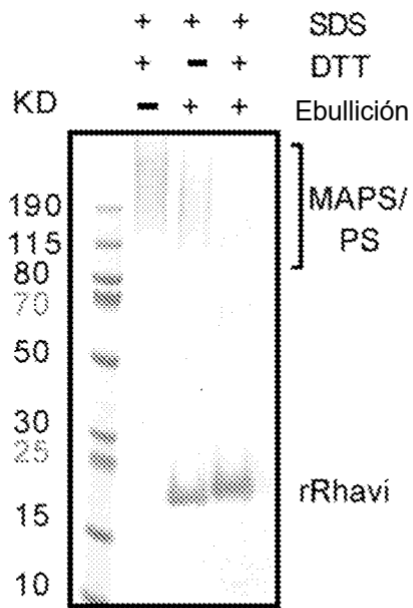


Figura 4C

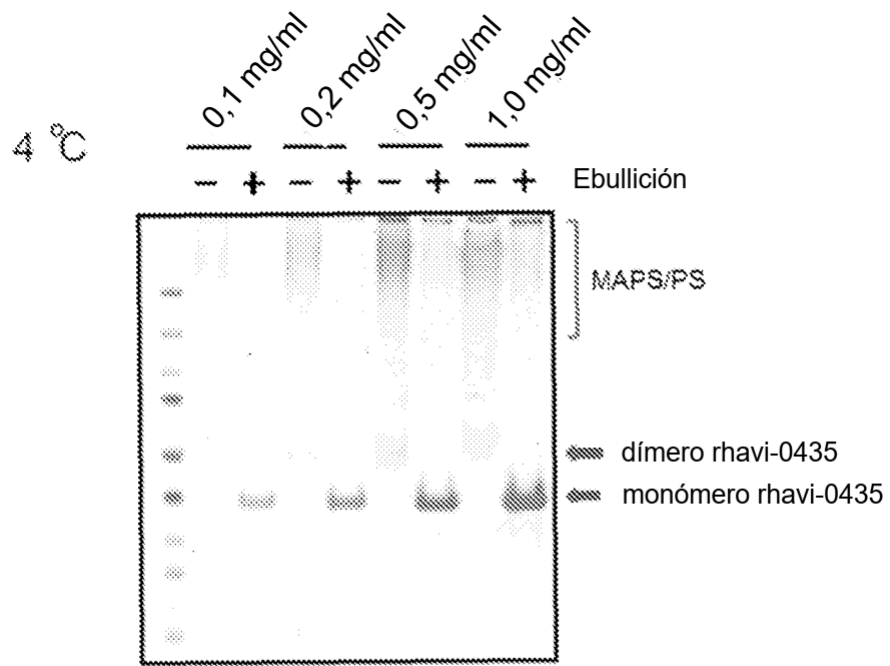


Figura 5A

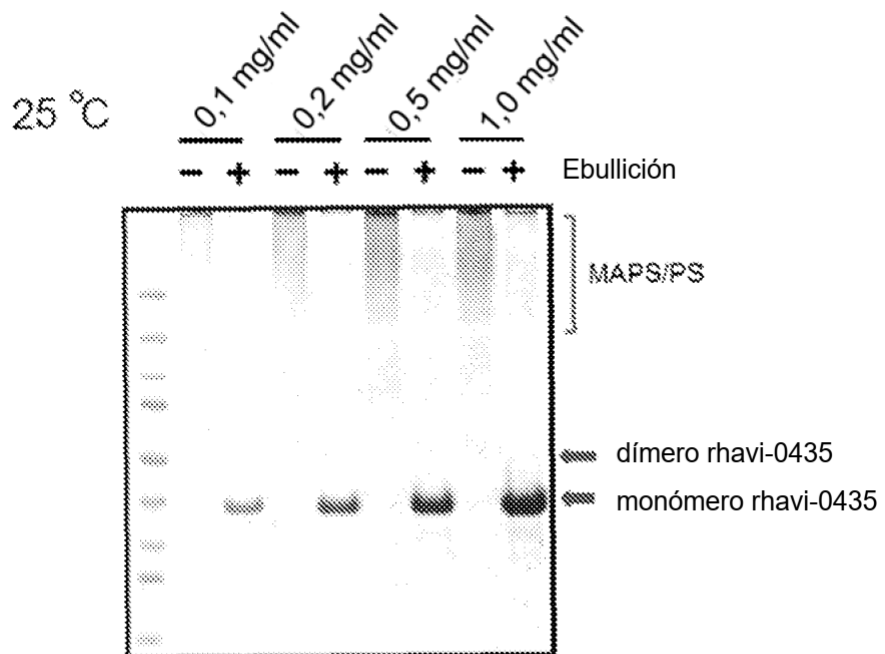


Figura 5B

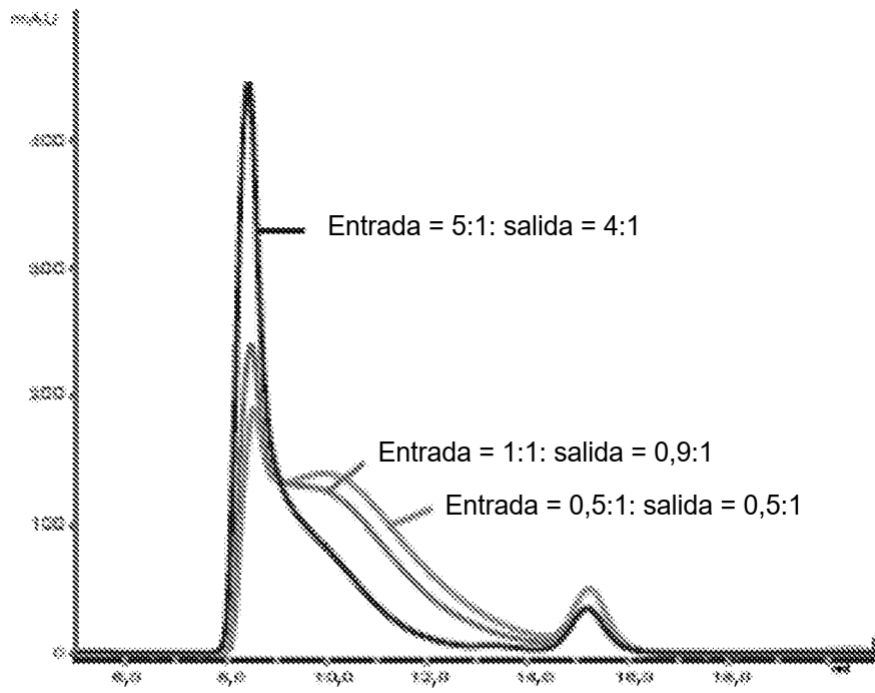


Figura 6

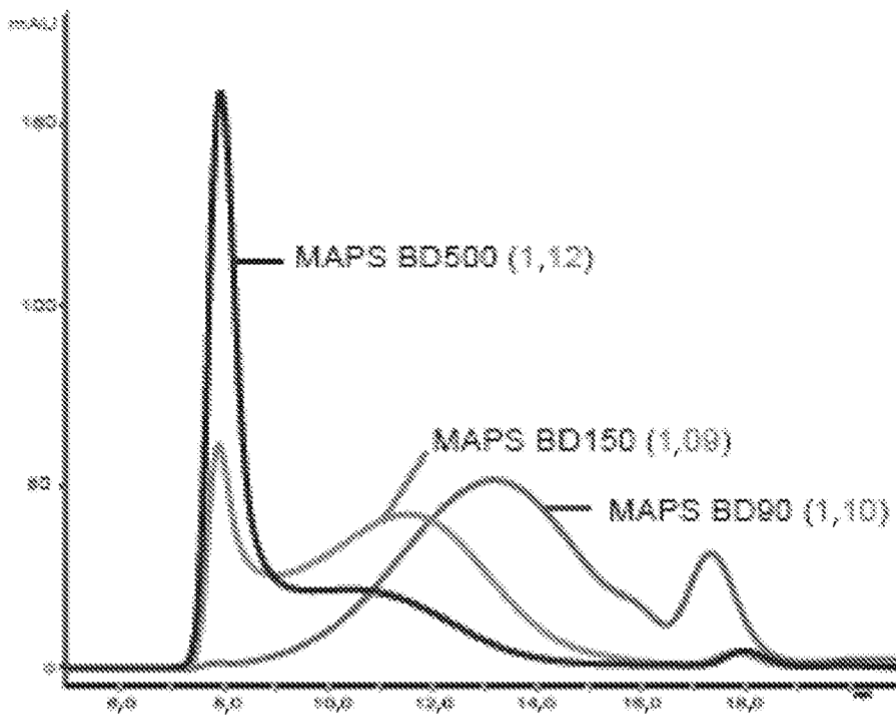


Figura 7

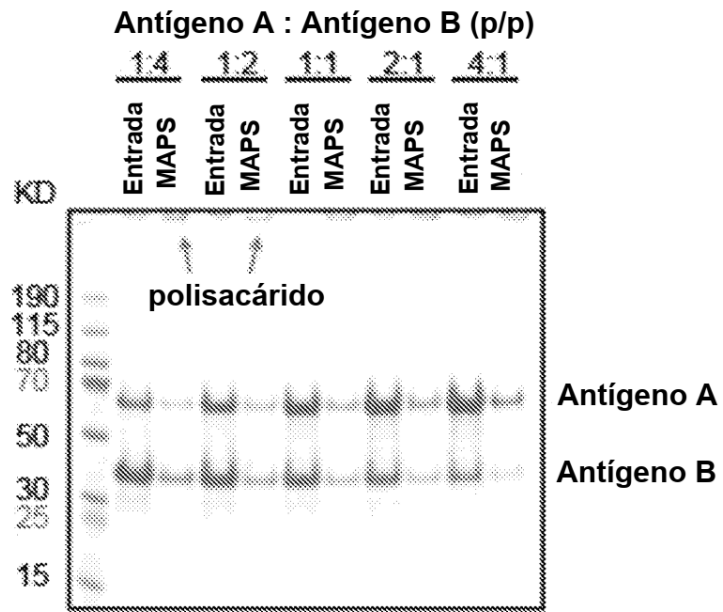


Figura 8A

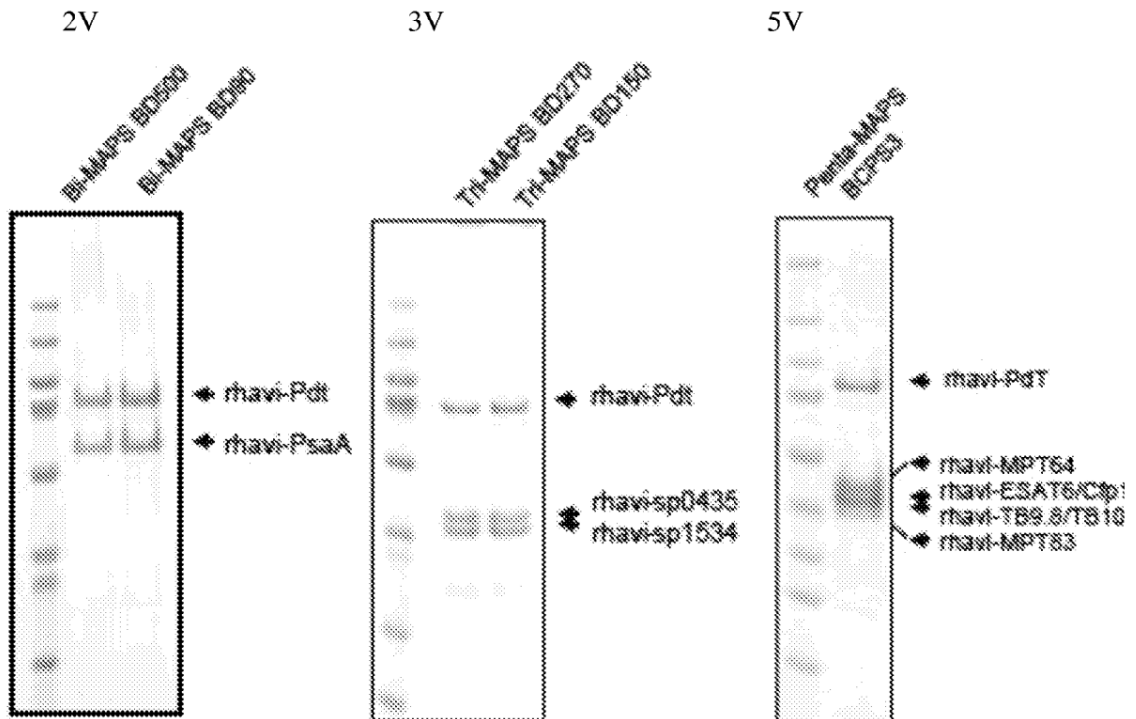


Figura 8B

Figura 8C

Figura 8D

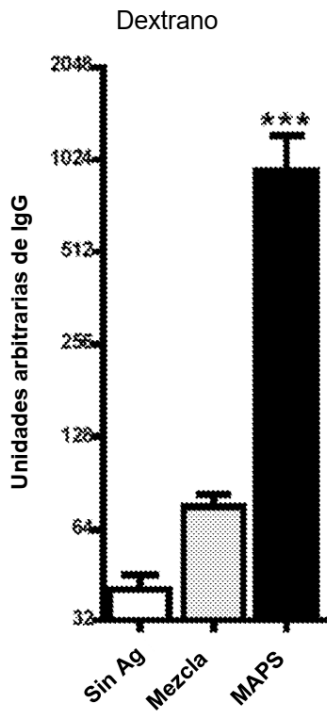


Figura 9A

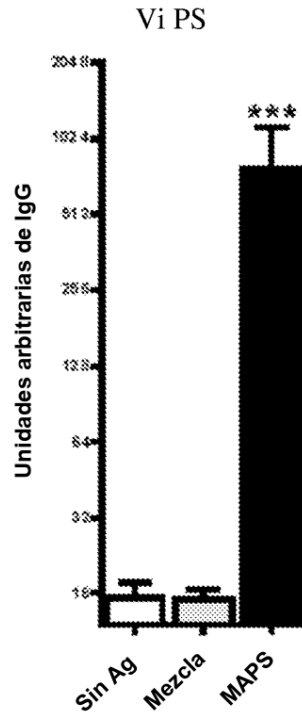


Figura 9B

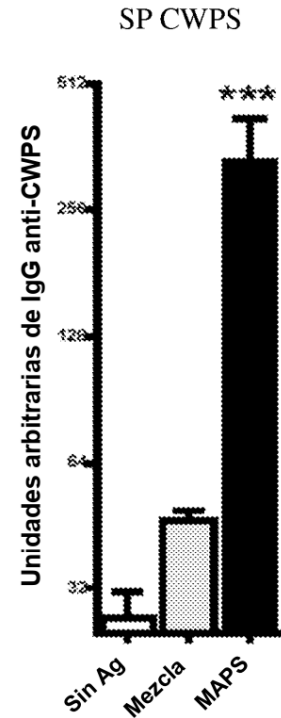


Figura 9C

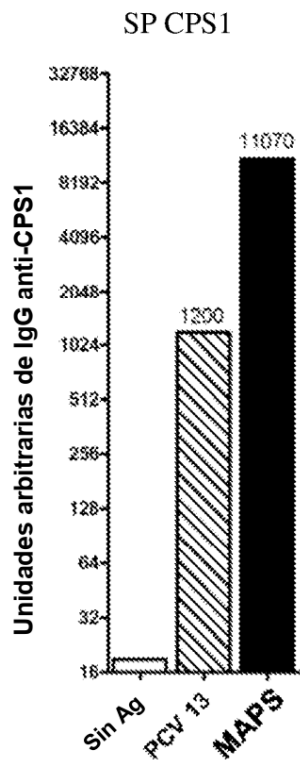


Figura 9D

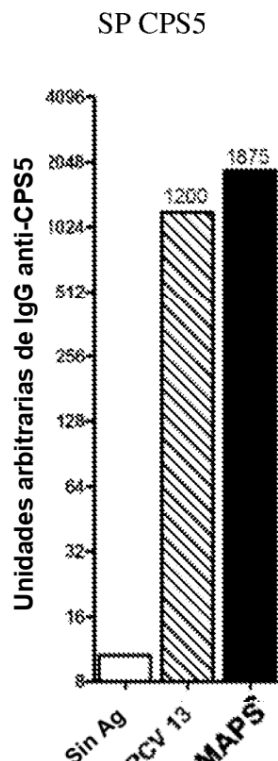


Figura 9E

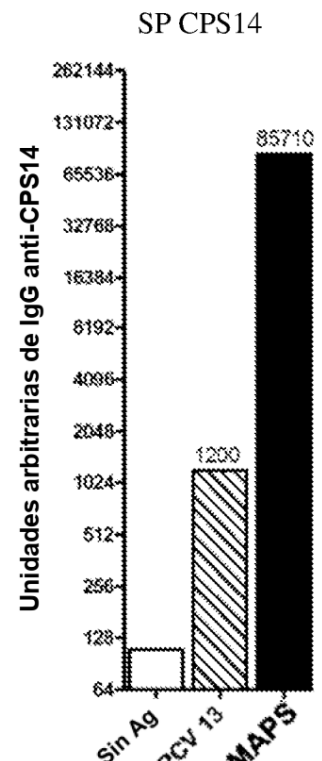


Figura 9F

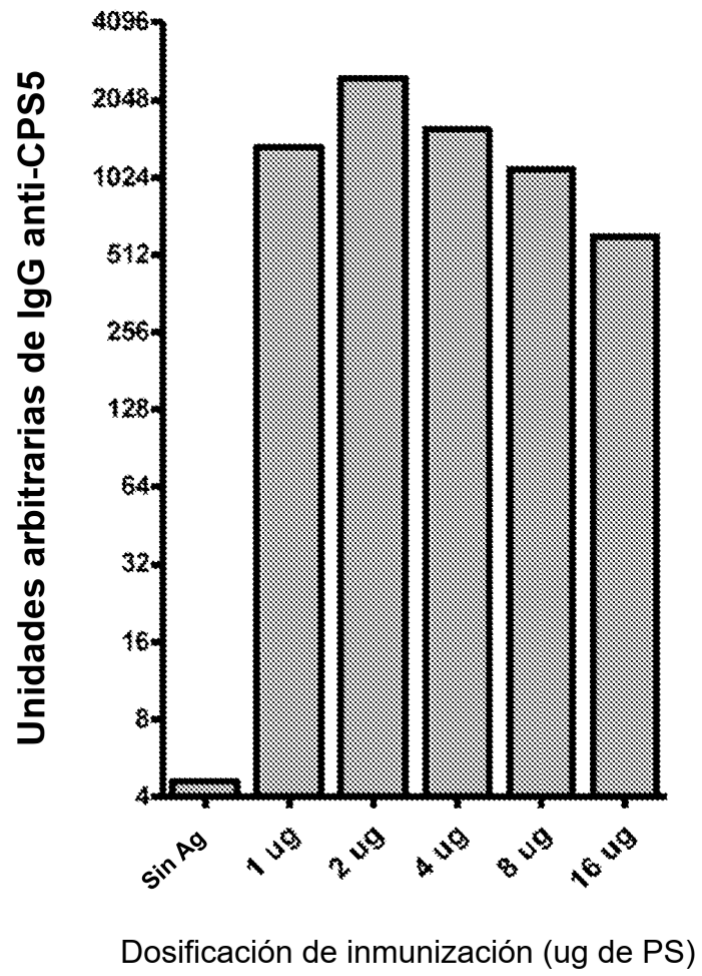


Figura 10

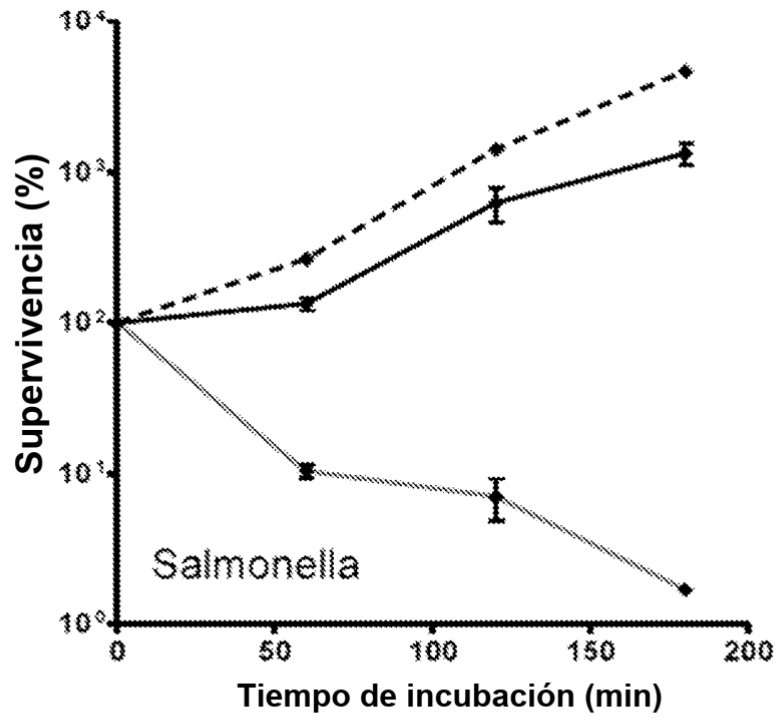


Figura 11A

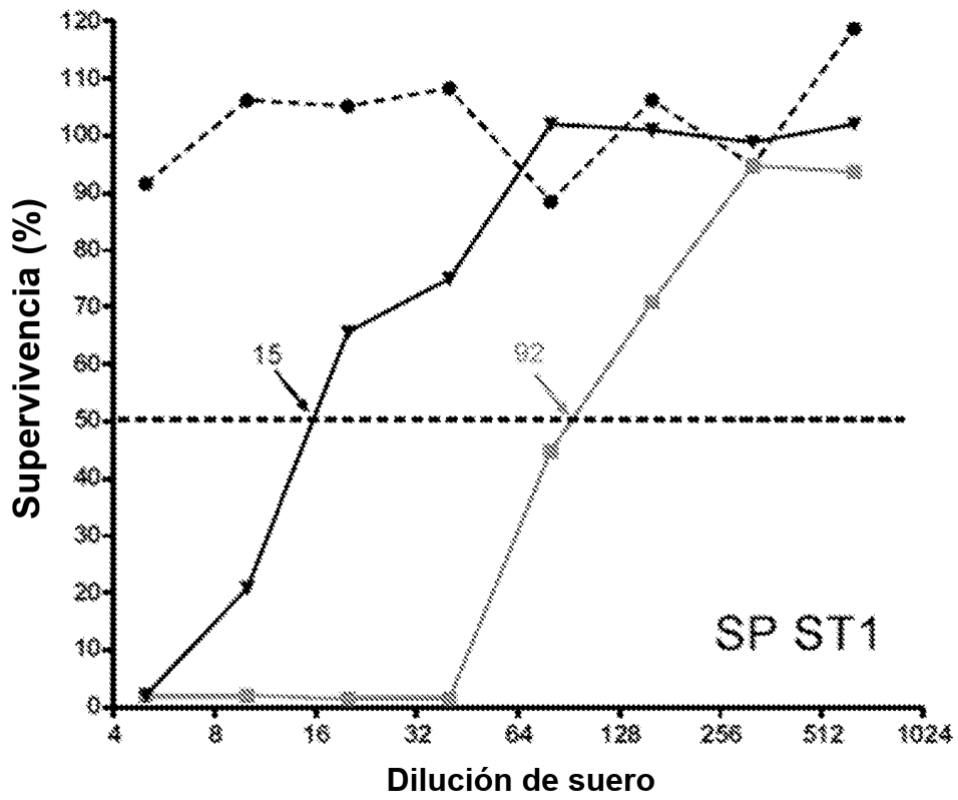


Figura 11B

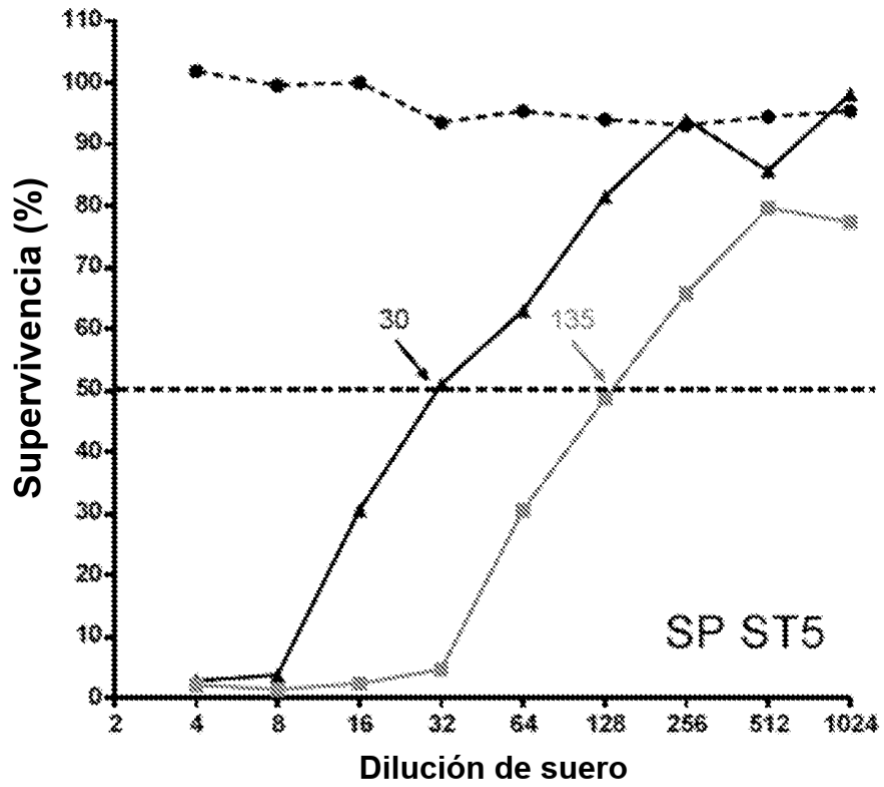


Figura 11C

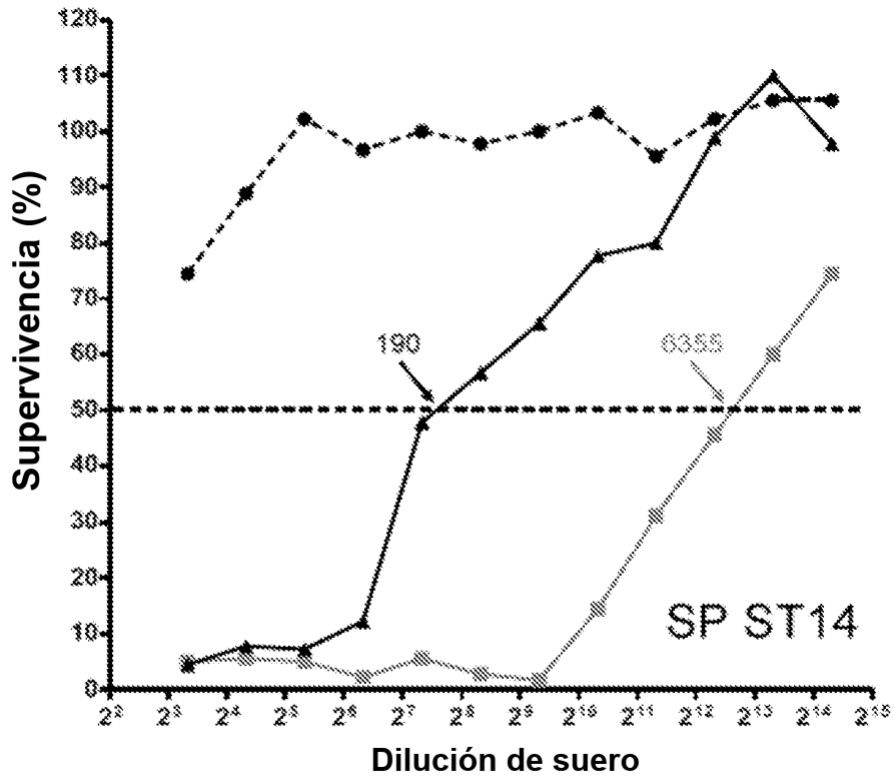


Figura 11D

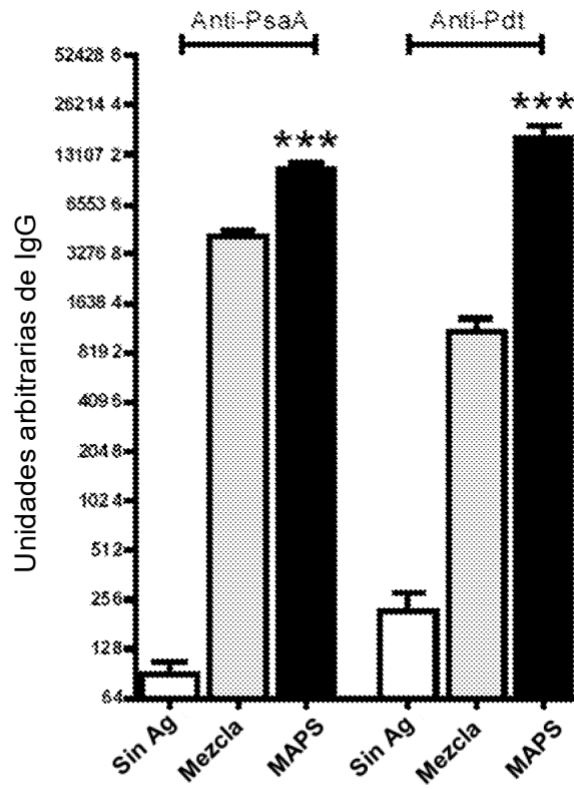


Figura 12A

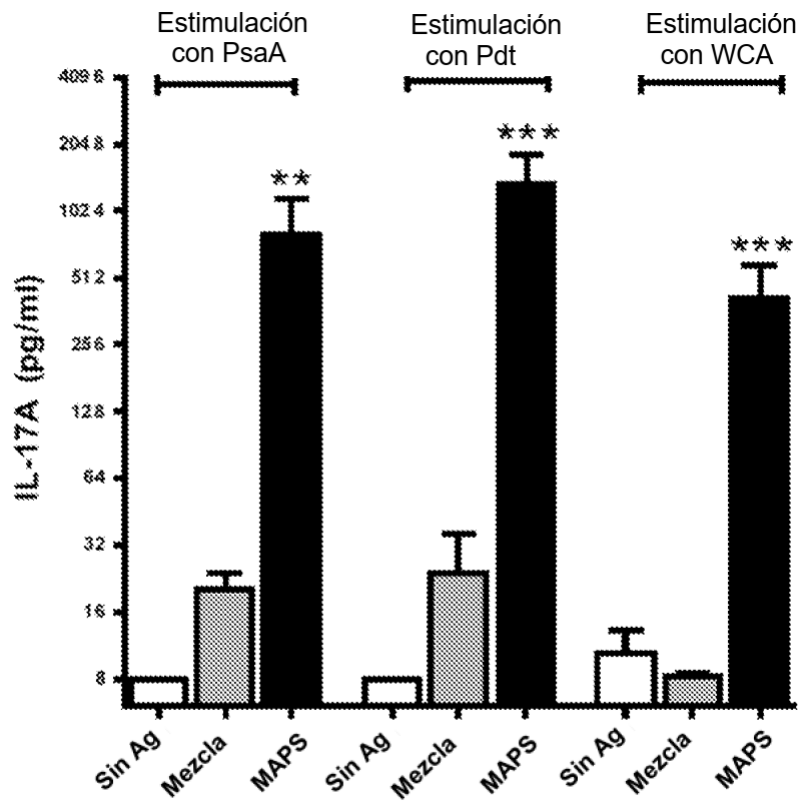


Figura 12B

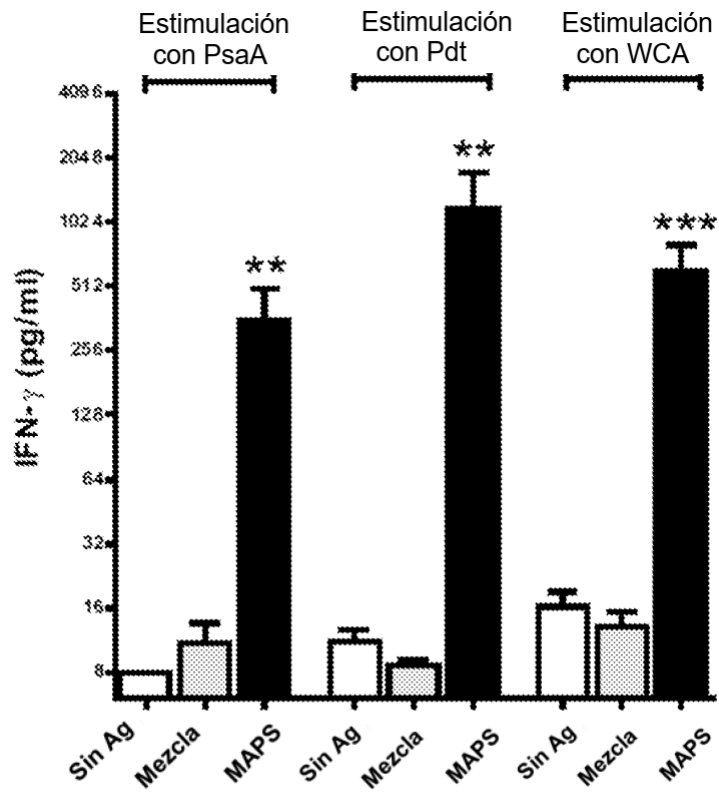


Figura 12C

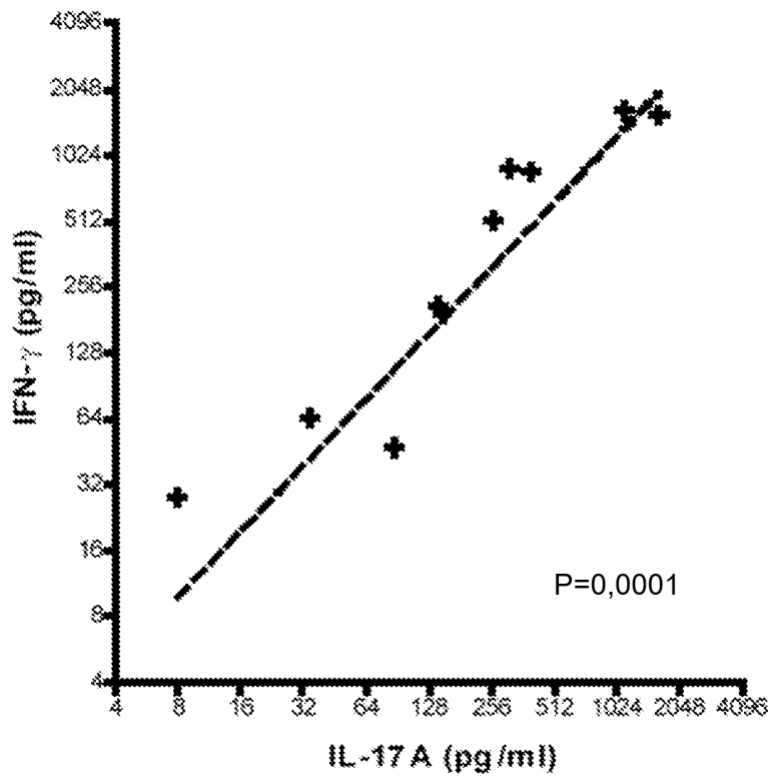


Figura 12D

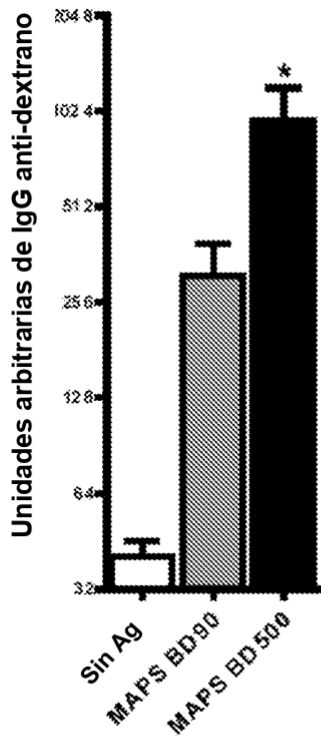


Figura 13A

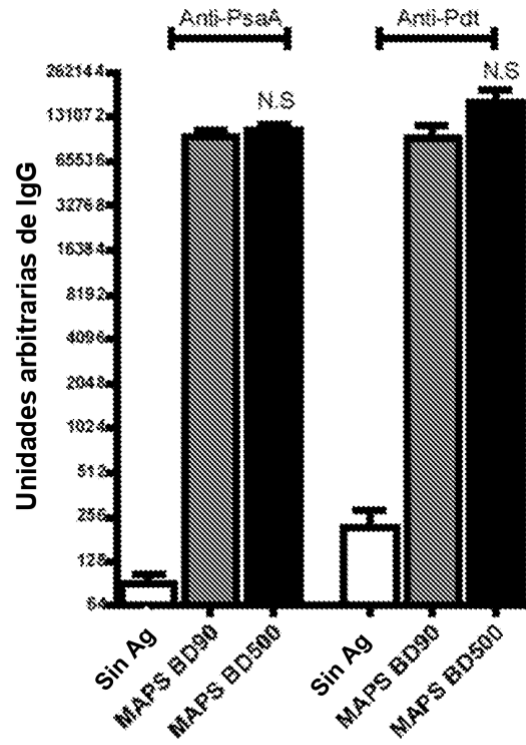


Figura 13B

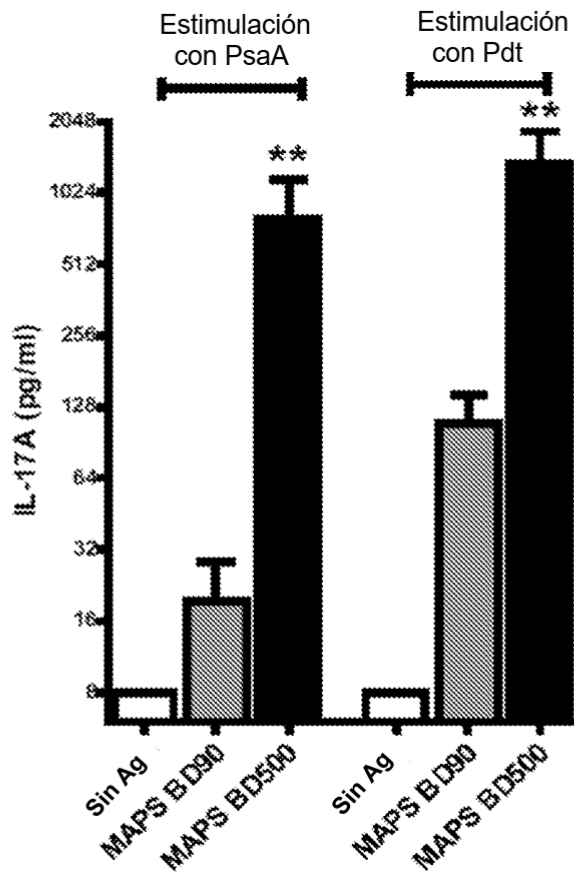


Figura 13C

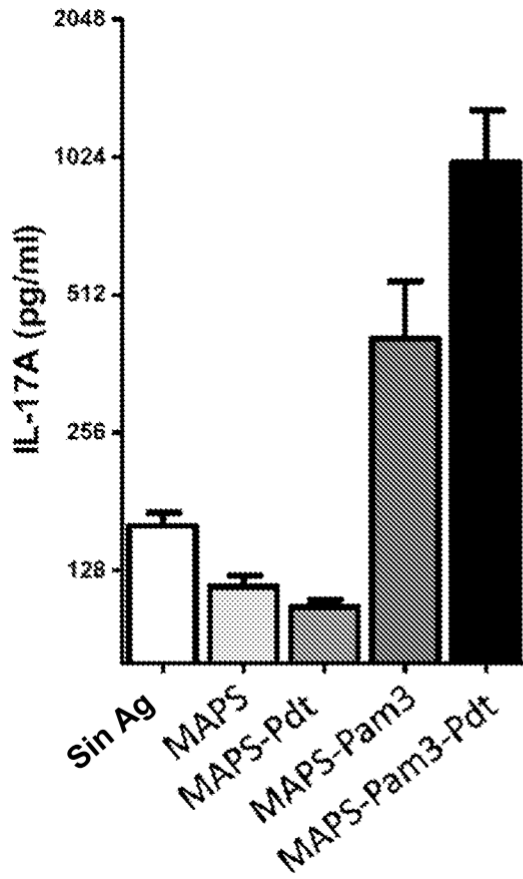


Figura 14A

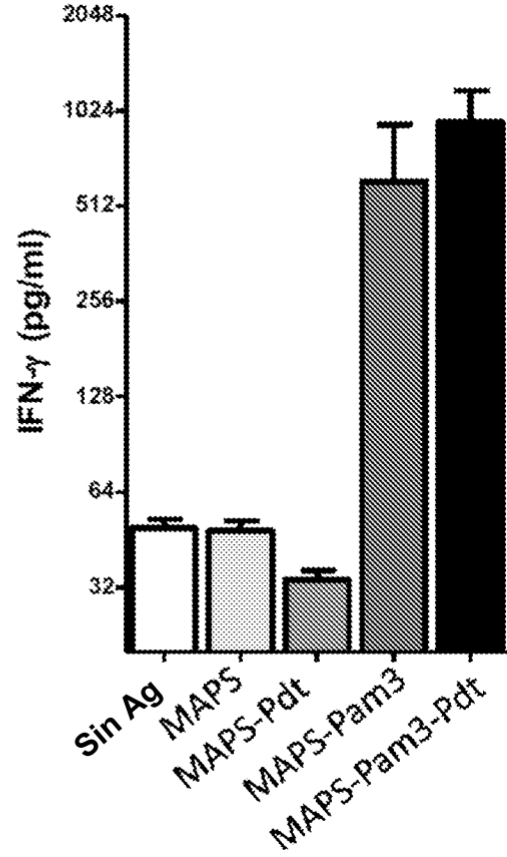


Figura 14B

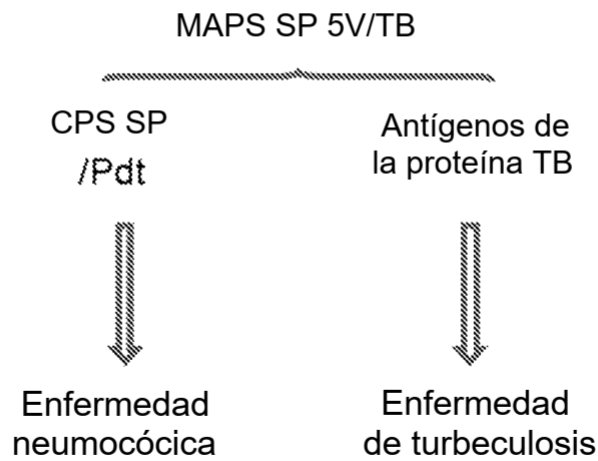


Figura 15A

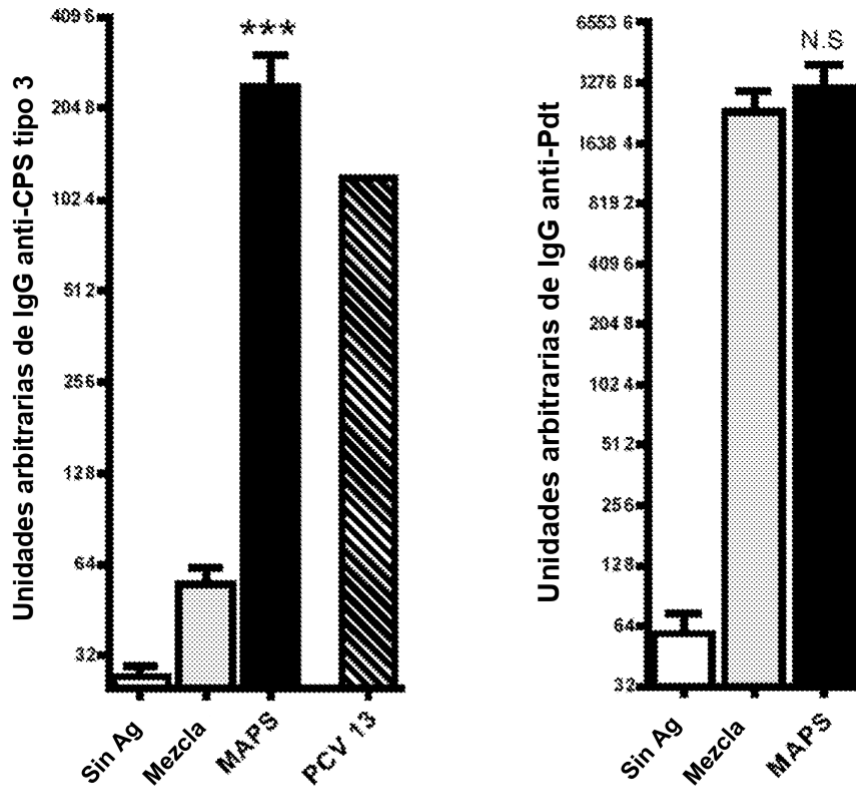


Figura 15B

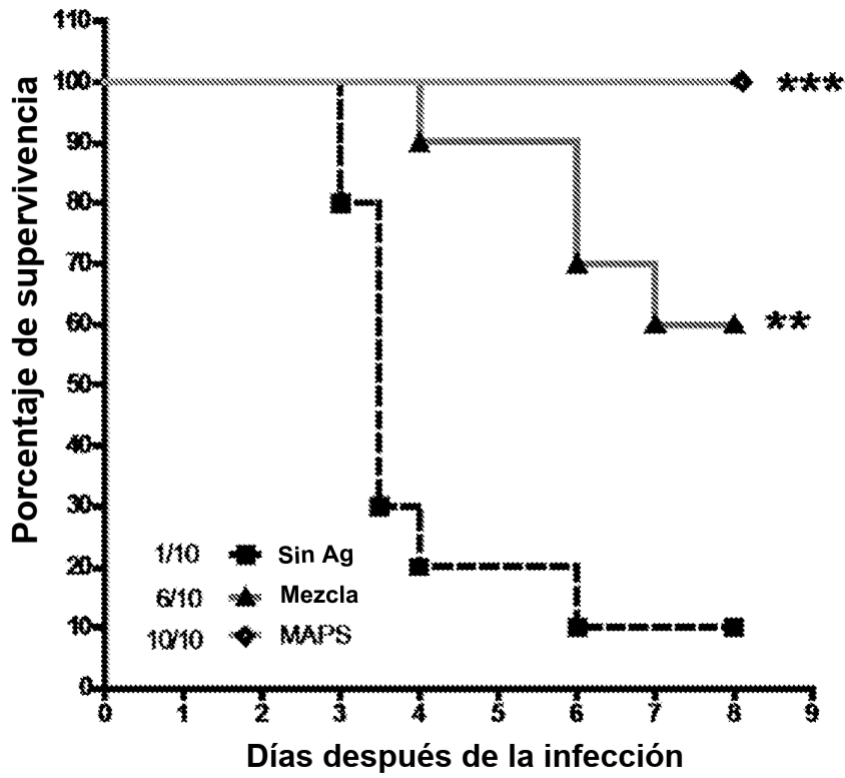


Figura 15C

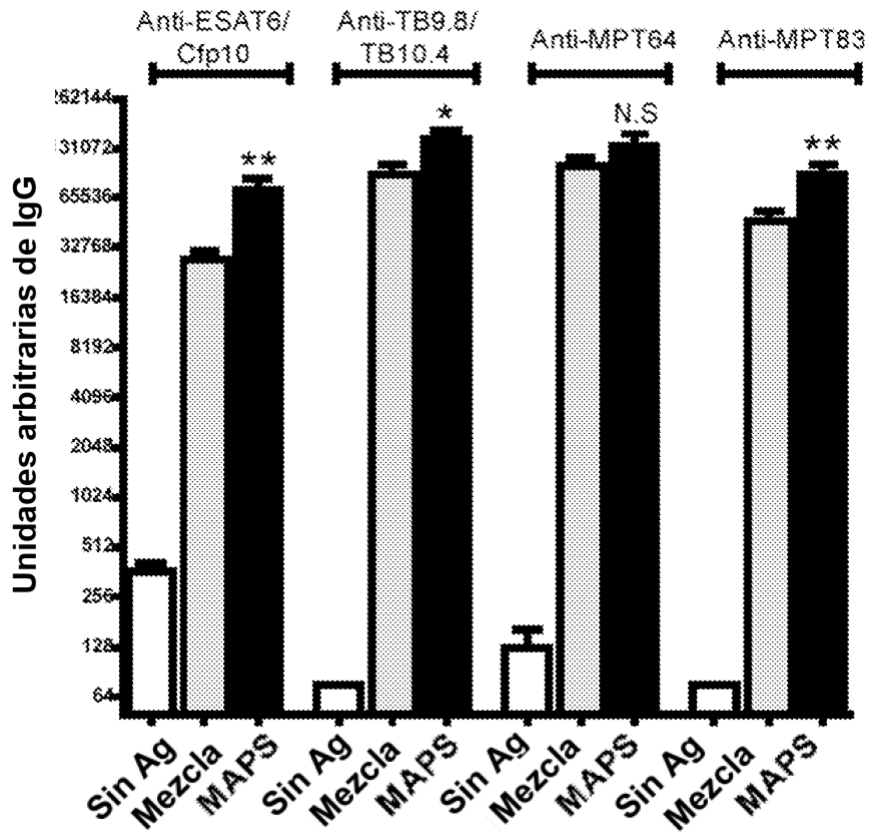


Figura 15D

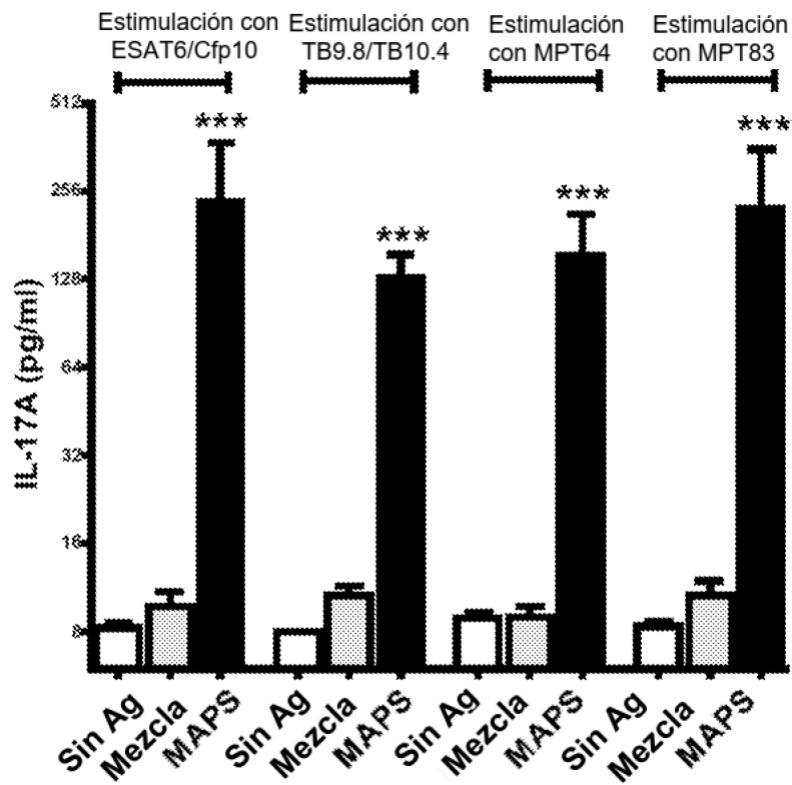


Figura 15E

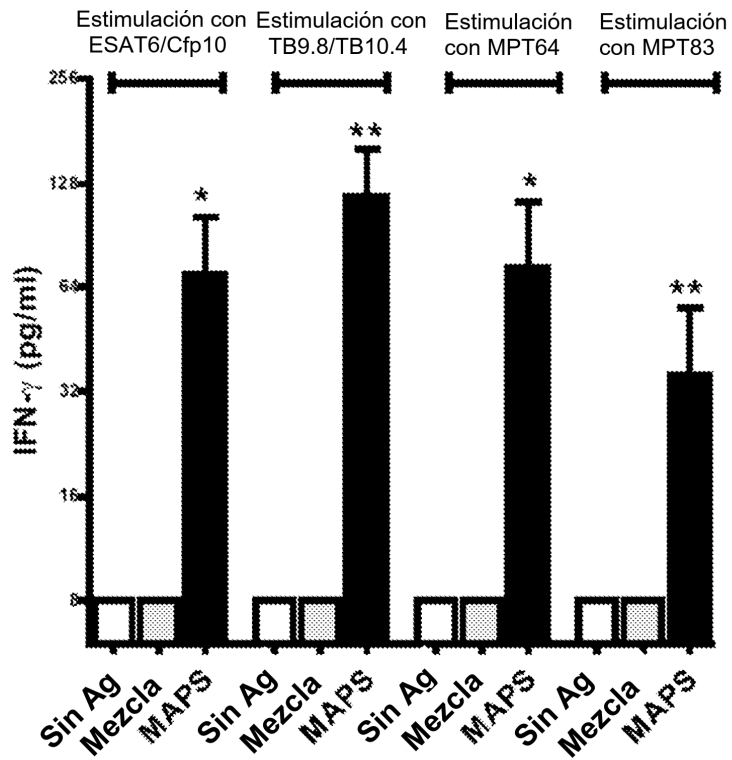


Figura 15F

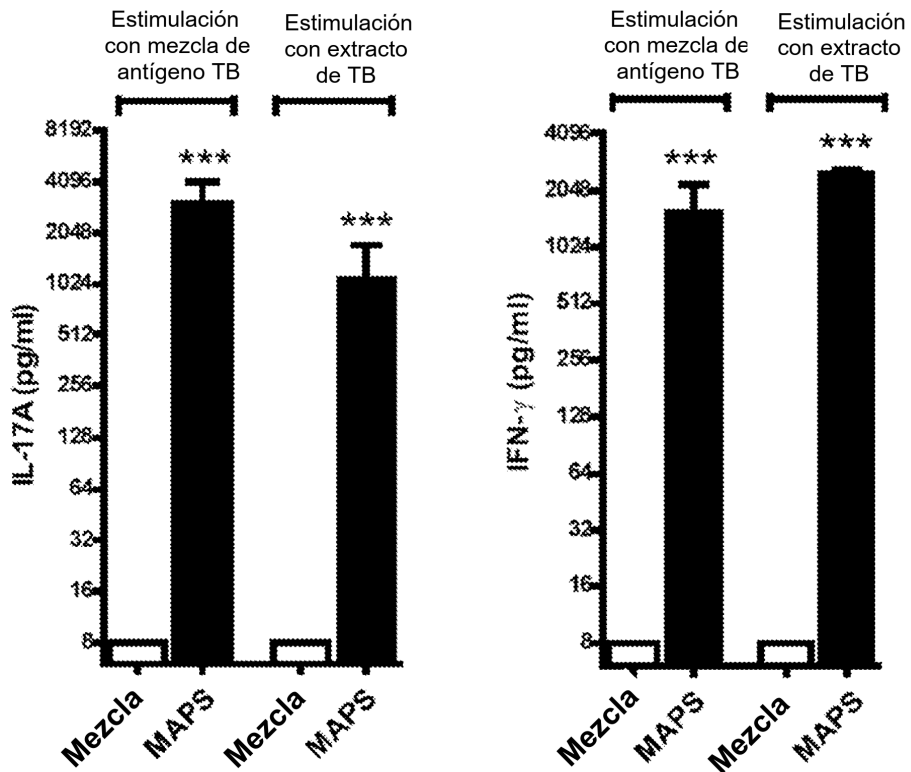


Figura 15G

Figura 15H

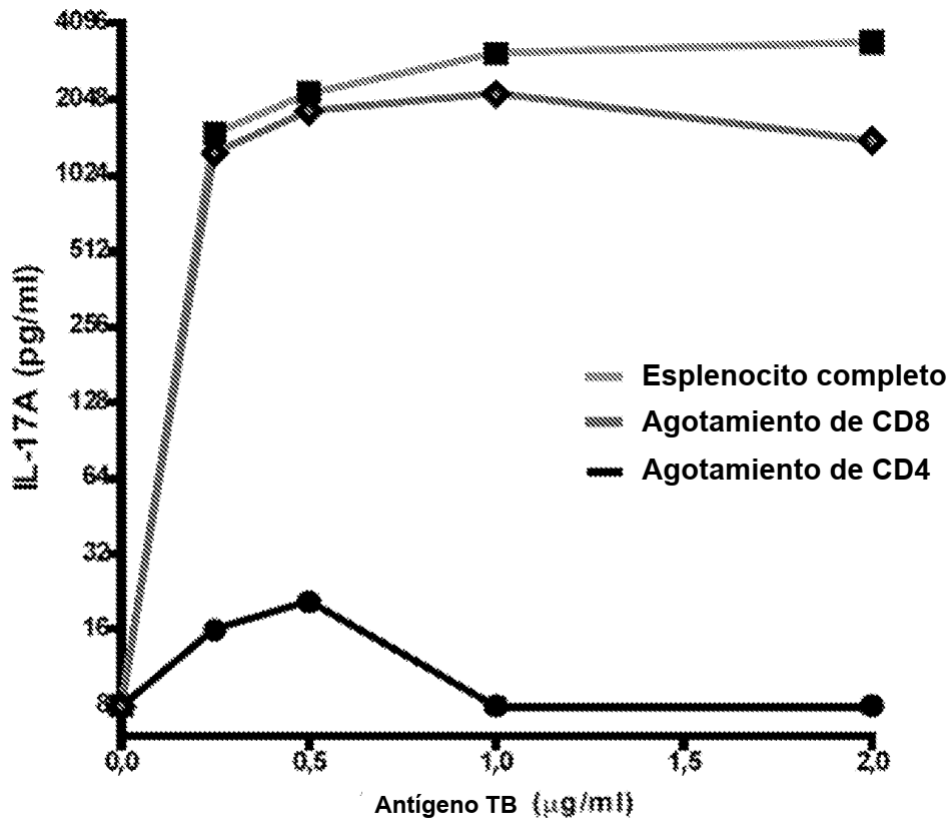


Figura 15I

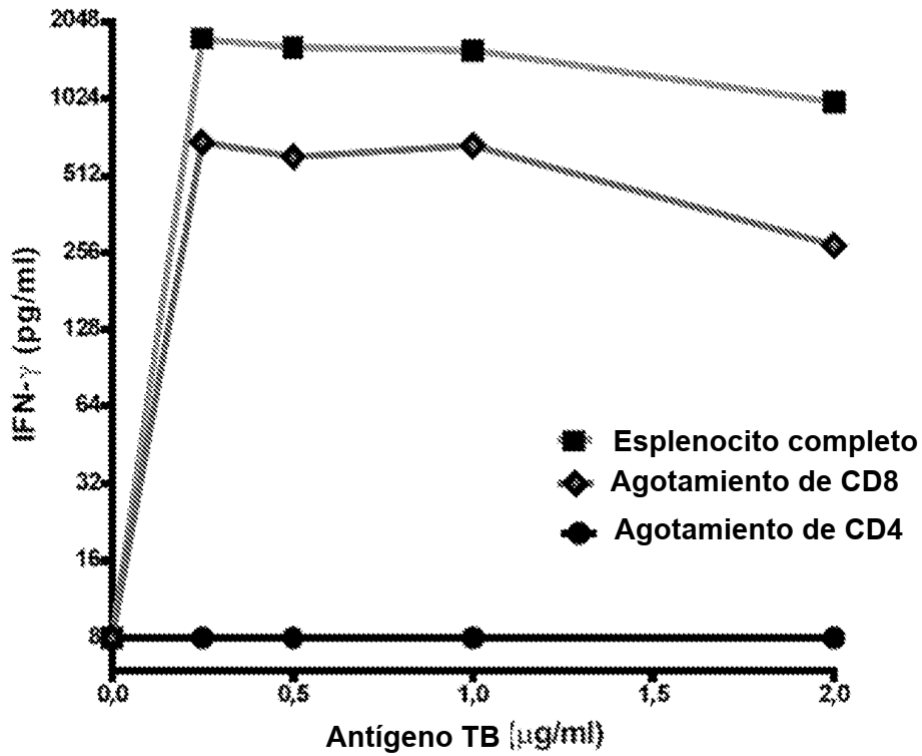


Figura 15J

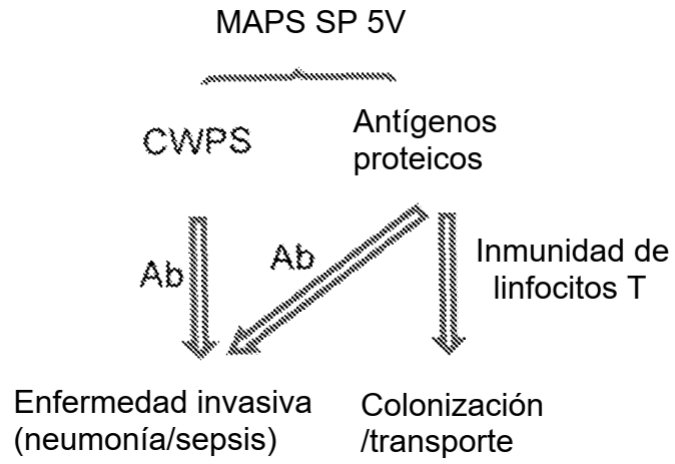


Figura 16A

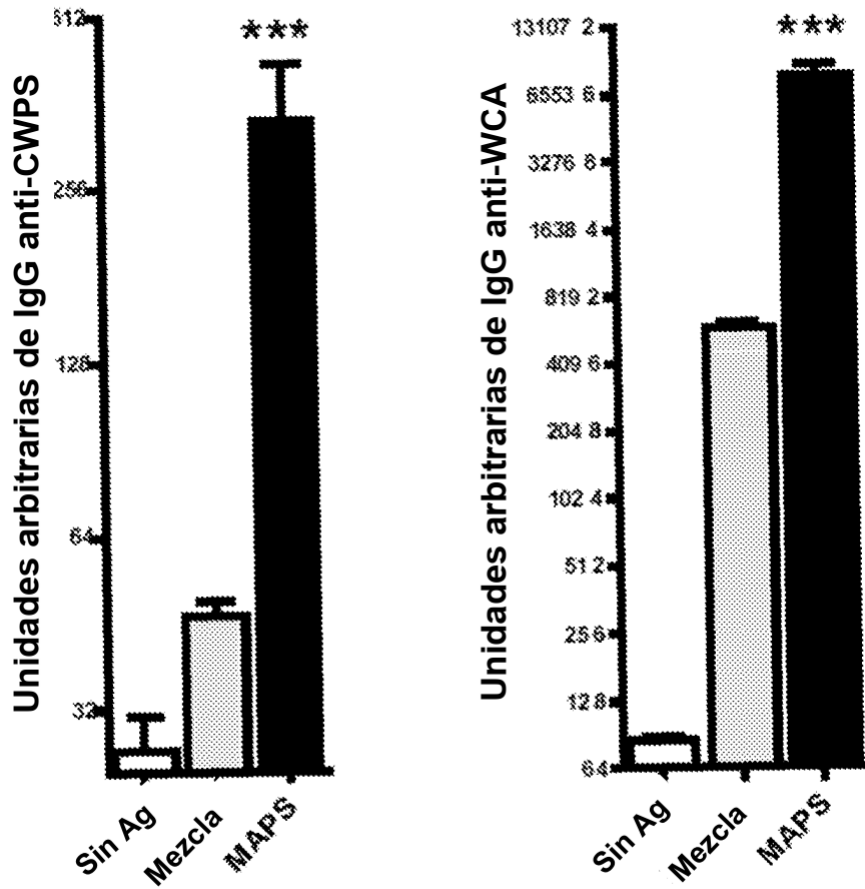


Figura 16B

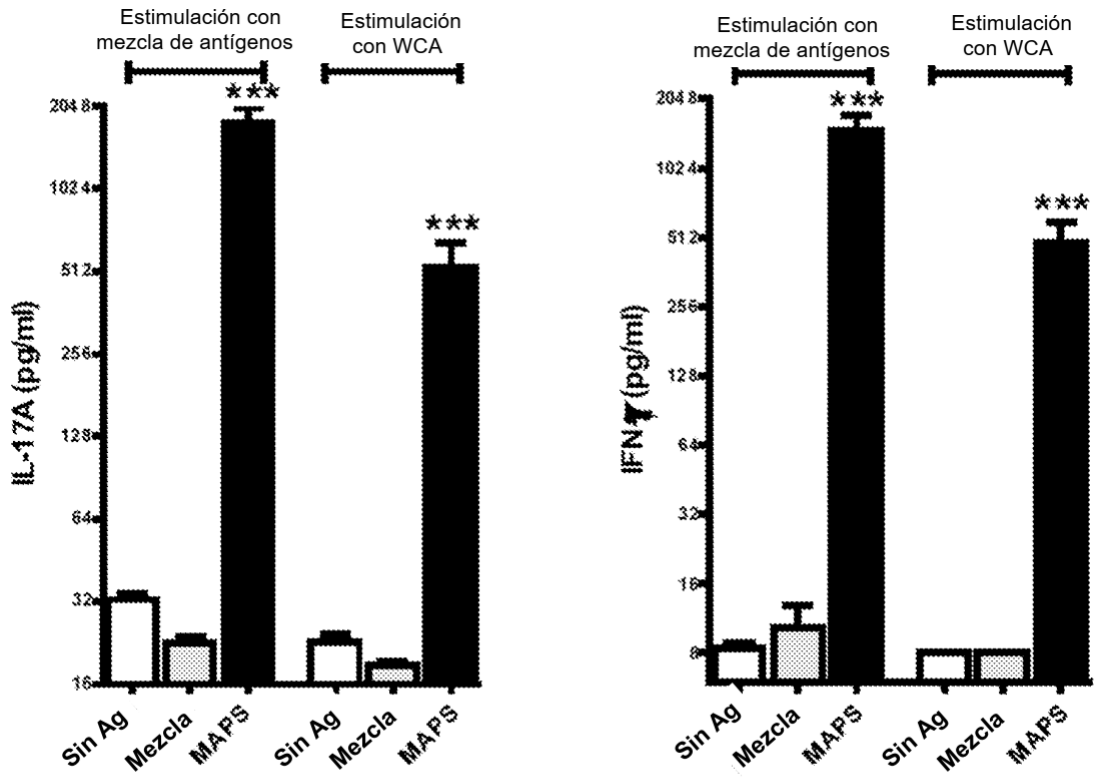


Figura 16C

Figura 16D

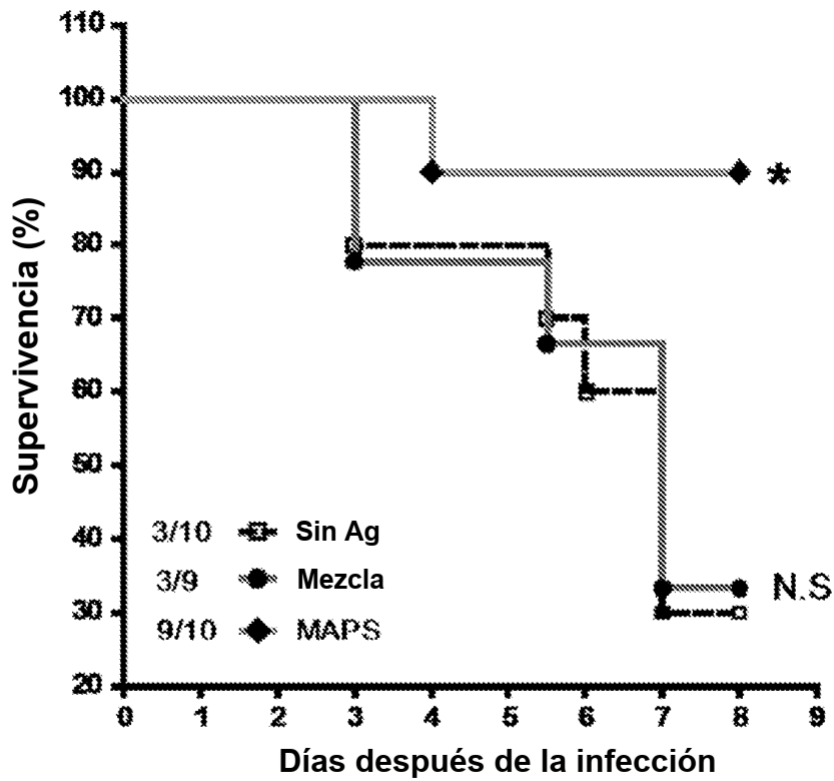


Figura 16E

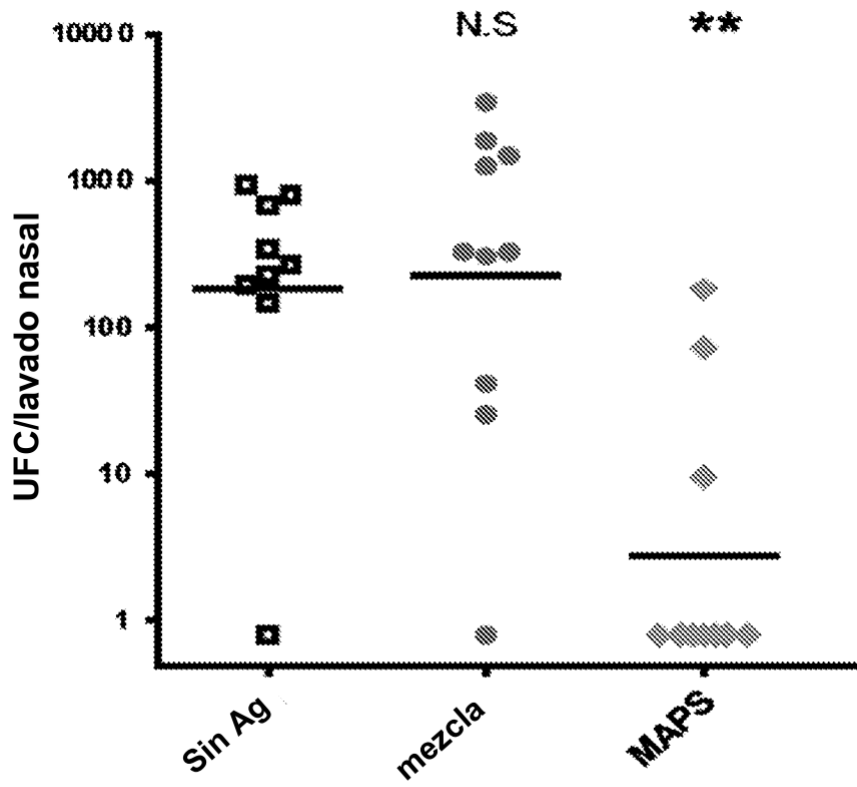


Figura 16F