

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 024 660**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2017** **PCT/EP2017/064436**
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017** **WO17220383**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2017** **E 17731842 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2025** **EP 3475296**

54 Título: **Artículos que comprenden un polipéptido de seda para la administración de antígenos**

30 Prioridad:

22.06.2016 EP 16175724

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2025

73 Titular/es:

AMSILK GMBH (100.00%)
Anna-Sigmund-Straße 1- 3
82061 Neuried, DE

72 Inventor/es:

RÖMER, LIN;
SLOTTA, UTE;
ENGERT, JULIA;
WINTER, GERHARD;
LUCKE, MATTHIAS y
SCHEIBEL, THOMAS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 3 024 660 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

Artículos que comprenden un polipéptido de seda para la administración de antígenos

La presente invención se refiere a un artículo para su uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde el artículo comprende un polipéptido que comprende un polipéptido de seda y un antígeno. Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende el artículo.

Antecedentes de la invención

La administración de antígenos a las células animales, por ejemplo, las células humanas, es importante en el campo médico. Tiene, por ejemplo, un alto potencial en el área comercial de la vacunación. Además, es muy relevante para la mejora de los enfoques terapéuticos para el tratamiento de animales, por ejemplo, humanos. El cáncer, las enfermedades autoinmunes, las micosis, las infecciones por virus y bacterias o la vacunación terapéutica contra la hepatitis B/C o el HIV son, por ejemplo, objetivos prometedores para los tratamientos inmunoterapéuticos.

La inmunización mediante vacunación es una de las herramientas más productivas en la práctica médica moderna. La capacidad del cuerpo para protegerse de patógenos extraños depende de su capacidad para reconocer y reaccionar a los materiales infecciosos una vez que se presentan a las células inmunes del huésped, en un proceso conocido como respuesta inmune adaptativa. Las composiciones empleadas actualmente para la inmunización administran antígenos con una mezcla de estabilizadores, conservantes y adyuvantes. El antígeno suele ser un componente proteico de una bacteria o un virus. La vacuna que comprende el antígeno induce respuestas tanto humorales como celulares a dicho antígeno. La eficacia de dicha vacunación depende en gran medida de la inmunogenicidad del antígeno, que a su vez es función del tamaño del antígeno, de su complejidad molecular, de su grado de "extranjería" y de su capacidad de ser escindido en péptidos por las células presentadoras de antígenos (APCs). Las APCs estimuladas y activadas por el antígeno migran a los ganglios linfáticos de drenaje (DLN), donde luego el antígeno se presenta a las células T auxiliares ingenuas. Posteriormente, el antígeno se presenta a las células B, lo que da lugar a la producción de anticuerpos sistémicos, así como al cebado de las células B de memoria. La producción inicial de anticuerpos comienza a disminuir aproximadamente tres semanas después de la exposición primaria, pero puede mejorar aún más mediante un segundo contacto con el mismo antígeno. Por lo tanto, se recomiendan firmemente las vacunas de refuerzo, ya que generalmente inducen altas concentraciones de anticuerpos específicos del antígeno. Las células dendríticas (DCs), como células presentadoras de antígenos (APCs) especializadas, desempeñan un papel fundamental tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Las DCs son células presentadoras de antígenos especializadas con la capacidad única de capturar y procesar antígenos, migrar desde la periferia a un órgano linfático y presentar los antígenos a las células T en reposo de una manera restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Sin embargo, uno de los inconvenientes del material de administración de antígenos actualmente disponible es el efecto citotóxico que este material tiene sobre las células objetivo. Dados los posibles usos terapéuticos y clínicos del material de administración, se necesita menos material citotóxico para transportar antígenos a diversas células sin afectar las vías y sistemas de señalización inherentes. Además, las vacunas que comprenden antígenos a menudo no son absorbidas suficientemente por las células/no se internalizan en ellas. Por tanto, existe una necesidad de un artículo no citotóxico que comprenda un antígeno que tenga una estructura que sea absorbida preferiblemente por las células/internalizada en las células. Además, no se conocen en la técnica vehículos portadores de antígenos artificiales que estén compuestos de un polipéptido de cadena única que comprende un polipéptido portador y un antígeno.

El documento WO 2011/115538 A1 divulga un polipéptido de fusión que comprende un único sitio de escisión entre la fracción que mejora la solubilidad y la proteína deseada. El sitio de escisión único puede ser un sitio de escisión de proteasa. Además, el documento WO 2008/022774 A2 describe una proteína de fusión que comprende una enzima formadora de sílice, una proteína adhesiva y un sitio de escisión de proteasa.

Los inventores de la presente solicitud de patente produjeron por primera vez artículos portadores de antígeno que están compuestos de un polipéptido de cadena única que comprende un polipéptido de seda como polipéptido portador así como un antígeno. Además, los inventores de la presente solicitud de patente descubrieron sorprendentemente que los antígenos que forman parte de artículos, por ejemplo partículas, que comprenden polipéptidos de seda son absorbidos preferiblemente por células animales, por ejemplo células humanas. En este contexto, los inventores de la presente solicitud de patente se sorprendieron de que los artículos, por ejemplo, partículas, que están compuestas principalmente de seda, funcionan como un material auxiliar que estabiliza el antígeno y lo hace transportable. Los artículos, por ejemplo, partículas, pueden degradarse dentro del organismo (por ejemplo, el cuerpo humano) sin dejar rastros. Además, los inventores de la presente solicitud de patente descubrieron sorprendentemente que ya no es necesario el uso de adyuvantes en una composición farmacéutica que comprende antígenos que son parte de los artículos, por ejemplo,

partículas, que comprenden polipéptidos de seda. La eficacia de un antígeno comprendido en una composición sin adyuvantes es al menos tan buena o comparable a la del mismo antígeno comprendido en una composición con adyuvantes. La omisión de adyuvantes tiene el efecto positivo de que se pueden reducir, y en algunos casos incluso evitar, los efectos secundarios y la incompatibilidad de las vacunas. Además, los artículos, por ejemplo, partículas, que comprenden polipéptidos de seda y antígenos no son tóxicos, en particular no son citotóxicos, ni inmunogénicos. Los artículos, por ejemplo, partículas, se pueden fabricar fácilmente en un proceso de producción de un solo paso sin necesidad de disolventes orgánicos o sustancias tóxicas. Además, un proceso de producción de un solo paso reduce los riesgos de impurezas o contaminaciones dañinas y tiene ventajas significativas en cuanto a aspectos regulatorios y de documentación. Un proceso de producción de un solo paso significa que no es necesario ningún paso de carga adicional después de la formación del artículo. El proceso de producción de un solo paso es particularmente deseable ya que se puede ampliar fácilmente a escala de fabricación. Además, el antígeno está definido exactamente por el código genético del polipéptido y, por lo tanto, no puede degradarse durante el procedimiento de carga que de otro modo sería necesario.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un artículo para su uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde el artículo comprende un polipéptido que comprende

- (i) un polipéptido de seda, y
- (ii) un antígeno.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende el artículo como se define en el primer aspecto.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica sin adyuvante para su uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde la composición comprende un artículo que comprende un polipéptido que comprende

- (i) un polipéptido de seda, y
- (ii) un antígeno.

Este resumen de la invención no describe necesariamente todas las características de la presente invención. Otras realizaciones se harán evidentes a partir de una revisión de la descripción detallada que sigue.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Antes de describir en detalle la presente invención a continuación, debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica.

Preferiblemente, los términos utilizados en el presente documento se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

El término "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" de acuerdo con la presente invención significa la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. El término "que consiste esencialmente en" de acuerdo con la presente invención significa la inclusión de un número entero establecido o un grupo de números enteros, mientras que excluye modificaciones u otros números enteros que afectarían o alterarían materialmente el número entero establecido. El término "que consiste en" o variaciones tales como "consiste en" de acuerdo con la presente invención significa la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados y la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

Los términos "un" y "una" y "el/la" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse de manera que cubran tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el contexto de la presente invención. Se refieren a una larga cadena de aminoácidos unida a péptidos, por ejemplo, una que normalmente tiene 40 aminoácidos de longitud o más de 40 aminoácidos.

5 El término "péptido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cadena corta de aminoácidos unida a un péptido, por ejemplo, una que normalmente tiene menos de aproximadamente 40 aminoácidos de longitud y, más típicamente, menos de aproximadamente 30 aminoácidos de longitud.

10 Los términos "proteína de fusión" o "proteína híbrida" (literalmente, hecha de partes de diferentes fuentes) se utilizan indistintamente en el contexto de la presente invención. Se refieren a una proteína que se crea a través de la unión de dos o más genes que originalmente codificaban proteínas/péptidos separados. La traducción de este gen de fusión da como resultado un polipéptido de cadena única con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas/péptidos originales.

Los términos "proteína de fusión recombinante" o "proteína híbrida recombinante" se utilizan indistintamente en el contexto de la presente invención. Se refieren a un polipéptido de cadena única que se crea artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante.

15 En una realización, el polipéptido como se describe en el presente documento es un polipéptido de fusión o híbrido que comprende un polipéptido de seda y un antígeno. En una realización preferida, el polipéptido como se describe en el presente documento es un polipéptido de fusión o híbrido que comprende un polipéptido de seda, un antígeno y un enlazador enzimáticamente escindible, en donde el antígeno está unido al polipéptido de seda a través del enlazador enzimáticamente escindible o en donde el enlazador enzimáticamente escindible está ubicado entre el polipéptido de seda y el antígeno. La secuencia del enlazador escindible enzimáticamente se puede modificar añadiendo más aminoácidos no funcionales.

20 El término "polipéptido de seda", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido que muestra, en comparación con otros polipéptidos, una composición de aminoácidos bastante aberrante. En particular, un polipéptido de seda posee grandes cantidades de aminoácidos hidrófobos tales como glicina o alanina, pero, por ejemplo, nada de triptófano (o muy poco). Además, un polipéptido de seda contiene secuencias de aminoácidos altamente repetitivas o unidades repetitivas (unidades de repetición, módulos), especialmente en su gran dominio central.

25 Basándose en el análisis de ADN, se demostró que todos los polipéptidos de seda son cadenas de unidades repetitivas que además comprenden un conjunto limitado de motivos peptídicos más cortos distintos. Las expresiones "motivo peptídico" y "secuencia de consenso" pueden usarse indistintamente en el presente documento. En general, las secuencias de consenso de la seda se pueden agrupar en cuatro categorías principales: GPGXX, GGX, A_n o $(GA)_n$ y espaciadores. A estas categorías de motivos peptídicos en los polipéptidos de seda se les han asignado funciones estructurales. Por ejemplo, se ha sugerido que el motivo GPGXX está involucrado en una espiral de giro β , probablemente proporcionando elasticidad. Se sabe que el motivo GGX es responsable de una hélice 3_1 rica en glicina. Se cree que los motivos GPGXX y GGX están involucrados en la formación de una matriz amorfa que conecta regiones cristalinas, proporcionando así elasticidad a la fibra. Los motivos ricos en alanina contienen típicamente 6-9 residuos y se ha descubierto que forman láminas β cristalinas. Los espaciadores generalmente contienen grupos cargados y separan los motivos peptídicos iterados en grupos.

40 Preferiblemente, el polipéptido de seda es un polipéptido de seda de araña. Más preferiblemente, el polipéptido de seda, por ejemplo, el polipéptido de seda de araña, es un polipéptido recombinante.

45 El término "antígeno", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende un epítipo contra el cual se debe generar una respuesta inmune. El término "antígeno" incluye proteínas o péptidos. El término "antígeno" también incluye moléculas que se vuelven antigénicas solo a través de una transformación (por ejemplo, de manera intermedia en la molécula o al completarse con una proteína corporal). Un antígeno es preferiblemente presentable por células del sistema inmune, tales como células presentadoras de antígenos (APCs), como las células dendríticas (DCs) o los macrófagos. Además, un antígeno o un producto de procesamiento del mismo es preferiblemente reconocible por un receptor de células T o B, o por una molécula de inmunoglobulina tal como un anticuerpo. El antígeno puede ser un antígeno asociado a una enfermedad, tal como un antígeno tumoral, un antígeno viral o un antígeno bacteriano.

50 En el contexto de la presente invención, el término "antígeno asociado a la enfermedad" se utiliza en su sentido más amplio para referirse a cualquier antígeno asociado a una enfermedad. Un antígeno asociado a una enfermedad es una molécula que contiene epítipos que estimularán el sistema inmunológico del huésped para producir una respuesta inmune celular específica del antígeno y/o una respuesta de anticuerpos humorales contra la enfermedad. Por tanto, el antígeno asociado a la enfermedad puede utilizarse con fines terapéuticos. Los antígenos asociados a enfermedades se asocian preferiblemente con infecciones por microbios, típicamente antígenos microbianos, o con cáncer, típicamente tumores.

El término "enfermedad", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad a menudo se interpreta como una condición médica asociada con síntomas y signos específicos. Una enfermedad puede ser causada por factores originalmente de una fuente externa, tal como una enfermedad infecciosa, o puede ser causada por disfunciones internas, tales como las enfermedades autoinmunes. En humanos, el término "enfermedad" suele usarse de forma más amplia para referirse a cualquier condición que cause dolor, disfunción, angustia, problemas sociales o muerte al individuo afectado, o problemas similares para quienes están en contacto con el individuo. En este sentido más amplio, a veces incluye lesiones, discapacidades, trastornos, síndromes, infecciones, síntomas aislados, conductas desviadas y variaciones atípicas de la estructura y la función, mientras que en otros contextos y para otros fines estas pueden considerarse categorías distinguibles. Las enfermedades suelen afectar a los individuos no sólo físicamente, sino también emocionalmente, ya que contraer y vivir con muchas enfermedades puede alterar la perspectiva de vida y la personalidad de uno.

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad puede ser una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmune. La enfermedad también puede ser una enfermedad cancerosa o simplemente cáncer.

El término "enfermedad infecciosa", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad que puede transmitirse de un individuo a otro o de un organismo a otro y es causada por un agente microbiano (por ejemplo, el resfriado común). Las enfermedades infecciosas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana o una enfermedad parasitaria. Dichas enfermedades son causadas por un virus, una bacteria y un parásito, respectivamente. A este respecto, las enfermedades infecciosas pueden ser, por ejemplo, la hepatitis, las enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia o gonorrea), la tuberculosis, el HIV/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS), la difteria, la hepatitis B, la hepatitis C, el cólera, el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), la gripe aviar y la gripe.

El término "enfermedad autoinmune", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad en la que el cuerpo produce una respuesta inmunogénica (es decir, del sistema inmunitario) a algún componente de su propio tejido. En otras palabras, el sistema inmunológico pierde su capacidad de reconocer algún tejido o sistema dentro del cuerpo como propio y lo ataca como si fuera extraño. Las enfermedades autoinmunes se pueden clasificar en aquellas en las que se ve afectado predominantemente un órgano (por ejemplo, anemia hemolítica y tiroiditis antiinmune) y aquellas en las que el proceso de la enfermedad autoinmune se difunde a través de muchos tejidos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico). Por ejemplo, se cree que la esclerosis múltiple es causada por células T que atacan las vainas que rodean las fibras nerviosas del cerebro y la médula espinal. Esto produce pérdida de coordinación, debilidad y visión borrosa. Las enfermedades autoinmunes son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumática, anemia hemolítica, tiroiditis antiinmune, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis, diabetes, esclerodermia, psoriasis y similares.

Los términos "enfermedad cancerosa" o "cáncer", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren o describen la condición fisiológica de un individuo que generalmente se caracteriza por un crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más particularmente, los ejemplos de dichos cánceres incluyen cáncer de huesos, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (CNS), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma y adenoma pituitario. El término "cáncer" de acuerdo con la invención también comprende metástasis de cáncer.

Como se mencionó anteriormente, el antígeno puede ser un antígeno tumoral, un antígeno viral o un antígeno bacteriano.

El término "antígeno tumoral", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un componente de las células cancerosas que puede derivar del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular. En particular, se refiere a aquellos antígenos que se producen, preferiblemente en gran cantidad, intracelularmente o como antígenos de superficie en las células tumorales. Los ejemplos de antígenos tumorales incluyen HER2, EGFR, VEGF, antígeno CAMPATH1, CD22, CA-125, HLA-DR, linfoma de Hodgkin o mucina-1, pero no se limitan a ellos.

El término "antígeno viral", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier componente viral que tenga propiedades antigénicas, es decir, que sea capaz de provocar una respuesta inmune en un individuo. El antígeno viral puede ser una ribonucleoproteína viral o una proteína de envoltura.

El término "antígeno microbiano", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier componente microbiano que tenga propiedades antigénicas, es decir, que sea capaz de provocar una respuesta inmune en un individuo.

5 El término "antígeno bacteriano", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier componente bacteriano que tenga propiedades antigénicas, es decir, que sea capaz de provocar una respuesta inmune en un individuo. El antígeno bacteriano puede derivar de la pared celular o de la membrana citoplasmática de una bacteria.

10 El término "antígeno fúngico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier componente fúngico que tenga propiedades antigénicas, es decir, que sea capaz de provocar una respuesta inmune en un individuo.

El término "antígeno zooparasitario", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier componente de un parásito de un animal que tenga propiedades antigénicas, es decir, que sea capaz de provocar una respuesta inmune en un individuo. Dicho parásito puede ser una pulga, un piojo o un gusano.

15 El término "respuesta inmune", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una reacción del sistema inmune a organismos inmunogénicos, tales como bacterias, virus, células o sustancias. El término "respuesta inmune" incluye la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Preferiblemente, la respuesta inmune está relacionada con una activación de células inmunes, una inducción de la biosíntesis de citoquinas y/o producción de anticuerpos. Se prefiere que la respuesta inmune inducida por los artículos de la presente invención (o más específicamente por los antígenos que forman parte de ella) comprenda los pasos de activación de células presentadoras de antígeno (APCs), tales como células dendríticas (DCs) y/o macrófagos, presentación del antígeno o fragmento del mismo por dichas células presentadoras de antígeno y activación de células T citotóxicas debido a esta presentación.

25 El término "células inmunes", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a las células del sistema inmune que participan en la defensa del cuerpo de un individuo. El término "células inmunes" abarca tipos específicos de células inmunes y sus precursores, incluyendo los leucocitos que comprenden macrófagos, monocitos (precursores de macrófagos), granulocitos tales como neutrófilos, eosinófilos y basófilos, células dendríticas, mastocitos y linfocitos tales como las células B, las células T y las células asesinas naturales (NK). Los macrófagos, los monocitos (precursores de los macrófagos), los neutrófilos, las células dendríticas (DCs) y los mastocitos son células fagocíticas.

30 El término "célula presentadora de antígeno (APC)", como se utiliza en el presente documento, es una célula de una variedad de células capaces de mostrar, adquirir y/o presentar al menos un antígeno o fragmento antigénico en (o en) su superficie celular. Las células presentadoras de antígenos se pueden distinguir en células presentadoras de antígenos profesionales y células presentadoras de antígenos no profesionales.

35 El término "células presentadoras de antígenos profesionales", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a células presentadoras de antígenos que expresan de forma constitutiva las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC clase II) necesarias para la interacción con células T no activadas. Si una célula T interactúa con el complejo de moléculas MHC de clase II en la membrana de la célula presentadora de antígeno, esta última produce una molécula coestimulante que induce la activación de la célula T. Las células presentadoras de antígenos profesionales comprenden las células dendríticas (DCs) y los macrófagos.

45 El término "células presentadoras de antígenos no profesionales", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a células presentadoras de antígenos que no expresan de forma constitutiva moléculas de MHC de clase II, sino tras la estimulación por ciertas citoquinas tales como el interferón gamma. Las células presentadoras de antígenos no profesionales a modo de ejemplo incluyen fibroblastos, células epiteliales tímicas, células epiteliales tiroideas, células gliales, células beta pancreáticas o células endoteliales vasculares.

50 El término "célula dendrítica (DC)", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a otro subtipo de células fagocíticas que pertenecen a la clase de células presentadoras de antígenos (APCs). Preferiblemente, las células dendríticas se derivan de células progenitoras de la médula ósea hematopoyética. Estas células progenitoras se transforman inicialmente en células dendríticas inmaduras. Estas células inmaduras se caracterizan por una alta actividad fagocítica y un bajo potencial de activación de células T. Las células dendríticas inmaduras toman muestras constantemente del ambiente circundante en busca de patógenos tales como virus y bacterias. Una vez que entran en contacto con un antígeno presentable, se activan y se convierten en células dendríticas maduras y comienzan a migrar al bazo o al ganglio linfático. Las células dendríticas inmaduras fagocitan patógenos y degradan sus proteínas en pequeños fragmentos y, al madurar, presentan esos fragmentos en su superficie celular utilizando moléculas MHC. Simultáneamente, regulan positivamente los receptores de la superficie celular que actúan como correceptores en la activación de las células T, tales como CD80, CD86 y CD40, mejorando enormemente su capacidad para activar las células T. También regulan positivamente el CCR7, un receptor quimiotáctico que induce a la célula dendrítica a viajar a través del torrente

sanguíneo hasta el bazo o a través del sistema linfático hasta un ganglio linfático. Aquí actúan como células presentadoras de antígenos y activan las células T auxiliares y las células T asesinas, así como las células B, presentándoles antígenos, junto con señales coestimuladoras no específicas del antígeno. De esta forma, las células dendríticas pueden inducir activamente una respuesta inmune relacionada con las células T o las células B. Preferiblemente, las células dendríticas son células dendríticas esplénicas.

El término "macrófago", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un subgrupo de células fagocíticas producidas por la diferenciación de monocitos. Los macrófagos que se activan por la inflamación, las citoquinas inmunes o los productos microbianos engullen y matan de manera no específica a los patógenos extraños dentro del macrófago mediante un ataque hidrolítico y oxidativo que resulta en la degradación del patógeno. Los péptidos de las proteínas degradadas se muestran en la superficie de las células de los macrófagos, donde pueden ser reconocidos por las células T y pueden interactuar directamente con los anticuerpos en la superficie de las células B, lo que da como resultado la activación de las células T y B y una mayor estimulación de la respuesta inmune. Los macrófagos pertenecen a la clase de células presentadoras de antígenos (APCs). Preferiblemente, los macrófagos son macrófagos esplénicos.

Los términos "células T" o "linfocitos T", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a tipos de linfocitos que desempeñan un papel central en la inmunidad mediada por células. Las células T o linfocitos T se pueden distinguir de otros linfocitos, tales como las células B y las células asesinas naturales (NK), por la presencia de un receptor de células T (TCR) en la superficie celular. No tienen propiedades de presentación de antígenos (sino que requieren células B o células NK para su propiedad de presentación de antígenos). Se llaman células T porque maduran en el timo. Las células T son capaces de reconocer un antígeno cuando se muestra en la superficie de las células presentadoras de antígeno o de la matriz junto con una o más moléculas MHC o una o más moléculas MHC no clásicas.

Los términos "células T estimulantes" o "estimulación de células T", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a la inducción o activación de una respuesta de células T mediante una señal primaria, tal como por ejemplo la interacción con un complejo antígeno-MHC de clase II a través del receptor de antígeno de células T. El término también incluye la coestimulación de las células T, tal como por ejemplo a través de citoquinas (por ejemplo, las proteínas CD80 o CD86). Una célula T se activa si ha recibido un evento de señalización primario que inicia una respuesta inmune por parte de la célula T.

El término "células T de cebado", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la inducción de un primer contacto de la célula T con su antígeno específico (por ejemplo, por células dendríticas (CD) que presentan el antígeno a las células T), lo que provoca la diferenciación de la célula T en una célula T efectora (por ejemplo, una célula T citotóxica o una célula T auxiliar).

Los términos "células T en expansión" o "expansión de células T", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren al aumento del número de células T, preferiblemente células T que reconocen específicamente un antígeno. Se prefiere que aumente el número de células T que reconocen específicamente el antígeno comprendido en el artículo de la presente invención o el producto de procesamiento del antígeno. El antígeno o producto de procesamiento del antígeno se presenta preferiblemente en el contexto de moléculas MHC, tal como en la superficie de células presentadoras de antígenos (APCs), como las células dendríticas (DCs) o los macrófagos.

El término "inmunoterapia", tal como se utiliza en el presente documento, se relaciona con el tratamiento de una enfermedad o afección mediante la inducción, mejora o supresión de una respuesta inmunitaria. Las inmunoterapias diseñadas para provocar o amplificar una respuesta inmunitaria se clasifican como inmunoterapias de activación, mientras que las inmunoterapias que reducen o suprimen una respuesta inmunitaria se clasifican como inmunoterapias de supresión. El término "inmunoterapia" incluye la inmunización con antígenos o vacunación con antígenos, así como la inmunización con tumores o vacunación con tumores. El término "inmunoterapia" también se relaciona con la manipulación de las respuestas inmunes de manera que las respuestas inmunes inapropiadas se modulen en otras más apropiadas en el contexto de enfermedades autoinmunes tal como la artritis reumática, las alergias, la diabetes o la esclerosis múltiple.

Los términos "inmunización" o "vacunación", tal como se utilizan en el presente documento, describen el proceso de administrar un antígeno a un individuo con el propósito de inducir una respuesta inmune, por ejemplo, por razones terapéuticas o profilácticas.

El término "tratamiento terapéutico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier tratamiento que mejore el estado de salud y/o prolongue (aumente) la vida de un individuo. Dicho tratamiento puede eliminar la enfermedad en un individuo, detener, inhibir o retardar el desarrollo de una enfermedad en un individuo, disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas en un individuo y/o disminuir la recurrencia en un individuo que actualmente tiene o que anteriormente ha tenido una enfermedad.

Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a cualquier tratamiento que tenga como objetivo prevenir que una enfermedad se presente en un

individuo. Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se utilizan en el presente documento indistintamente.

Los términos "proteger", "prevenir", "profiláctico", "preventivo" o "protector", tal como se utilizan en el presente documento, se relacionan con la prevención y/o el tratamiento de la aparición y/o la propagación de una enfermedad, por ejemplo, un tumor, en un individuo. Por ejemplo, una administración profiláctica de una inmunoterapia, por ejemplo, mediante la administración del artículo o la composición farmacéutica de la presente invención, puede proteger al individuo receptor del desarrollo de un tumor. Por ejemplo, una administración terapéutica de una inmunoterapia, por ejemplo, mediante la administración del artículo o la composición farmacéutica de la presente invención, puede detener el desarrollo de una enfermedad, por ejemplo, conducir a la inhibición del progreso/crecimiento de un tumor. Esto incluye la desaceleración del progreso/crecimiento del tumor, en particular una interrupción de la progresión del tumor, que conduce preferiblemente a la eliminación del tumor. La administración terapéutica de una inmunoterapia puede proteger al individuo de la diseminación o metástasis de tumores existentes.

Los términos "individuo" y "sujeto" se utilizan indistintamente en el contexto de la presente invención. El individuo o sujeto puede ser sano, padecer una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) o ser susceptible a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer). El individuo o sujeto puede ser un animal, por ejemplo, un ser humano. Preferiblemente, el individuo o sujeto es un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado vacuno, cerdo, oveja, caballo o primate). A menos que se indique lo contrario, los términos "individuo" y "sujeto" no denotan una edad particular y, por lo tanto, abarcan adultos, ancianos, niños y recién nacidos. El "individuo" o "sujeto" puede ser un "paciente".

El término "paciente", tal como se utiliza en el presente documento, significa un individuo o sujeto que está enfermo, es decir, que padece una enfermedad o trastorno. El paciente puede ser un animal, por ejemplo, un ser humano. Preferiblemente, el animal es un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado vacuno, cerdo, oveja, caballo o primate).

El artículo de la presente invención puede administrarse en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada. Dicha composición farmacéutica puede comprender además adyuvantes, portadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes y/o excipientes. Dicha composición farmacéutica es útil para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno. Puede administrarse por vía local o sistémica, preferiblemente por vía sistémica.

El término "administración sistémica", utilizado en el presente documento, se refiere a la administración del artículo de la presente invención de manera que el artículo se distribuya ampliamente en el cuerpo de un individuo en cantidades significativas y desarrolle un efecto biológico (o más específicamente el antígeno comprendido en el mismo). Las vías de administración sistémicas típicas incluyen la administración mediante la introducción del artículo directamente en el sistema vascular o la administración oral, pulmonar o intramuscular, en la que el artículo se adsorbe, ingresa al sistema vascular y se transporta a uno o más sitios de acción deseados a través de la sangre.

La administración sistémica podrá ser por vía parenteral. El término "administración parenteral", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la administración del artículo de la presente invención de tal manera que el artículo no pase por el intestino. El término "administración parenteral" incluye la administración intravenosa, la administración subcutánea, la administración intradérmica o la administración intraarterial, pero no se limita a ellas.

Como se mencionó anteriormente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender adyuvantes. El término "adyuvante", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto que, cuando se administra en combinación con un antígeno o péptido antigénico a un individuo, prolonga, mejora o acelera una respuesta inmune. Se supone que los adyuvantes ejercen su actividad biológica mediante uno o más mecanismos, incluyendo un aumento de la superficie del antígeno, una prolongación de la retención del antígeno en el cuerpo, un retraso de la liberación del antígeno, la orientación del antígeno a los macrófagos, el aumento de la captación del antígeno, la mejora del procesamiento del antígeno, la estimulación de la liberación de citoquinas, la estimulación y activación de células inmunes tales como células B, macrófagos, células dendríticas, células T y la activación inespecífica de células inmunes. Los adyuvantes comprenden un grupo heterogéneo de compuestos tales como emulsiones de aceite (por ejemplo, adyuvantes de Freund), compuestos minerales (tal como el alumbre), productos bacterianos (tal como la toxina de Bordetella pertussis) o complejos inmunoestimulantes. Los ejemplos de adyuvantes incluyen saponinas, adyuvantes de Freund incompletos, adyuvantes de Freund completos, tocoferoles o aluminio, pero no se limitan a ellos. Sin embargo, los adyuvantes también pueden tener efectos secundarios negativos. La sal de aluminio, por ejemplo, tiene el potencial de causar efectos secundarios locales y sistémicos graves, incluyendo abscesos estériles, eosinofilia y miofascitis, aunque afortunadamente la mayoría de los efectos secundarios más graves son relativamente raros. Además, también existe preocupación en la comunidad sobre el posible papel del aluminio en enfermedades neurodegenerativas tal como la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, existe una

importante necesidad insatisfecha de adyuvantes más seguros y eficaces adecuados para uso humano. Lo mejor sería que el uso de adyuvantes fuera superfluo.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se aplica generalmente en una "cantidad farmacéuticamente eficaz". El término "cantidad farmacéuticamente eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado sola o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad determinada, la reacción deseada se refiere preferiblemente a una inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar la evolución de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en el tratamiento de una enfermedad también puede ser un retraso en la aparición o una prevención de la aparición de la enfermedad. Una cantidad efectiva de los artículos o composiciones descritos en el presente documento dependerá de la condición a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente/sujeto, incluyendo la edad, la condición fisiológica, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia acompañante (si está presente), la vía de administración específica y factores similares. Por consiguiente, las dosis de los artículos o composiciones descritos en el presente documento pueden depender de diversos de dichos parámetros. En caso de que la reacción del paciente/sujeto sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden utilizar dosis más altas (o efectivamente dosis más altas logradas mediante una vía de administración diferente, más localizada).

Como se mencionó anteriormente, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término "excipiente", tal como se utiliza en el presente documento, pretende indicar todas las sustancias en una composición farmacéutica que no son ingredientes activos tales como aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, emulsionantes, tampones, agentes aromatizantes o colorantes.

El término "diluyente", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un agente diluyente y/o diluyente. Además, el término "diluyente" incluye una solución, suspensión (por ejemplo, suspensión líquida o sólida) y/o medios.

El término "portador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más rellenos sólidos o líquidos compatibles, que son adecuados para una administración, por ejemplo, a un humano. El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, natural o sintético, que se combina con un componente activo para facilitar la aplicación de dicho componente. Preferiblemente, los componentes portadores son líquidos estériles tales como agua o aceites, incluyendo aquellos que se derivan de aceite mineral, animales o plantas, tal como aceite de maní, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de girasol, etc. También se pueden utilizar soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerina como compuestos portadores acuosos.

Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Los ejemplos de portadores adecuados incluyen, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

Los portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos pueden seleccionarse teniendo en cuenta la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender como, o además de, el/los portador(es), excipiente(s) o diluyente(s), cualquier aglutinante, lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento y/o agente(s) solubilizante(s) adecuado(s). Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Se pueden proporcionar en la composición farmacéutica conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso agentes aromatizantes. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden utilizar antioxidantes y agentes de suspensión.

En el contexto de la presente invención, el término "partícula" se refiere a una entidad estructurada formada por polipéptidos. De acuerdo con la presente invención, la entidad estructurada formada por polipéptidos comprende polipéptidos de seda y antígenos. En una realización, la partícula comprende un polipéptido de fusión o híbrido que comprende un polipéptido de seda y un antígeno. En una realización preferida, la partícula comprende un polipéptido de fusión o híbrido que comprende un polipéptido de seda, un antígeno y un enlazador enzimáticamente escindible, en donde el antígeno está conectado al polipéptido de seda a través

del enlazador enzimáticamente escindible o en donde el enlazador enzimáticamente escindible está ubicado entre el polipéptido de seda y el antígeno.

El término "partícula", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere además a una estructura esférica de tamaño micro o nanométrico que puede formarse por agregación de proteínas en determinadas condiciones. Se prefiere que la partícula comprenda o consista en una matriz y una superficie. Preferiblemente, la matriz es homogénea, más preferiblemente sin ninguna inclusión visible clara (por ejemplo, determinada mediante microscopía electrónica). A este respecto, cabe señalar que dichas inclusiones pueden ser aire y polipéptidos que no estén relacionados con los polipéptidos de la presente invención.

El término "superficie", tal como se utiliza en el presente documento, define la esfera exterior de la partícula, que incluye aquellas secciones de esfera que están directamente expuestas al espacio circundante, por ejemplo, el medio circundante o el líquido corporal. Aunque la partícula parece bastante lisa y uniforme, su superficie a nivel submicroscópico revela un manto delgado con estructuras irregulares y difusas. Una superficie, por tanto, delinea la capa más externa de la partícula que comparte una interfaz con el espacio circundante, por ejemplo, el medio circundante o el líquido corporal.

El término "matriz", tal como se utiliza en el presente documento, define la esfera interna de la partícula, que no es la superficie, es decir, que, de acuerdo con la definición anterior, no incluye ninguna interfaz con el espacio circundante, por ejemplo, el medio circundante o el líquido corporal. La matriz debe entenderse como una esfera sólida que tiene un radio y por tanto un volumen habitualmente menor que el de la partícula. El volumen de la matriz suele ser más del 50% del volumen total, preferiblemente más del 60%, 70%, 80%, 90%, más preferiblemente más del 95%, por ejemplo, más del 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95%.

Los términos "agregación" o "separación de fases", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a la formación de partículas debido a un mecanismo de sedimentación que, en particular, puede considerarse como una separación de fases líquido-líquido. El "estado monofásico" es el estado inicial que muestra una solución de moléculas de proteína monoméricas e intrínsecamente desplegadas. Por ejemplo, cambiar restricciones como la fuerza iónica mediante la adición de iones cosmotrópicos altera la energía libre del sistema y conduce a una separación de fases en fases ricas en proteínas y ricas en solventes. Este estado de separación de fases se ve favorecido energéticamente y la concentración de proteínas en la "fase proteica" aumenta hasta un nivel crítico. Al alcanzar la concentración crítica para la nucleación, se forman simultáneamente varios núcleos estructurados en la fase rica en proteínas. Los núcleos comienzan a crecer de forma esférica, interactuando con monómeros adicionales y transformando así su estructura. El crecimiento esférico se detiene cuando la concentración de proteínas en la fase rica en proteínas está por debajo del equilibrio de solubilidad. Por lo tanto, el tamaño de la esfera no aumenta más. La separación de fases significa, por tanto, que las fases ricas en proteínas y las ricas en disolventes se separan. Sin estar limitado a una teoría, el tamaño de la esfera generalmente depende de la concentración de proteínas y de las condiciones de mezcla. Sin embargo, existen otros métodos en la técnica para desencadenar la agregación de proteínas.

El proceso de ensamblaje de microesferas generalmente se monitoriza mediante la dispersión de luz después del inicio de la agregación. En particular, la estabilidad coloidal de las partículas resultantes se puede analizar midiendo la intensidad de la luz dispersa en una determinada longitud de onda. Además, el tamaño medio de partícula y la distribución del tamaño de partícula se pueden determinar mediante difracción láser, también llamada dispersión de luz estática (SLS).

Las partículas obtenidas también pueden analizarse utilizando métodos tales como la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Puede encontrarse una descripción más detallada de estos métodos en la descripción y en los ejemplos siguientes.

Después de la separación de fases, las partículas producidas pueden separarse mediante métodos rutinarios tal como centrifugación, filtración o sedimentación. Las partículas preparadas pueden lavarse y/o almacenarse posteriormente, por ejemplo, en forma seca o liofilizada.

El término "carga neta de la superficie de la partícula" se refiere a la suma total de cargas, tales como cargas positivas y negativas, en la superficie de la partícula. Por ejemplo, si la partícula comprende en su superficie un número mayor de cargas negativas que de cargas positivas, la carga neta de la superficie de la partícula es negativa. Si la partícula comprende en su superficie un número mayor de cargas positivas que negativas, la carga neta de la superficie de la partícula es positiva. Si la partícula comprende en su superficie un número igual de cargas positivas y negativas, la carga neta de la superficie de la partícula es neutra, particularmente electroneutra. Así, la carga neta de la superficie de la partícula de acuerdo con la presente invención puede ser negativa, positiva o neutra. Preferiblemente, la partícula de la presente invención tiene una carga superficial neta negativa.

El término "diámetro promedio" se refiere al diámetro medio de las partículas y puede calcularse dividiendo la suma del diámetro de cada partícula por el número total de partículas. Aunque el término "diámetro" se utiliza normalmente para referirse a la longitud máxima de un segmento de línea que pasa por el centro y conecta dos puntos en la periferia de un objeto esférico, también se utiliza en el presente documento para referirse a la longitud máxima de un segmento de línea que pasa por el centro y conecta dos puntos en la periferia de partículas que tienen una forma esférica sustancial u otras formas.

El término "proteasa (también designada como peptidasa o proteinasa)", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier enzima que realiza la proteólisis, es decir, inicia el catabolismo de las proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos en una cadena polipeptídica. Las proteasas han evolucionado varias veces y diferentes clases de proteasas pueden realizar la misma reacción mediante mecanismos catalíticos completamente diferentes. Las proteasas se pueden encontrar en animales, plantas, bacterias, arqueas y virus.

El término "catepsina (CTS)", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteasa (enzimas que degradan las proteínas) que se encuentra en todos los animales y otros organismos. Existen diferentes miembros de la familia, que se distinguen por su estructura, mecanismo catalítico y qué proteínas escinden. La mayoría de los miembros se activan al bajo pH que se encuentra en los lisosomas. Por tanto, la actividad de esta familia reside casi en su totalidad en esos orgánulos. La catepsina puede ser catepsina A, catepsina B, catepsina C, catepsina D, catepsina E, catepsina F, catepsina G, catepsina H, catepsina K, catepsina L1, catepsina L2, catepsina O, catepsina S, catepsina W o catepsina Z. Preferiblemente, la catepsina es catepsina S o B. Más preferiblemente, la catepsina es catepsina S.

En una realización, el polipéptido utilizado en la presente invención comprende un enlazador escindible por proteasa, por ejemplo, un enlazador escindible por catepsina S o un enlazador escindible por catepsina B. Preferiblemente, el enlazador escindible de catepsina S tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o es una variante de la misma o tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o es una variante de la misma, o el enlazador escindible de catepsina B tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o es una variante de la misma. A este respecto, cabe señalar que la catepsina S es capaz de escindir sus propios sitios de escisión (comprendida en SEQ ID NO: 1) y también los sitios de escisión que normalmente son escindidos por la catepsina B (comprendida en SEQ ID NO: 2). La secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 1 (GPMGLPG) comprende el sitio de escisión PMGLP (SEQ ID NO: 20) y la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2 (GAVGFLGIG) comprende el sitio de escisión GFLG (SEQ ID NO: 21). En lugar del sitio de escisión GFLG (SEQ ID NO: 21), la secuencia dipeptídica Val-Cit, o los tetrapéptidos ALAL (SEQ ID NO: 22) o GGGF (SEQ ID NO: 23) pueden utilizarse como sitios de escisión de catepsina B. Los sitios de escisión Val-Cit, ALAL (SEQ ID NO: 22) o GGGF (SEQ ID NO: 23) puede ser eficaz en combinación con partículas de C16 CathBseq-SIINFEKL (SEQ ID NO: 15). En este caso, el sitio de escisión GFLG (SEQ ID NO: 21) dentro de la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 15 se reemplaza por Val-Cit, ALAL (SEQ ID NO: 22) o GGGF (SEQ ID NO: 23). También es posible que el enlazador escindible de catepsina comprendido en el polipéptido consista en el sitio de escisión Val-Cit o los sitios de escisión de acuerdo con SEQ ID NO: 20 a 23.

Realizaciones de la invención

Los inventores de la presente solicitud de patente descubrieron sorprendentemente que los antígenos que forman parte de artículos, por ejemplo, partículas, que comprenden polipéptidos de seda son absorbidos preferiblemente por células animales, por ejemplo, células humanas. En este contexto, los inventores de la presente solicitud de patente se sorprendieron de que los artículos, por ejemplo, partículas, que están compuestas principalmente de seda, funcionan como un material auxiliar que estabiliza el antígeno y lo hace transportable. Los artículos, por ejemplo, partículas, pueden degradarse dentro del organismo (por ejemplo, el cuerpo humano) sin dejar rastros. Los artículos, por ejemplo, partículas, no son tóxicos, en particular no son citotóxicos y no son inmunogénicos.

Por tanto, se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un polipéptido que comprende

(i) un polipéptido de seda y

(ii) un antígeno (polipeptídico).

El polipéptido puede ser una molécula que se compone de al menos dos componentes que pueden traducirse como un polipéptido de cadena única a partir de la misma molécula de ARNm o pueden producirse mediante la traducción separada de los al menos dos componentes y el acoplamiento posterior, por ejemplo, mediante reacciones químicas. En el primer caso, el polipéptido de seda se fusiona/une al antígeno. En el segundo caso, el polipéptido de seda está enlazado/acoplado al antígeno. Preferiblemente, el polipéptido es un polipéptido de cadena única que también puede designarse como polipéptido híbrido o polipéptido de fusión.

En una realización preferida, el polipéptido comprende además un enlazador escindible enzimáticamente. Dicho enlazador puede ser cualquier enlazador que pueda escindirse mediante una enzima. Cuando está

presente el enlazador escindible enzimáticamente, el antígeno está conectado al polipéptido de seda a través de dicho enlazador o dicho enlazador está ubicado entre el polipéptido de seda y el antígeno. Si el polipéptido se produce como un polipéptido de cadena única (que también puede designarse como polipéptido híbrido o polipéptido de fusión), el antígeno se une/fusiona al polipéptido de seda a través del enlazador escindible enzimáticamente. Si el polipéptido se produce mediante la traducción separada de al menos dos componentes y el acoplamiento posterior, por ejemplo, mediante reacciones químicas, el antígeno se enlaza/acopla al polipéptido de seda a través del enlazador escindible enzimáticamente. Se prefiere particularmente que el enlazador escindible enzimáticamente sea escindible intracelularmente por una enzima, por ejemplo, dentro de la célula huésped.

Preferiblemente, el enlazador escindible enzimáticamente es un enlazador escindible por proteasa. Dicho enlazador puede ser cualquier enlazador que pueda escindirse mediante una proteasa.

Más preferiblemente, el enlazador escindible por proteasa es un enlazador escindible por catepsina. La catepsina puede ser catepsina A, catepsina B, catepsina C, catepsina D, catepsina E, catepsina F, catepsina G, catepsina H, catepsina K, catepsina L1, catepsina L2, catepsina O, catepsina S, catepsina W o catepsina Z. El enlazador escindible de catepsina puede ser un enlazador escindible de catepsina A, catepsina B, catepsina C, catepsina D, catepsina E, catepsina F, catepsina G, catepsina H, catepsina K, catepsina L1, catepsina L2, catepsina O, catepsina S, catepsina W o catepsina Z.

Aún más preferiblemente, el enlazador escindible de catepsina es un enlazador escindible de catepsina B o un enlazador escindible de catepsina S. El enlazador escindible de catepsina S es particularmente preferido.

La catepsina B es un miembro de la familia de la peptidasa C1. Es una cisteína proteasa lisosomal con actividad tanto endopeptidasa como exopeptidasa. Desempeña un papel en el recambio de proteínas. También se conoce como secretasa de la proteína precursora amiloide y participa en el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP). La catepsina B se expresa de forma ubicua en casi todos los tejidos. Por el contrario, la catepsina S sólo se expresa en ciertos tejidos. En particular, la catepsina S es expresada por células presentadoras de antígenos, incluyendo macrófagos, linfocitos B, células dendríticas y microglía. Además, la catepsina S es expresada por algunas células epiteliales. La catepsina S también es miembro de la familia de la peptidasa C1. Es una cisteína proteasa lisosomal. Desempeña un papel clave en la degradación de proteínas antigénicas y su posterior procesamiento a través de la vía del MHC de clase II. La catepsina S es capaz de escindir sus propios sitios de escisión (ver, por ejemplo, SEQ ID NO: 1) y también los sitios de escisión que normalmente son escindidos por la catepsina B (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 2). A este respecto, cabe señalar que la catepsina S escinde más lentamente y en menor medida los sitios de escisión que normalmente escinde la catepsina B.

Lo más preferible es que

(i) el enlazador escindible de catepsina S tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o es una variante de la misma o tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o es una variante de la misma, o

(ii) el enlazador escindible de catepsina B tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o es una variante de la misma.

Los inventores de la presente solicitud de patente encontraron que la catepsina S es capaz de escindir un enlazador escindible de catepsina S, por ejemplo, un enlazador escindible de catepsina S que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 1, así como un enlazador escindible de catepsina B, por ejemplo, un enlazador escindible de catepsina B que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2.

Una variante de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 difiere de la secuencia de referencia de la que se deriva en hasta 1, 2, 3 o 4 cambios de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones, inserciones, deleciones, truncamientos N-terminales y/o truncamientos C-terminales). Tal variante puede caracterizarse alternativa o adicionalmente por un cierto grado de identidad de secuencia con el módulo de referencia del que se deriva. Por lo tanto, una variante de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 tiene una identidad de secuencia de al menos 60%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 99.9% con la secuencia de referencia respectiva. Preferiblemente, la identidad de secuencia se extiende a lo largo de toda la longitud de la secuencia respectiva.

Un fragmento (o variante de delección) de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 tiene preferiblemente una delección de hasta 1, 2, 3 o 4 aminoácidos en su extremo N y/o en su extremo C. La eliminación también puede ser interna.

Además, la variante o fragmento de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 solo se considera una variante o fragmento de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en el presente documento, si las modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos en la que se basa la variante o el fragmento no afectan negativamente la capacidad de la catepsina, por ejemplo, catepsina S o B, para escindir esta secuencia. El experto puede evaluar fácilmente si

la catepsina S o B todavía es capaz de escindir la variante de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, por ejemplo, realizando un ensayo enzimático en un sustrato de prueba que comprende la secuencia modificada.

El polipéptido de seda puede ser un polipéptido de seda de araña, por ejemplo, un polipéptido de seda ampulado mayor, tal como un polipéptido de seda de dragline, un polipéptido de seda ampulado menor o un polipéptido de seda flageliforme de una araña de tela orbe (por ejemplo, *Araneidae* o *Araneoids*), un polipéptido de seda de insecto, un polipéptido de seda de bicho de mejillón o una mezcla de los mismos. La araña de tela orbe puede seleccionarse del grupo que consiste en *Araneus diadematus*, *Nephila clavipes*, y *Latrodectus hesperus*. El polipéptido de seda de insectos puede ser de *Lepidoptera*, particularmente *Bombycidae* tal como *Bombyx mori*. El polipéptido de seda de insectos también puede ser de *Hymenoptera*, particularmente *Apoidea* tal como *Anthophila*. Preferiblemente, el polipéptido de seda es un polipéptido de seda de araña.

Se prefiere que el polipéptido de seda sea un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que comprenda o consista en al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% de copias múltiples de unidades repetitivas. Es más preferible que el polipéptido de seda sea un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en al menos 95% de copias múltiples de unidades repetitivas. Dichas unidades repetitivas pueden ser idénticas o diferentes. Se prefiere particularmente que el polipéptido de seda comprenda al menos dos unidades repetitivas idénticas. Por ejemplo, el polipéptido de seda puede comprender entre 2 a 100 unidades repetitivas, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 unidades repetitivas.

Se prefiere además (alternativamente o adicionalmente) que el polipéptido de seda consista entre 40 a 3000 aminoácidos. Es más preferible que el polipéptido de seda consista entre 40 a 1500 aminoácidos. Es aún más preferible que el polipéptido de seda consista entre 200 a 1200 aminoácidos. Lo más preferible es que el polipéptido de seda consista entre 250 a 600 aminoácidos.

También se prefiere (alternativamente o adicionalmente) que el polipéptido de seda sea un polipéptido de seda recombinante.

Como se mencionó anteriormente, se prefiere particularmente que el polipéptido de seda comprenda al menos dos unidades repetitivas idénticas. En una realización, las unidades repetitivas se seleccionan independientemente del grupo que consiste en el módulo C (SEQ ID NO: 3) o una variante del mismo, módulo C^{Cys} (SEQ ID NO: 4) y el módulo C^{kappa} (SEQ ID NO: 18). Módulo C^{Cys} (SEQ ID NO: 4) es una variante del módulo C (SEQ ID NO: 3). En este módulo, el aminoácido S (Ser) en la posición 25 ha sido reemplazado por el aminoácido C (Cys). Módulo C^{kappa} (SEQ ID NO: 18) también es una variante del módulo C (SEQ ID NO: 3). En este módulo, el aminoácido E (Glu) en la posición 20 ha sido reemplazado por el aminoácido K (Lys).

La variante del módulo C difiere del módulo de referencia C del cual se deriva en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 cambios de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones, inserciones, deleciones, truncamientos N-terminales y/o truncamientos C-terminales). Una variante de módulo de este tipo puede caracterizarse alternativa o adicionalmente por un cierto grado de identidad de secuencia con el módulo de referencia del que se deriva. Por lo tanto, la variante del módulo C tiene una identidad de secuencia de al menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 99.9% con el respectivo módulo de referencia C. Preferiblemente, la identidad de secuencia se extiende a lo largo de un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 27, 28, 30, 34, 35 o más aminoácidos, preferiblemente a lo largo de toda la longitud del respectivo módulo de referencia C.

Se prefiere particularmente que la identidad de secuencia sea al menos 80% en toda la longitud, sea al menos 85% en toda la longitud, sea al menos 90% en toda la longitud, sea al menos 95% en toda la longitud, sea al menos 98% en toda la longitud o sea al menos 99% en toda la longitud del respectivo módulo de referencia C. Además, se prefiere particularmente que la identidad de secuencia sea al menos 80% en un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos, sea al menos 85% en un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos, sea al menos 90% en un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos, sea al menos 95% a lo largo de un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos, sea al menos 98% a lo largo de un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos, o sea al menos 99% a lo largo de un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos del respectivo módulo de referencia C.

Una variante de fragmento (o deleción) del módulo C tiene preferiblemente una deleción de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en su extremo N y/o en su extremo C. La eliminación también puede ser interna.

Además, la variante o fragmento del módulo C solo se considera una variante o fragmento del módulo C en el presente documento si las modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos en la que se basa la variante o fragmento no afectan negativamente la capacidad del polipéptido de seda de internalizar el antígeno en la célula objetivo. El experto en la técnica puede evaluar fácilmente si el polipéptido de seda que comprende una variante o fragmento del módulo C todavía es capaz de internalizar el antígeno en la célula objetivo, por ejemplo, cultivando células objetivo, por ejemplo, BMDC, con partículas de seda de araña marcadas con fluorescencia, por ejemplo, marcadas con FITC, que comprenden el antígeno y realizando un análisis de citometría de flujo (véase el ejemplo 11 de la sección experimental).

Las variantes de C^{Cys} o C^{kappa} también podrán incluirse. Respecto a las variantes C^{Cys} o C^{kappa} , se aplican las mismas explicaciones/definiciones que se han realizado con respecto a la variante del módulo C (véase más arriba).

El uso de una proteína con carga positiva tal como C^{kappa} (SEQ ID NO: 18) en contraste con el uso del módulo C (SEQ ID NO: 3) o una variante del mismo da como resultado una carga superficial positiva de los artículos a pH neutro. La carga superficial positiva puede mejorar la absorción en las células.

También se prefiere particularmente que el polipéptido de seda comprenda al menos una unidad no repetitiva (NR). Dicha unidad no repetitiva (NR) puede estar comprendida en el extremo N y/o C. En una realización, la unidad NR se selecciona del grupo que consiste en NR3 (SEQ ID NO: 7) o una variante de la misma, NR4 (SEQ ID NO: 8) o una variante de la misma, NR5 (SEQ ID NO: 9) o una variante de la misma, y NR6 (SEQ ID NO: 10) o una variante de la misma. La unidad NR3 (SEQ ID NO: 7) se basa en la secuencia de aminoácidos del ADF-3 de la araña *Araneus diadematus* y la unidad NR4 (SEQ ID NO: 8) se basa en la secuencia de aminoácidos del ADF-4 de la araña *Araneus diadematus* (documento WO 2006/008163). Además, la unidad NR5 (SEQ ID NO: 9) y la unidad NR6 (SEQ ID NO: 10) se derivan de *Latrodectus hesperus*.

Respecto a la variante de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6, se aplican las mismas explicaciones/definiciones que se han realizado con respecto a la variante del módulo C (véase más arriba).

Además, una variante o fragmento de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 solo se considera una variante o fragmento de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 en el presente documento, si las modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos en la que se basa la variante o el fragmento no afectan negativamente la capacidad del polipéptido de seda para internalizar el antígeno en la célula objetivo. El experto en la técnica puede evaluar fácilmente si el polipéptido de seda que comprende una variante o fragmento de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 todavía es capaz de internalizar el antígeno en la célula objetivo, por ejemplo, cultivando células objetivo, por ejemplo, BMDC, con partículas de seda de araña marcadas con fluorescencia, por ejemplo, marcadas con FITC, que comprenden el antígeno y realizando un análisis de citometría de flujo (véase el ejemplo 11 de la sección experimental).

Se prefiere además particularmente que el polipéptido de seda comprenda al menos una Tag (secuencia). La Tag puede estar comprendida en el extremo N y/o C. La Tag es preferible que no sea repetitiva. Es adecuado para la purificación y/o detección del polipéptido de seda. La Tag puede ser una His-Tag o una T7-Tag. Preferiblemente, la T7-Tag tiene una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 5 o una secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 6.

En una realización preferida, el polipéptido de seda se selecciona del grupo que consiste en $(C)_m$, $(C^{Cys})_m$, $(C^{kappa})_m$, $(C)_m C^{Cys}$, $C^{Cys}(C)_m$, $(C)_m C^{Cys}(C)_m$, $(C)_m NR_z$, $NR_z(C)_m$ y $NR_z(C)_m NR_z$, en donde m es un número entero de 8 a 96, es decir, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 96, z es un número entero de 1 a 3, es decir, 1, 2 o 3, y NR representa una unidad no repetitiva.

En una realización más preferida, el polipéptido de seda se selecciona del grupo que consiste en C_8 , C_{16} , C_{32} , C_{48} , C^{kappa}_8 , C^{kappa}_{16} , C^{kappa}_{32} , C^{kappa}_{48} , $C_8 C^{Cys}$, $C_{16} C^{Cys}$, $C_{32} C^{Cys}$, y $C_{48} C^{Cys}$.

Preferiblemente, el antígeno es un antígeno asociado a la enfermedad. Más preferiblemente, el antígeno, en particular el antígeno asociado a la enfermedad, se selecciona del grupo que consiste en un antígeno viral, un antígeno microbiano, tal como un antígeno bacteriano o fúngico, un antígeno zooparasitario y un antígeno tumoral.

Como antígeno ejemplar, los inventores de la presente solicitud de patente utilizaron un epítipo de ovoalbúmina de pollo (OVA₂₅₇₋₂₆₄) con la secuencia de aminoácidos SIINFEKL (SEQ ID NO: 11). El epítipo de ovoalbúmina de pollo con la secuencia de aminoácidos SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) se seleccionó porque es el sistema mejor caracterizado y generalmente aplicado para demostrar/monitorizar el efecto de los epítopos peptídicos en una reacción inmune. Este sistema de epítipo de ovoalbúmina de pollo con la secuencia de aminoácidos SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) es una herramienta de última generación y se asemeja a un ejemplo universalmente válido para la presentación de una gran cantidad de antígenos al sistema inmunológico. Para los experimentos que se muestran en el presente documento, los inventores de la presente solicitud de patente utilizaron un

polipéptido de seda de araña recombinante que comprende C₁₆ que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 12. Los inventores de la presente solicitud de patente produjeron de forma recombinante diferentes polipéptidos que comprenden un polipéptido de seda y un antígeno o un polipéptido de seda, un enlazador escindible enzimáticamente y un antígeno. El polipéptido que comprende el polipéptido de seda de araña C₁₆ y un epítipo de la ovoalbúmina de pollo (OVA₂₅₇₋₂₆₄) tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 13. El polipéptido que comprende el polipéptido de seda de araña C₁₆, un enlazador escindible de catepsina S y un epítipo de ovoalbúmina de pollo (OVA₂₅₇₋₂₆₄) tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 14. El polipéptido que comprende el polipéptido de seda de araña C₁₆, un enlazador escindible de catepsina B y un epítipo de ovoalbúmina de pollo (OVA₂₅₇₋₂₆₄) tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 15.

Se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente divulgación.

Se prefiere que la molécula de ácido nucleico esté comprendida en un vector. El vector puede ser cualquier vector conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, el vector puede ser un vector plasmídico, un vector viral tal como un vector adenoviral o baculoviral, un vector cósmido o un vector fago tal como un vector fago lambda. Dichos vectores incluyen vectores de expresión, así como de clonación. Los vectores de expresión generalmente contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de ADN apropiadas para controlar la expresión de la secuencia codificante operativamente ligada en un organismo huésped particular (por ejemplo, bacteria, levadura, planta, insecto o mamífero) o en sistemas de expresión *in vitro*. Las secuencias de control de expresión pueden ser secuencias que controlan (i) la expresión, por ejemplo, promotores, TATA-box, potenciadores, (ii) eventos postranscripcionales, por ejemplo, poliadenilación, y (iii) la traducción de secuencias de ácidos nucleicos. Los vectores de clonación se utilizan generalmente para diseñar y amplificar un determinado fragmento de ADN deseado y pueden carecer de las secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados. Los vectores mencionados anteriormente son preferiblemente vectores recombinantes.

La célula puede transformarse, transfectarse o infectarse con la molécula de ácido nucleico o el vector que comprende la molécula de ácido nucleico. La célula se puede utilizar para expresar la molécula de ácido nucleico o amplificar la molécula de ácido nucleico o el vector que comprende la molécula de ácido nucleico. La célula puede ser una célula procariota o eucariota. La célula procariota puede ser una célula *E. coli* o una célula *Bacillus subtilis*. La célula eucariota puede ser una célula de mamífero, una célula vegetal, una célula de levadura o una célula de insecto. La célula de mamífero puede ser una célula CHO, COS, HeLa, 293T, HEH o BHK. La célula de levadura puede ser una célula *Saccharomyces cerevisiae*, una célula *Schizosaccharomyces pombe*, una célula *Pichia pastoris*, una célula *Candida albicans*, o una célula *Hansenula polymorpha*. La célula del insecto puede ser una célula de insecto *Lepidoptera*. La célula vegetal puede ser una célula de tabaco, una célula de patata, una célula de maíz, una célula de guisante o una célula de tomate. Las células mencionadas anteriormente también pueden denominarse células huésped. Se trata preferiblemente de células recombinantes.

Se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para producir un polipéptido que comprende el paso de:

(a) expresar la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación en una célula, produciendo así el polipéptido en la célula.

La célula también puede denominarse célula huésped. La célula puede ser una célula procariota o eucariota. La célula procariota puede ser una célula *E. coli* o una célula *Bacillus subtilis*. La célula eucariota puede ser una célula de mamífero, una célula vegetal, una célula de levadura o una célula de insecto. La célula de mamífero puede ser una célula CHO, COS, HeLa, 293T, HEH o BHK. La célula de levadura puede ser una célula *Saccharomyces cerevisiae*, una célula *Schizosaccharomyces pombe*, una célula *Pichia pastoris*, una célula *Candida albicans*, o una célula *Hansenula polymorpha*. La célula del insecto puede ser una célula *Lepidoptera* de insecto. La célula vegetal puede ser una célula de tabaco, una célula de patata, una célula de maíz, una célula de guisante o una célula de tomate. Las células mencionadas anteriormente son preferiblemente células recombinantes.

La molécula de ácido nucleico puede encontrarse dentro de la célula (i) libremente dispersa como tal, (ii) incorporada en un vector, o (iii) integrada en el genoma celular o en el ADN mitocondrial. Preferiblemente, el vector, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, es un vector de expresión.

La célula puede transformarse, transfectarse o infectarse con la molécula de ácido nucleico o el vector que comprende la molécula de ácido nucleico.

Preferiblemente, el método comprende además el paso de:

(b) aislar el polipéptido de la célula.

- El aislamiento del polipéptido de la célula se puede lograr separando dicho polipéptido de dicha célula mediante centrifugación, sedimentación y/o filtración, por ejemplo, mediante centrifugación y filtración, mediante sedimentación y filtración, mediante sedimentación y centrifugación, o mediante centrifugación, sedimentación y filtración. Dependiendo del polipéptido a cosechar, los parámetros de centrifugación, sedimentación o filtración pueden variar. El experto en la técnica puede adaptar fácilmente los parámetros de separación adecuados, por ejemplo, la fuerza de aceleración/fuerza G y/o el tiempo utilizando centrifugación para la separación, el tamaño del filtro utilizando filtración para la separación y/o el tiempo de sedimentación utilizando sedimentación para la separación, para cosechar dicho polipéptido producido por dichas células.
- Después del paso (b), puede ser necesaria una purificación adicional del polipéptido aislado. Dicha purificación puede lograrse mediante cromatografía, preferiblemente cromatografía en columna, más preferiblemente cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o cromatografía líquida de alta presión, electroforesis, preferiblemente electroforesis en gel, o ultracentrifugación. Un método de aislamiento preferido para la producción de polipéptidos se describe en el documento WO 2011/120690 A2.
- En una realización preferida, el polipéptido purificado está libre de endotoxinas. La eliminación de endotoxinas se logra mediante filtración, esterilización con vapor (por ejemplo, en un autoclave) o una combinación de ambas, es decir, filtración y esterilización con vapor (por ejemplo, en un autoclave).
- En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un artículo para su uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde el artículo comprende un polipéptido que comprende
- (i) un polipéptido de seda, y
 - (ii) un antígeno.
- Preferiblemente, el polipéptido comprende además un enlazador escindible enzimáticamente.
- Más preferiblemente, el antígeno está conectado al polipéptido de seda a través del enlazador escindible enzimáticamente.
- Aún más preferiblemente, el enlazador escindible enzimáticamente es un enlazador escindible por proteasa.
- Aún más preferiblemente, el enlazador escindible por proteasa es un enlazador escindible por cathepsina, preferiblemente un enlazador escindible por cathepsina S o un enlazador escindible por cathepsina B.
- El polipéptido es el polipéptido de la presente divulgación. Las realizaciones preferidas se describen más arriba.
- El artículo también puede denominarse portador de antígeno o vehículo portador de antígeno.
- El artículo puede seleccionarse del grupo que consiste en una partícula, cápsula, fibra, película, gránulo, gel, tela hecha de fibras, varilla o haces de los mismos. Preferiblemente, la varilla comprende o consiste en fibras. Preferiblemente, la tela es un tejido o tela no tejida. Se prefiere que dicho artículo no sea citotóxico ni inmunogénico. Se prefiere además (alternativamente o adicionalmente) que dicho artículo sea esterilizable.
- Preferiblemente dicho artículo es una partícula. Se prefiere que la partícula no sea citotóxica ni inmunogénica. Se prefiere además (alternativamente o adicionalmente) que la partícula sea esterilizable. La partícula es preferiblemente una nanopartícula, porque la captación celular es un aspecto importante de su ruta de acción y, por lo tanto, deseable.
- En una realización, la partícula tiene un diámetro promedio en el rango de 50 nm a 1000 nm, por ejemplo, de 100 nm a 900 nm, de 200 nm a 800 nm, de 200 a 700 nm, de 300 a 600 nm, de 300 nm a 500 nm, o de 300 nm a 400 nm. El rango de 250 a 520 nm es particularmente preferido.
- En una realización adicional, la partícula tiene un diámetro promedio de al menos 50 nm, al menos 60 nm, al menos 70 nm, al menos 80 nm, al menos 90 nm, al menos 100 nm, al menos 150 nm, al menos 200 nm, al menos 250 nm, al menos 300 nm, al menos 400 nm, al menos 500 nm, al menos 600 nm, al menos 700 nm, al menos 800 nm, al menos 900 nm, y/o la partícula tiene un diámetro promedio de no más de 1000 nm, no más de 900 nm, no más de 800 nm, no más de 700 nm, no más de 600 nm, no más de 520 nm, no más de 500 nm, no más de 400 nm, no más de 300 nm, no más de 250 nm, no más de 200 nm, no más de 150 nm, no más de 100 nm, no más de 90 nm, no más de 80 nm, no más de 70 nm, no más de 60 nm.
- En una realización preferida, la partícula tiene un diámetro promedio (i) en el rango de 50 nm a 400 nm, preferiblemente de 50 nm a 200 nm, o (ii) en el rango de 200 nm a 1000 nm, preferiblemente de 200 nm a 800 nm, más preferiblemente de 250 nm a 520 nm o de 300 nm a 600 nm.

Se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para producir un artículo que comprende los pasos de:

- (a) proporcionar una solución acuosa que comprende el polipéptido de la presente divulgación, y
- (b) formar un artículo a partir de la solución proporcionada en (a).

5 Dicho artículo también puede denominarse portador de antígeno o vehículo portador de antígeno.

Como el polipéptido de seda y el antígeno son parte del mismo polipéptido, no es necesario ningún paso de carga adicional después de la formación del artículo.

10 Los artículos, que están compuestos principalmente de seda, funcionan como material auxiliar que estabiliza el antígeno y lo hace transportable. Los artículos pueden degradarse dentro del organismo (por ejemplo, el cuerpo humano) sin dejar rastros.

El proceso de formación del artículo descrito anteriormente no requiere disolventes orgánicos. Evitar el uso de disolventes orgánicos tiene la ventaja de que los antígenos sensibles a ellos conservan sus propiedades características.

15 Preferiblemente, la concentración del polipéptido en la solución acuosa está entre 0.1 % en peso/vol y 30 % en peso/vol, más preferiblemente entre 1 % en peso/vol y 20 % en peso/vol, incluso más preferiblemente entre 1 % en peso/vol y 20 % en peso/vol, y lo más preferiblemente entre 2 a 8 % en peso/vol o entre 4 a 6 % en peso/vol. Así, por ejemplo, la concentración del polipéptido en la solución acuosa es 0.1, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0, 10.0, 12.0, 15.0, 18.0, 20.0, 25.0, o 30.0 % en peso/vol.

20 La solución acuosa puede ser una solución acuosa tamponada o agua (H₂O) tal como H₂O técnica o H₂O desionizada. La solución acuosa tamponada puede ser, por ejemplo, Tris/HCl. Preferiblemente, el pH de la solución acuosa tamponada está entre pH 5.0 y pH 9.0, más preferiblemente entre pH 6.0 y pH 8.0, e incluso más preferiblemente entre pH 6.7 y pH 7.2, por ejemplo, Tris/HCl, pH 7.0, pH 7.5 o pH 8.0. Preferiblemente, la solución acuosa tamponada es una solución entre 10 y 100 mM Tris/HCl, más preferiblemente entre 10 y 50 mM Tris/HCl, y lo más preferiblemente entre 10 y 20 mM Tris/HCl, por ejemplo 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mM Tris/HCl.

25 Dicho artículo puede seleccionarse del grupo que consiste en una partícula, cápsula, fibra, película, gránulo, gel, tejido de fibras, varilla o haces de los mismos. Preferiblemente, la varilla comprende o consiste en fibras. Preferiblemente, la tela es un tejido o tela no tejida. Se prefiere que dicho artículo no sea citotóxico ni inmunogénico. Se prefiere además (alternativamente o adicionalmente) que dicho artículo sea esterilizable.

30 En una realización, el artículo es una partícula. Se prefiere que la partícula no sea citotóxica ni inmunogénica. Se prefiere además (alternativamente o adicionalmente) que la partícula sea esterilizable. Generalmente, a partir de una solución acuosa, se puede desencadenar la agregación del polipéptido en determinadas condiciones para formar partículas. Cuando el artículo es una partícula, el paso (b) comprende desencadenar la agregación del polipéptido. Así, en una realización preferida, el método es para producir una partícula y comprende los pasos de:

- (a) proporcionar una solución acuosa que comprende el polipéptido de la presente divulgación, y
- (b) formar una partícula a partir de la solución proporcionada en (a), en donde dicha formación comprende desencadenar la agregación del polipéptido.

40 La agregación puede desencadenarse por un cambio de pH, un intercambio iónico, fuerzas de cizallamiento, la adición de alcohol, la adición de una sal, la eliminación de agua, un cambio de temperatura y combinaciones de estos factores.

El alcohol puede ser etanol o metanol. La sal es preferiblemente una sal liotrópica. La sal liotrópica puede seleccionarse del grupo que consiste en sulfato de amonio, fosfato de sodio y fosfato de potasio.

45 En otra realización preferida (alternativa o adicional), el método comprende además el paso de:

- (c) separar la partícula mediante separación de fases.

Después de la separación de fases, las partículas producidas pueden separarse aún más mediante métodos rutinarios tales como centrifugación, sedimentación y/o filtración.

50 El tamaño de partícula se puede optimizar ajustando uno o más de los siguientes parámetros: polipéptido de seda y/o concentración de sal, temperatura durante la preparación, intensidad de mezcla y/o solventes orgánicos o acuosos utilizados para la precipitación de proteínas. Alternativamente o adicionalmente, el tamaño

de partícula se puede optimizar ajustando la geometría del dispositivo de mezcla, como un agitador, un mezclador estático o similar.

Las partículas preparadas pueden lavarse posteriormente. Las partículas también pueden almacenarse, por ejemplo, en forma seca o liofilizada. Los procesos pueden realizarse en condiciones asépticas.

- 5 La partícula es preferiblemente una nanopartícula, porque la captación celular es un aspecto importante de su ruta de acción y, por lo tanto, deseable.

En una realización alternativa, el artículo es una fibra. En este caso la solución acuosa también puede denominarse solución de hilado. Se prefiere que la fibra no sea citotóxica ni inmunogénica. Además, se prefiere (alternativamente o adicionalmente) que la fibra sea esterilizable.

- 10 Cuando el artículo es una fibra, el paso (b) comprende estirar una fibra de la solución acuosa/solución de hilado, o extrudir y estirar una fibra de la solución acuosa/solución de hilado. Así, en una realización preferida, el método es para producir una fibra y comprende los pasos de:

(a) proporcionar una solución acuosa que comprende el polipéptido de la presente divulgación, y

- 15 (b) formar una fibra a partir de la solución proporcionada en (a), en donde dicha formación comprende estirar una fibra de la solución acuosa/solución de hilado, o extrudir y estirar una fibra de la solución acuosa/solución de hilado.

El experto en la técnica conoce métodos de hilado como el hilado húmedo o el electrohilado. Por ejemplo, la solución acuosa/solución de hilado se extrude a través de una hilera para formar una fibra. La fibra resultante se puede estirar o extender aún más. Siempre que existan disposiciones tanto cristalinas como amorfas de las moléculas en las fibras, el estiramiento o extensión aplicará una tensión de cizallamiento suficiente para orientar las moléculas para hacerlas más paralelas a las paredes de la fibra y aumentar la resistencia a la tracción y la tenacidad de la fibra.

- 20 La fibra se puede utilizar para fabricar una tela, por ejemplo, una tela tejida o no tejida. El experto en la técnica conoce las técnicas que permiten generar una tela, por ejemplo, los procesos de tejido. Así, en una realización alternativa, el artículo puede ser una tela hecha de fibras. Las fibras también pueden formar parte de una varilla. Preferiblemente, la varilla comprende o consiste en fibras. También pueden incluirse haces de varillas.

En una realización alternativa, el artículo es una película. En este caso la solución acuosa también puede denominarse solución de colada. Se prefiere que la película no sea citotóxica ni inmunogénica. Además, se prefiere (alternativamente o adicionalmente) que la película sea esterilizable. Cuando el artículo es una película, el paso (b) comprende moldear una solución acuosa/una solución de moldeado que comprende el polipéptido sobre un sustrato. Así, en una realización preferida, el método es para producir una película y comprende los pasos de:

(a) proporcionar una solución acuosa que comprende el polipéptido de la presente divulgación, y

- 35 (b) formar una película a partir de/de la solución proporcionada en (a), en donde dicha formación comprende colar una solución acuosa/una solución de colada que comprende el polipéptido sobre un sustrato.

En otra realización preferida (alternativa o adicional), el método comprende además el paso de:

(c) separar/retirar la película del sustrato.

En una realización alternativa, el artículo es una cápsula. Se prefiere que la cápsula no sea citotóxica ni inmunogénica. Además, se prefiere (alternativamente o adicionalmente) que la cápsula sea esterilizable.

- 40 Cuando el artículo es una cápsula, el paso (b) comprende generar una emulsión de al menos dos fases, conteniendo dicha emulsión la solución proporcionada en (a) como una primera fase y al menos una fase adicional, que es sustancialmente inmiscible con dicha primera fase, y formar una red polimérica del polipéptido en la interfaz de las al menos dos fases. Así, en una realización preferida, el método es para producir una cápsula y comprende los pasos de:

- 45 (a) proporcionar una solución acuosa que comprende el polipéptido de la presente divulgación, y

(b) formar una cápsula a partir de la solución proporcionada en (a), en donde dicha formación comprende generar una emulsión de al menos dos fases, conteniendo dicha emulsión la solución proporcionada en (a) como una primera fase y al menos una fase adicional, que es sustancialmente inmiscible con dicha primera fase, y formar una red polimérica del polipéptido en la interfaz de las al menos dos fases.

- 50 En otra realización preferida (alternativa o adicional), el método comprende además el paso de:

(c) separar la red de polímero de proteína (cápsula) de la emulsión. Esto puede realizarse mediante centrifugación, sedimentación y/o filtración.

Un método preferido para producir cápsulas a partir del polipéptido se describe en el documento WO 2007/014755 A1.

- 5 El artículo también puede ser un gránulo o un gel. Un método preferido para producir geles a partir del polipéptido se describe en el documento WO 2007/014755 A1.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende el artículo como se define en el primer aspecto.

- 10 El artículo también puede denominarse portador de antígeno o vehículo portador de antígeno.

El artículo puede seleccionarse del grupo que consiste en una partícula, cápsula, fibra y película. Se prefiere que dicho artículo no sea citotóxico ni inmunogénico. Se prefiere además (alternativamente o adicionalmente) que dicho artículo sea esterilizable.

- 15 Los inventores de la presente solicitud de patente descubrieron sorprendentemente que después de la administración sistémica de los artículos, se produjo una acumulación de artículos en los ganglios linfáticos locales y/o en células presentadoras de antígenos, en particular en células dendríticas y/o macrófagos. Además, los artículos formaron un depósito debajo de la piel. El antígeno transportado por el artículo indujo una respuesta inmune en dichas células.

- 20 Dicha composición farmacéutica es útil para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno. Puede administrarse local o sistémicamente. Se prefiere que la composición farmacéutica esté formulada para administración local o administración sistémica. En particular, la administración local se realiza mediante administración parenteral, por ejemplo, mediante administración intravenosa, administración subcutánea, administración intradérmica, administración intramuscular, y la administración sistémica se realiza mediante administración intraarterial. Preferiblemente, la composición se administra por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular.

- 25 Se prefiere además que la composición comprenda además uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. También puede estar presente un adyuvante.

- 30 Los inventores de la presente solicitud de patente descubrieron sorprendentemente que ya no es necesario el uso de adyuvantes en una composición farmacéutica que comprende antígenos que son parte de artículos, por ejemplo, partículas, que comprenden polipéptidos de seda. La eficacia de un antígeno comprendido en una composición sin adyuvantes es mejor o al menos tan buena como la del mismo antígeno comprendido en una composición con adyuvantes. La omisión de adyuvantes tiene el efecto positivo de que se pueden reducir, y en algunos casos incluso evitar, los efectos secundarios y la incompatibilidad de las vacunas. Por tanto, se prefiere alternativamente que la composición no comprenda además un adyuvante.

- 35 Así, en un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica libre de adyuvantes para su uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde la composición comprende un artículo que comprende un polipéptido que comprende

(i) un polipéptido de seda, y

- 40 (ii) un antígeno.

Como se mencionó anteriormente, se induce una respuesta inmune contra el cáncer.

- 45 El cáncer puede ser, por ejemplo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia. Más particularmente, el cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de huesos, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (CNS), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma o adenoma pituitario.

- 50 Como se mencionó anteriormente, se induce una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa o autoinmune.

- Una enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana o una enfermedad parasitaria. Más particularmente, una enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, la hepatitis, las enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia o gonorrea), la tuberculosis, el HIV/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS), la difteria, la hepatitis B, la hepatitis C, el cólera, el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), la gripe aviar o la influenza.
- Una enfermedad autoinmune puede ser, por ejemplo, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves, el lupus, la esclerosis múltiple, la artritis reumática, la anemia hemolítica, la tiroiditis antiinmune, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad celíaca, la enfermedad de Crohn, la colitis, la diabetes, la esclerodermia o la psoriasis.
- La inducción de una respuesta inmune puede resultar en la inmunización o vacunación del sujeto/paciente tratado.
- Se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un artículo como se describió anteriormente o una composición farmacéutica como se describió anteriormente para su uso en un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad.
- Se prefiere que la enfermedad sea cáncer.
- El cáncer puede ser, por ejemplo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia. Más particularmente, el cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de huesos, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma o adenoma pituitario.
- Se prefiere además (alternativamente o adicionalmente) que la enfermedad sea una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmune.
- Una enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana o una enfermedad parasitaria. Más particularmente, una enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, la hepatitis, las enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia o gonorrea), la tuberculosis, el HIV/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS), la difteria, la hepatitis B, la hepatitis C, el cólera, el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), la gripe aviar o la influenza.
- Una enfermedad autoinmune puede ser, por ejemplo, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves, el lupus, la esclerosis múltiple, la artritis reumática, la anemia hemolítica, la tiroiditis antiinmune, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad celíaca, la enfermedad de Crohn, la colitis, la diabetes, la esclerodermia o la psoriasis. Se prefiere además que la enfermedad sea una enfermedad respiratoria.
- El antígeno, tal como se describe en el presente documento, se aplica preferiblemente de forma directa al área objetivo. La aplicación directa del antígeno en el área objetivo permite mayores concentraciones locales de ingredientes farmacéuticos activos (API) y al mismo tiempo se minimizan los efectos secundarios adversos de una aplicación sistémica. El uso de artículos nebulizados (partículas, micropartículas o cápsulas) puede mejorar la deposición de API en las vías respiratorias inferiores. La administración de antígenos pulmonares o vacunación pulmonar permite inducir sistémicamente la respuesta inmune, debido a que una gran cantidad de células inmunes se localizan en la mucosa del tejido oral, nasal o pulmonar. La administración de artículos (partículas, micropartículas o cápsulas) al pulmón es un intento de administración atractivo para la vacunación pulmonar, porque el péptido está protegido por las partículas y se liberará una vez que las partículas hayan sido absorbidas por las células presentadoras de antígenos. Como siempre existe el riesgo de perder el antígeno cargado durante el proceso de aerosolización, los artículos y la composición farmacéutica descritos en el presente documento son una alternativa prometedora. Debido a la integración de la parte farmacéutica activa en la secuencia de aminoácidos de la molécula portadora de antígeno, el riesgo de pérdida de antígeno durante la nebulización es muy bajo.
- Se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un artículo como se describió anteriormente o una composición farmacéutica como se describió anteriormente para estimular, preparar y/o expandir células T en un sujeto.
- Se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para administrar un antígeno a una célula que comprende administrar a un sujeto el artículo como se describió anteriormente o la composición farmacéutica como se describió anteriormente.

En una realización preferida, la administración comprende la internalización del artículo en la célula y la liberación del antígeno del artículo. Se prefiere que el antígeno sea liberado del artículo por una enzima, que corta el enlazador escindible enzimáticamente (dentro de la célula, intracelularmente), entregando así el antígeno a la célula. Preferiblemente, el enlazador escindible enzimáticamente es un enlazador escindible por proteasa, más preferiblemente un enlazador escindible por catepsina, incluso más preferiblemente un enlazador escindible por catepsina S o B, lo más preferiblemente (i) un enlazador escindible por catepsina S que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o una variante del mismo, o un enlazador escindible de catepsina S que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o una variante del mismo, o (ii) un enlazador escindible de catepsina B que tiene la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 2. La enzima es preferiblemente una proteasa, más preferiblemente catepsina, aún más preferiblemente catepsina S o B.

Se prefiere que la célula sea una célula presentadora de antígeno. Es más preferible que la célula presentadora de antígeno sea una célula dendrítica y/o un macrófago.

El sujeto puede estar sano y se le administra el antígeno para inmunización o vacunación. El sujeto también puede estar enfermo (es decir, ser un paciente), por ejemplo, que padece cáncer, y el antígeno se administra para curar la enfermedad.

Se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto que comprende administrar a un sujeto el artículo como se describió anteriormente o la composición farmacéutica como se describió anteriormente.

Se prefiere que se induzca una respuesta inmune contra el cáncer.

El cáncer puede ser, por ejemplo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia. Más particularmente, el cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de huesos, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (CNS), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma o adenoma pituitario.

Se prefiere además (alternativamente o adicionalmente) que se induzca una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmune.

Una enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana o una enfermedad parasitaria. Más particularmente, una enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, la hepatitis, las enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia o gonorrea), la tuberculosis, el HIV/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS), la difteria, la hepatitis B, la hepatitis C, el cólera, el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), la gripe aviar o la influenza.

Una enfermedad autoinmune puede ser, por ejemplo, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves, el lupus, la esclerosis múltiple, la artritis reumática, la anemia hemolítica, la tiroiditis antiinmune, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad celíaca, la enfermedad de Crohn, la colitis, la diabetes, la esclerodermia o la psoriasis.

La inducción de una respuesta inmune puede resultar en la inmunización o vacunación del sujeto/paciente tratado.

Se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad en un sujeto que comprende administrar a un sujeto el artículo como se describió anteriormente o la composición farmacéutica como se describió anteriormente.

Se prefiere que la enfermedad sea cáncer.

El cáncer puede ser, por ejemplo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia. Más particularmente, el cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de huesos, cáncer de sangre, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (CNS), cáncer neuroectodérmico, tumores del eje espinal, glioma, meningioma o adenoma pituitario.

Se prefiere además (alternativamente o adicionalmente) que la enfermedad sea una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmune.

5 Una enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana o una enfermedad parasitaria. Más particularmente, una enfermedad infecciosa puede ser, por ejemplo, la hepatitis, las enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia o gonorrea), la tuberculosis, el HIV/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS), la difteria, la hepatitis B, la hepatitis C, el cólera, el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), la gripe aviar o la influenza.

10 Una enfermedad autoinmune puede ser, por ejemplo, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves, el lupus, la esclerosis múltiple, la artritis reumática, la anemia hemolítica, la tiroiditis antiinmune, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad celíaca, la enfermedad de Crohn, la colitis, la diabetes, la esclerodermia o la psoriasis.

Se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para estimular, preparar y/o expandir células T en un sujeto que comprende administrar a un sujeto el artículo como se describió anteriormente o la composición farmacéutica como se describió anteriormente.

15 El listado de secuencias comprende las siguientes secuencias:

SEQ ID NO: 1	enlazador escindible de catepsina S
SEQ ID NO: 2	enlazador escindible de catepsina S y B
SEQ ID NO: 3	módulo C
SEQ ID NO: 4	módulo C ^{Cys}
SEQ ID NO: 5	T7-Tag
SEQ ID NO: 6	T7-Tag
SEQ ID NO: 7	Unidad NR3
SEQ ID NO: 8	Unidad NR4
SEQ ID NO: 9	Unidad NR5
SEQ ID NO: 10	Unidad NR6
SEQ ID NO: 11	epítipo de ovoalbúmina de pollo (OVA ₂₅₇₋₂₆₄), SIINFEKL
SEQ ID NO: 12	C16
SEQ ID NO: 13	C 16-SIINFEKL
SEQ ID NO: 14	C16-CathS-SIINFEKL
SEQ ID NO: 15	C16-CathB-SIINFEKL
SEQ ID NO: 16	Secuencia IGSIIINFEKLG escindida del polipéptido híbrido que comprende el enlazador escindible de catepsina B y el epítipo de ovoalbúmina de pollo (OVA ₂₅₇₋₂₆₄)
SEQ ID NO: 17	Secuencia LPGSIINFEKLG escindida del polipéptido híbrido que comprende el enlazador escindible de catepsina S y el epítipo de ovoalbúmina de pollo (OVA ₂₅₇₋₂₆₄)
SEQ ID NO: 18:	módulo C ^{kappa}

Respecto al SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 15 cabe señalar que la G C-terminal (Gly) puede estar presente o no.

Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras y ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención tal como se indica en las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera.

5 FIGURA 1: Ninguna de las partículas de seda de araña induce citotoxicidad de BMDC *in vitro*. La Figura 1A muestra un diagrama de puntos de la citometría de flujo con yoduro de propidio (PI) y anexina V. BMDC (5×10^4 células/pocillo) se cultivaron con partículas de seda de araña a 505 ug de partícula/ml (=10 ug de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11)/mL). Después de 24 horas de incubación, se evaluó la viabilidad de BMDC mediante citometría de flujo y ensayo MTT.

10 (A) Diagrama de puntos representativo de la citometría de flujo con yoduro de propidio (PI) y anexina V.

(B) Esquema de la estrategia de compuertas para cuantificar células sanas vivas (anexina V-PI-).

(C) Porcentaje de células sanas vivas (anexina V-PI-).

(D) Densidad óptica (OD) a 570 nm en correlación con la producción de formazán del ensayo MTT.

15 Se utilizó como control la condición sin células (sólo medio). n.d.: no realizado. Los asteriscos (****, $P < 0.0001$) indican diferencias significativas con el grupo de control no tratado utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. (C y D) Cada barra representa la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. (Excepto el Panel C, C16-SIIN: probado una vez por duplicado). Solo se utilizó medio como control, sin tratamiento: grupo de control sin tratamiento; péptido de SIIN: SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) solo; C16: partículas nativas de C16; C16-SIIN; C16-CathBseq-SIIN, partículas de proteína híbrida C16-CathSseq-SIIN.

20 C16-CathSseq-SIIN.

FIGURA 2: Las partículas de seda de araña no inducen la activación inmunológica del BMDC *in vitro*

La Figura 2A muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los marcadores de activación de superficie de BMDC MHC I y MHC II de células BMDC cultivadas con SIIN, CathBseq-SIIN y C16-CathSseq-SIIN en comparación con la muestra no tratada. La Figura 2B muestra la cuantificación de citoquinas con ELISA. Se utilizó R848 (R8), un agonista de TLR7, como control positivo. BMDC (5×10^4 células/pocillo) se cultivaron con partículas de seda de araña a 50 ug de partícula/mL. Después de 24 horas de incubación, los BMDC se analizaron mediante citometría de flujo, mientras que el sobrenadante se recogió para la cuantificación de citoquinas.

25 (A) Intensidad de fluorescencia media (MFI) de los marcadores de activación de superficie de BMDC: cambio de plegamiento en comparación con la muestra no tratada.

30 (B) Cuantificación de citoquinas con ELISA. Se utilizó R848 (R8), un agonista de TLR7, como control positivo (0.25 ug/mL). Los asteriscos (***, $P < 0.001$) indican diferencias significativas con el grupo de control no tratado utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de 4 experimentos independientes realizados por duplicado.

35 FIGURA 3: Las partículas de seda de araña son absorbidas eficientemente por las células presentadoras de antígenos.

La Figura 3A muestra la absorción de partículas C16 sin SIIN (C16), partículas híbridas C16 C16-SIIN, partículas híbridas C16 con sitio de escisión de cathepsina B (C16-CathBseq-SIIN) y partículas híbridas C16 con sitio de escisión de cathepsina S (C16-CathSseq-SIIN). Las células no tratadas (no tratadas) y el polipéptido SIIN (SIIN) sirven como controles. La Figura 3B muestra el porcentaje de células FITC-positivas determinadas en poblaciones de células inmunes definidas: Células T (CD3+), células dendríticas (CD11c+CD11b+) y monocitos/macrófagos (CD11c-CD11b+) en comparación con células no tratadas.

40 (A) BMDC (5×10^4 células/pocillo) se cultivaron con partículas de seda de araña marcadas con FITC a 50 ug de partículas/mL. Después de 24 horas de incubación, se aislaron BMDC para análisis de citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de células FITC-positivas dentro de la población BMDC (CD11c+). Cada barra representa la media $\pm$ SEM de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. (Excepto C16-SIIN: probado una vez por duplicado).

45 (B) Esplenocitos recién aislados (5×10^4 células/pocillo) se cultivaron durante 6 horas con partículas de seda de araña marcadas con FITC. Después de 6 horas de incubación, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de células FITC-positivas en poblaciones de células inmunes definidas: Células T (CD3+), células dendríticas (CD11c+CD11b+) y monocitos/macrófagos (CD11c-CD11b+). El gráfico muestra un experimento representativo de 3. Cada experimento se realizó por duplicado.

50

FIGURA 4: La secuencia de catepsina S es la más eficaz para inducir la proliferación de células T in vitro dependiente de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11)

La Figura 4 muestra el porcentaje de células T CD8 proliferantes dentro de la población de células T (CD3+CD8+). El porcentaje de proliferación de células T CD8 expuestas a células BMDC con partículas C16 CathSseq-SIINFEKL y partículas C16 CathBseq-SIINFEKL fue significativamente mayor en comparación con el control no tratado. El porcentaje de proliferación de células T CD8 expuestas a células BMDC con partículas C16 CathSseq-SIINFEKL fue significativamente mayor que el porcentaje de células expuestas a células BMDC con partículas C16 CathBseq-SIINFEKL. Se cultivaron BMDC (5 x 10⁴ células/pocillo) con partículas de seda de araña a 50 ug de partículas/mL. Se utilizó R848 (0.25 ug/mL) como adyuvante para la activación de BMDC. Después de 24 horas de incubación, se añadieron las células CD3+CD8+ OT-I marcadas con CFSE (10⁵ células/pocillo). Después de 3 días de cocultivo, las células se analizaron mediante citometría de flujo.

Porcentaje de células proliferantes dentro de la población de células T (CD3+CD8+). Cada barra representa la media $\pm$ SEM de 2 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Los asteriscos (**, P<0.01) indican diferencias significativas entre los grupos tratados con R848 utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

FIGURA 5: Las partículas de seda de araña híbrida se acumulan en el ganglio linfático de drenaje *in vivo*.

La Figura 5A muestra el número de células FITC positivas (que comprenden partículas C16-CathSseq-SIINFEKL marcadas con FITC) en los ganglios linfáticos de drenaje (DLN) de 3 ratones tratados con partículas FITC en comparación con un grupo de control de 3 ratones tratados con PBS en varios tejidos (DLN, no DLN y bazo).

Se inyectaron partículas C16-CathSseq-SIINFEKL marcadas con FITC por vía subcutánea en el flanco derecho de 3 ratones (505 ug de partículas en 100 μ L de PBS por ratón). Se utilizó PBS como control negativo. Después de 24 horas, se aislaron los ganglios linfáticos de drenaje ipsilaterales (DLN), los ganglios linfáticos contralaterales (no DLN) y el bazo para el análisis de citometría de flujo.

(A) Número de células FITC-positivas en los diferentes órganos linfáticos

(B) Porcentaje de células FITC-positivas dentro de poblaciones de células inmunes definidas.

Cada punto representa un ratón. Las barras representan la media $\pm$ SEM. Los asteriscos (***, P<0.001) indican diferencias significativas al comparar ratones tratados con partículas FITC con ratones tratados con PBS utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

La Figura 5A muestra que las partículas C16-CathSseq-SIINFEKL se acumularon en el ganglio linfático de drenaje (DLN) después de la administración. Los resultados ilustrados en la Figura 5B apuntan a una captación por parte de las células dendríticas (CD11c+CD11b+) en lugar de por los macrófagos (CD11c-CD11b+) o los leucocitos (CD11b-).

FIGURA 6: Las partículas de seda de araña que contienen SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) inducen la proliferación de células T dependiente de antígeno *in vivo*.

La Figura 6 muestra la proliferación de células T CD8 de ratones inmunizados con partículas C16-CathSseq-SIINFEKL. La proliferación de células T CD8 fue significativamente mayor sin el adyuvante R848.

Se inyectaron por vía intravenosa en ratones 10⁶ células CD3+CD8+ OT-I marcadas con CFSE en 100 μ L de PBS (cada punto representa un ratón). 18 horas después, los ratones fueron vacunados con partículas de seda de araña (505 ug de partículas en 100 μ L de PBS por ratón). Se utilizó R848 (25 ug) como adyuvante. Tres días después de la vacunación, se aislaron los DLN para análisis de citometría de flujo para determinar la proliferación de células OT-I CD3+CD8+ marcadas con CFSE. Cada punto representa un ratón. Las barras representan la media $\pm$ SEM. Los asteriscos (****, P<0.0001) indican diferencias significativas con el control tratado con R848 utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. La proliferación de células T CD8 fue mayor sin adyuvante R848. Se pudo demostrar que las partículas de proteína C16-CathSseq-SIINFEKL fueron capaces de inducir niveles similares o superiores de proliferación de células T CD8+ con o sin el uso del adyuvante inmunoestimulante R848.

FIGURA 7: Incubación de Enzima catepsina S de partículas C16 C16-CathB-SIINFEKL y C16-CathS-SIINFEKL con las enzimas catepsina S y catepsina B *in vitro*

Liberación diferencial del antígeno con diferentes enzimas catepsinas. La secuencia LPGSIINFEKLG (SEQ ID NO: 17) se liberó de las partículas de proteína híbrida C16-CathS-SIINFEKL, mientras que la secuencia IGSIIINFEKLG (SEQ ID NO: 16) se liberó de las partículas de proteína híbrida C16-CathB-SIINFEKL. Dichas secuencias comprenden la secuencia SIINFEKL (SEQ ID NO: 11). Los datos son la media y la SD (desviación estándar) de 3 réplicas independientes. La enzima catepsina S muestra una mejor escisión de péptidos de

SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) de ambas partículas de proteína híbrida C16 que la catepsina B. La catepsina S también escinde péptidos de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) de partículas diseñadas para la liberación de catepsina B.

(A) Partículas de proteína híbrida eADF4(C16) incubadas con la enzima catepsina S durante 96 horas.

5 (B) Partículas de proteína híbrida eADF4(C16) incubadas con la enzima catepsina B durante 96 horas.

Ejemplos

Los ejemplos que se dan a continuación son sólo para fines ilustrativos y no limitan de ninguna manera la invención descrita anteriormente.

10 Los términos "NP" y "partícula de seda de araña", los términos "C16-CathB-SIINFEKL", "C16-CathB-SIIN", "eADF4(C16) CathB" y "SSP25 - eADF4(C16-CathB-CD8)", los términos "C16-CathS-SIINFEKL", los términos C16-CathS-SIIN", "eADF4(C16)CathS" y "SSP26 - eADF4(C16-CathS-CD8)" se utilizan indistintamente en el presente documento. SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) representa la secuencia de aminoácidos de un epítipo de la ovoalbúmina de pollo (OVA₂₅₇₋₂₆₄). Este antígeno estimula una respuesta inmune a través de la interacción con el MHC I y el receptor de células T CD8.

15 Ejemplo 1: Producción de partículas antigénicas de polipéptidos de seda

Los polipéptidos SSP25 - eADF4(C16-CathS-CD8) (1), SSP26 - eADF4(C16-CathB-CD8) (2), C16-SIIN (3) y C16 (4) se sintetizaron mediante síntesis génica en Genearth (Regensburg).

(1) C16-CathS-SIINFEKL respectivamente SSP26 - eADF4(C16-CathS-CD8) (SEQ ID NO: 14)

(C16) GPMGLPG SIINFEKL

20 Polipéptido híbrido que comprende C16, un sitio de escisión de la proteasa catepsina S y SIINFEKL (SEQ ID NO: 11).

(2) C16-CathB-SIINFEKL respectivamente SSP25 - eADF4(C16-CathB-CD8) (SEQ ID NO: 15)

(C16) GAVGFLGIG SIINFEKL

25 Polipéptido híbrido que comprende C16, un sitio de escisión de la proteasa catepsina B y SIINFEKL (SEQ ID NO: 11).

(3) C16-SIINFEKL (SEQ ID NO: 13)

(C16) GGSG SIINFEKL

Polipéptido híbrido que comprende C16 y SIINFEKL (SEQ ID NO: 11).

(4) C16 (SEQ ID NO: 12)

30 C16

Polipéptido híbrido sin antígeno (SIINFEKL (SEQ ID NO: 11)).

Los polipéptidos que codifican SSP25 - eADF4(C16-CathB-CD8), SSP26 - eADF4(C16-CathS-CD8), C16-SIINFEKL y C16 se produjeron y purificaron como se describe en el documento WO 2006/008163 A2.

Ejemplo 2: Esterilización mediante tratamiento en autoclave

35 En un primer paso se pesaron aproximadamente 150 mg de la proteína (C16-CathB-SIINFEKL, C16-CathS-SIINFEKL, C16-SIINFEKL y C16) en viales de vidrio (DIN 10R). Posteriormente, la proteína C16 se suspendió con 7.5 ml de HPW (agua altamente purificada). Los viales se cerraron con tapones de goma y se sellaron con cápsulas de aluminio. La esterilización con vapor se realizó durante 15 minutos a 121°C en un autoclave GTA 50 (Fritz Gössner, Hamburgo, Alemania). Después de enfriarse, la suspensión de proteína C16 se centrifugó a 40 10,000 rpm (SIGMA 4K15, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Alemania) durante 30 minutos y se descartó el sobrenadante. La proteína C16 centrifugada se disolvió en una solución de tiocianato de guanidina 6 M y se dializó contra una solución de TRIS/HCl 10 mM libre de endotoxinas, pH 8.0 durante 24 h.

45 La concentración de proteína de C16-CathB-SIINFEKL después de la diálisis fue de 3.91 mg/ml, la concentración de proteína de C16-CathS-SIINFEKL fue de 3.56 mg/ml, la concentración de proteína de C16-SIINFEKL fue de 3.81 mg/ml y la concentración de proteína de C16 fue de 3.88 mg/ml. La concentración de proteína de todas las soluciones se ajustó a 1 mg/ml. Los valores de endotoxinas de las soluciones fueron <0.200 EU/mg. La esterilización de partículas de seda de araña no tuvo ningún efecto perjudicial sobre el

tamaño de las partículas, la estructura secundaria y la estabilidad térmica. Después de la esterilización mediante tratamiento en autoclave, no se observaron cambios en el tamaño ni en la estructura secundaria de las partículas, ni tampoco cambios funcionales. Mantener la función después de la esterilización es ventajoso en vista de los sistemas de la técnica anterior.

5 Ejemplo 3: Preparación de partículas

Después de la eliminación de endotoxinas, las soluciones de proteínas (C16-CathB-SIINFEKL, C16-CathS-SIINFEKL, C16-SIINFEKL y C16) se ajustaron a 1 mg/ml con tampón TRIS/HCl 10 mM libre de endotoxinas, pH 8.0 para la preparación de partículas. La preparación de partículas se realizó mediante micromezcla utilizando un sistema de bomba de jeringa de alta presión. Los cilindros de la bomba de jeringa se despirogenizaron con etanol al 70 % (v/v) durante 48 h. Posteriormente, los cilindros se lavaron tres veces con HPW para eliminar cualquier disolvente orgánico. Después de la despirogenación, ambos cilindros del sistema de bomba de jeringa (modelo 100 DX y controlador de bomba serie D, Teledyne Isco, Lincoln, EE. UU.) se llenaron con solución de C16 pretemperada y tampón de fosfato de potasio 2 M pretemperado libre de endotoxinas pH 8.0 o solución de sulfato de amonio 4 M de 80°. Las soluciones se bombearon a un caudal alto de 50 ml/min a un elemento mezclador en forma de T (diámetro interior de 0.5 mm, T de PEEK P-727, Upchurch Scientific, Oak Harbor, EE. UU.) que conducía a un tubo de salida (diámetro interior de 0.5 mm, tubo de PEEK 1532, Upchurch Scientific, Oak Harbor, EE. UU.) para la recolección de la suspensión. Las suspensiones de partículas C16 se centrifugaron posteriormente a 14,000 rpm (SIGMA 4K15, Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Alemania) y se lavaron con HPW tres veces. Un paso de ultrasonificación de dos minutos (Sonopuls HD 3200, Bandelin electronic, Berlín, Alemania) completó el procedimiento de preparación de partículas. Las concentraciones de partículas en mg/ml se determinaron gravimétricamente después de secar las partículas al vacío (13 mbar) durante la noche.

La concentración de partículas de C16-CathB-SIINFEKL fue de 32.75 mg/ml, la concentración de proteína de C16-CathS-SIINFEKL fue de 34.72 mg/ml, la concentración de proteína de C16-SIINFEKL fue de 30.06 mg/ml y la concentración de proteína de C16 fue de 32.52 mg/ml.

Ejemplo 4: Optimización del tamaño de partículas C16

Se analizó el proceso de preparación de partículas mediante micromezcla para reducir aún más el tamaño de partícula final. Se seleccionaron algunos parámetros para cambiarlos en comparación con el proceso de preparación anterior. La concentración de la solución C16 utilizada para la preparación de partículas se ajustó a 0.5-1.0 mg/ml. La solución de fosfato de potasio 2 M utilizada hasta ahora para la precipitación de partículas se complementó con una solución de sulfato de amonio 2 M, 3 M y 4 M. El caudal de la solución salina se mantuvo en 50 ml/min, mientras que el caudal de la solución de proteína se ajustó a 25-50 ml/min. Para estos estudios se utilizó la proteína C16 nativa. Todos los demás parámetros se mantuvieron como se describió anteriormente y el tamaño de partícula final se analizó después de la preparación de las partículas con las configuraciones de bomba de jeringa modificadas que se describen aquí. Las partículas resultantes tienen un diámetro promedio en el rango de 250 nm a 520 nm.

Ejemplo 5: Liberación *in vitro* de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) a partir de partículas híbridas C16 (*in vitro*)

La liberación de la secuencia de antígeno SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) de los polipéptidos híbridos SSP25 - eADF4(C16-CathB-CD8) y SSP26 - eADF4(C16-CathS-CD8) se probó mediante la adición de enzimas catépsinas. Como los polipéptidos híbridos contienen secuencias de enlace escindibles para las enzimas catépsina S y catépsina B, estas dos catépsinas también se utilizaron para los estudios de liberación *in vitro*.

Las partículas de polipéptido híbrido C16 se suspendieron a una concentración final de 2 mg/ml con un tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5.5, que contenía 1 mM de EDTA y 2 mM de DTT para la incubación con la enzima catépsina S. La catépsina S se diluyó en el mismo tampón hasta una concentración final de 0.9 mU/ml. Se realizó una ligera modificación del pH del tampón para la enzima catépsina B.

Las partículas de polipéptido híbrido C16 se suspendieron a una concentración final de 2 mg/ml con un tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0, que contenía 1 mM de EDTA y 2 mM de DTT para la incubación con la enzima catépsina B. La catépsina B se diluyó en el mismo tampón hasta una concentración final de 0.1 U/ml. La incubación de las partículas con las enzimas se realizó a 37°C en un agitador de plataforma vibratoria (Heidolph Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Alemania) a 10 rpm. Se extrajeron muestras (sobrenadante) después de 1, 6, 24, 48, 72 y 96 h y se utilizaron para análisis mediante RP-HPLC.

Los fragmentos de péptidos de SIINFEKL escindido (SEQ ID NO: 11) se analizaron mediante RP-HPLC. El sobrenadante de cada muestra se eliminó de las partículas mediante centrifugación (dos veces a 12,000 rpm durante 30 minutos). Las pellas se descartaron y 180 µl del sobrenadante se llenaron en insertos de vidrio para HPLC y se analizaron por RP-HPLC (detección por UV-Vis a 220 nm). Se separaron volúmenes de 50 µl de los sobrenadantes correspondientes a 30 °C mediante una columna de fase inversa YMC-Triart C18 (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Alemania) utilizando un módulo de separación Waters 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). Se aplicó un gradiente con dos fases móviles, utilizando agua +0.1% [m/m] TFA (fase móvil A) y

100% acetonitrilo + 0.1% [m/m] TFA (fase móvil B). Cada ejecución comenzó con dos minutos de fase móvil A al 95% y fue seguida por un aumento lineal de la fase móvil B del 5% al 100% durante 28 minutos. Se utilizó un paso de lavado de cinco minutos con 100% de fase móvil B para lavar el péptido/proteína residual de la columna. La separación se detuvo tras una equilibración de cinco minutos de la columna al 95 % de fase móvil A. La detección se realizó en un detector UV-Vis 2487 de Waters (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) a una longitud de onda de 220 nm para detectar los péptidos de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11). La cantidad de los péptidos de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) liberados se analizaron utilizando una curva estándar. En particular, la escisión de los péptidos de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) del polipéptido híbrido con el enlazador escindible de cathepsina S resultó en un péptido con la secuencia IGSINFEKLG (SEQ ID NO: 16). Además, la escisión de los péptidos de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) del polipéptido híbrido con el enlazador escindible de cathepsina S resultó en un péptido con la secuencia LPGSIINFEKLG (SEQ ID NO: 17). SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) está comprendido en IGSINFEKLG (SEQ ID NO: 16) así como en LPGSIINFEKLG (SEQ ID NO: 17). Estos dos péptidos se utilizaron para la curva estándar en concentraciones de 10, 20, 30, 50 y 100 µg/ml disueltos en 50% DMSO / 50% agua. El área de cada uno de los péptidos en el cromatograma se integró y se utilizó para el cálculo de curvas de calibración después de la inyección y el análisis. El análisis de datos se realizó con software Chromeleon® 6.80 (Dionex GmbH, Germering, Alemania).

La Figura 7A muestra la liberación total en porcentaje de péptidos de SIINFEKL escindidos (SEQ ID NO: 11) para los polipéptidos híbridos SSP25 - eADF4(C16-CathB-CD8) y SSP26 - eADF4(C16-CathS-CD8) en función del tiempo (1, 6, 24, 48, 72 y 96 h).

La enzima cathepsina S muestra una mejor escisión de péptidos de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) de ambas partículas polipeptídicas híbridas. La cathepsina S también escinde péptidos de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) de partículas diseñadas para la liberación de cathepsina B, pero de forma más lenta y en menor medida. Esto no se podía esperar, porque el enlazador que fue asignado para la escisión por la enzima cathepsina S (PMGLP, SEQ ID NO: 20) y no para la escisión de la secuencia de enlazador de la cathepsina B (GFLG, SEQ ID NO: 21).

A diferencia de la cathepsina B, la cathepsina S sólo se expresa en ciertos tejidos. La cathepsina S desempeña un papel clave en la degradación de proteínas antigénicas y su posterior procesamiento a través de la vía del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. Las partículas enlazadoras de cathepsina S se seleccionaron para estudios con ratones *in vivo*.

La Figura 7 A muestra la incubación de las partículas de proteína híbrida con la enzima cathepsina S, mientras que la Figura 7 B muestra la incubación de las partículas de proteína híbrida con la enzima cathepsina B. Escisión enzimática de los péptidos de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11) de las partículas de proteína híbrida SSP tiene éxito *in vitro*, que es la base para posteriores estudios *in vitro* e *in vivo*.

Ejemplo 6: Las partículas híbridas de seda de araña no inducen citotoxicidad de BMDC

Preparación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC)

Las BMDC se generaron a partir de células de médula ósea primaria obtenidas mediante el lavado de tibias y fémures de ratones C57BL/6Rj con PBS frío. La lisis de eritrocitos se realizó con BD Pharm Lyse (BD Biosciences, EE. UU.) durante 1 min. A continuación, las células se resuspendieron en medio BMDC completo que consiste en RPMI 1640 (Biowest, Francia) suplementado con 10 % de FCS (Biological Industries, Israel), 1 % de L-glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 U/mL de estreptomicina, 50 µM de 2-mercaptoetanol y 0.5 mM de piruvato sódico (todos de PAA Laboratories, Austria), suplementado con 40 ng/ml de GM-CSF (PeproTech, EE. UU.). Las células débilmente adherentes se recolectaron después de 6 días de diferenciación. El porcentaje de células CD11c+ CD11b+ fue habitualmente superior al 70%.

Exposición a partículas de seda de araña

BMDC (5x10⁴ células por pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning, Nueva York, EE. UU.) en presencia de partículas C16 (sin tratar), partículas híbridas C16 (con polipéptido SIIN (SIIN), SEQ ID NO: 13), partículas híbridas C16 con un sitio de escisión de cathepsina B (C16-CathBseq-SIIN, SEQ ID NO: 15) y partículas híbridas C16 con un sitio de escisión de cathepsina S (C16-CathSseq-SIIN, SEQ ID NO: 14) a 505 µg de partículas/mL (= 10 µg de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11)/mL) (Esto es 10 veces más que la concentración utilizada en otros experimentos *in vitro*) diluidos en 100 µL de medio completo por pocillo. El agonista TLR7 R848 (Invitrogen, EE. UU.), se utilizó como inmunoestimulante. Después de 24 horas de incubación, se recolectaron las células para el análisis de citometría de flujo, mientras que el sobrenadante se almacenó para la cuantificación de citoquinas. La viabilidad de BMDC se evaluó mediante citometría de flujo y ensayo MTT.

Marcado fluorescente

El marcado de los polipéptidos C16-, C16-SIIN, C16-CathBseq-SIIN- y C16-CathSseq-SIIN con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se realizó de acuerdo con el método publicado por Spieß et al. (Spieß et al. 2010) utilizando el grupo amino terminal de C16. Los polipéptidos SIIN marcados con FITC se obtuvieron de GenScript

Inc., Piscataway Township, NJ, EE. UU. Para la preparación de partículas utilizadas para estudios *in vivo*, la proteína en polvo seca C16 suspendida en HPW se esterilizó en autoclave como se describió anteriormente. Después de la esterilización con vapor, el polvo C16 autoclavado se disolvió en una solución de tiocianato de guanidina 6 M, pero esta vez se dializó contra una solución HEPES 20 mM libre de endotoxinas, pH 8.0 a 2-8 °C durante 24 h. Después de la diálisis, centrifugación y filtración, la solución se ajustó a una concentración de 2.0 mg/ml con una solución HEPES 20 mM libre de endotoxinas, pH 8.0 para el acoplamiento en solución. Se añadió lentamente un exceso molar de 20 veces de FITC (disuelto en DMSO) a la solución C16. Después de añadir toda la cantidad de FITC disuelto, la solución se incubó en la oscuridad durante tres horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, la solución de proteína C16 acoplada a FITC se filtró primero con un filtro PES de 0.2 µm (VWR International, Radnor, EE. UU.) y, posteriormente, se filtró con un filtro Mustang® E previamente lavado®. La solución filtrada de proteína C16 acoplada a FITC se ajustó a una concentración de proteína de 1 mg/ml para la preparación de partículas mediante el sistema de bomba de jeringa a 80 °C. Todos los demás parámetros fueron idénticos a los del proceso de preparación de partículas descrito anteriormente. El marcado fluorescente de partículas utilizadas únicamente para estudios *in vitro* se realizó en las partículas finales. Las partículas C16 se suspendieron a una concentración de 2.5 mg/ml en un tampón HEPES 20 mM libre de endotoxinas, pH 8.0. Se añadió gota a gota un exceso molar de 20 veces de FITC (disuelto en DMSO) a la suspensión de partículas. Después de una incubación de 72 h en la oscuridad, las partículas se centrifugaron y se lavaron con HPW tres veces. La ultrasonificación adicional durante 2 minutos finalizó el proceso de marcado FITC de las partículas finales del polipéptido C16.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de las submicropartículas se midieron por triplicado mediante dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El tamaño de partícula se muestra como el valor promedio Z, y la distribución del tamaño de partícula se muestra mediante el índice de polidispersidad (PDI). Inmediatamente antes de cada medición, las muestras se diluyeron hasta una concentración final de 0.01 mg/ml con HPW. Todas las mediciones se realizaron a 25°C.

Citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó mediante citometría de flujo utilizando tinción con yoduro de propidio (PI) y anexina V y mediante ensayo. Para el análisis de citometría de flujo, los BMDC se incubaron con APC-anexina V diluida 1:100 en tampón de anexina V (ambos de Biolegend, EE. UU.) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El analizador cuantitativo MACS (Miltenyi Biotec, Alemania) añadió automáticamente 0.2 µL de PI (Sigma-Aldrich, EE. UU.) diluido 1:2 en PBS justo antes del análisis. Todos los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando FlowJo versión 10.0.8r1. Se utilizó estaurosporina (1 nM) (Sigma-Aldrich, EE. UU.) como control positivo (no se muestra). Para el ensayo MTT, se utilizó el kit de ensayo de proliferación celular Vybrant MTT (Molecular Probes, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para este ensayo, se utilizó medio BMDC completo sin rojo fenol (Biowest, Francia).

Fenotipificación de células BMDC

Después de lavar con tampón FACS que consiste en PBS (Eurobio, Francia) suplementado con 2 mM de EDTA (Calbiochem, Alemania) y 0.5 % de BSA (laboratorios PAA, Austria), las células BMDC se incubaron con CD16/32 anti-ratón para bloquear los receptores Fc (Biolegend, EE. UU.). Después de 10 minutos de incubación a 4°C, se agregaron los anticuerpos para los marcadores de activación o sus respectivos controles de isotipo: PB-CD80, PE-CD86, APC-MHCI y FITC-CD11b (todos de Biolegend, EE. UU.). Las células muertas se excluyeron utilizando colorante violeta zombi (Biolegend, EE. UU.). Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, las células se lavaron y se resuspendieron en tampón FACS antes de la adquisición.

La Figura 1A muestra un diagrama de puntos de la citometría de flujo con yoduro de propidio (PI) y anexina V. No se pudo detectar ninguna diferencia en la viabilidad celular entre las células sin partículas C16 (sin tratar), polipéptido SIIN (SIIN), partículas C16 (C16), partículas híbridas C16 con sitio de escisión de cathepsina B (C16-CathBseq-SIIN) y partículas híbridas C16 con sitio de escisión de cathepsina S (C16-CathSseq-SIIN).

La Figura 1B Muestra el diagrama esquemático de células vivas, sanas, células muertas y células apoptóticas.

La Figura 1C muestra el porcentaje de células vivas con SIIN, C16-CathBseq-SIIN y C16-CathSseq-SIIN en comparación con las células no tratadas y las células con partículas C16. No se pudo detectar diferencia en la viabilidad celular entre las células sin partículas C16 (sin tratar), polipéptido SIIN (SIIN), partículas C16 (C16), partículas híbridas C16 con sitio de escisión de cathepsina B (C16-CathBseq-SIIN) y partículas híbridas C16 con sitio de escisión de cathepsina S (C16-CathSseq-SIIN).

La Figura 1D muestra la densidad óptica (DO) a 570 nm en correlación con la producción de formazán del ensayo MTT. No hay diferencia en la densidad óptica entre las partículas de seda de araña y las partículas híbridas de seda de araña en comparación con el control (sin tratar). Esto demuestra que las partículas de seda de araña, así como las partículas híbridas de seda de araña, no indujeron citotoxicidad por BDMC.

Ejemplo 7: Las partículas de seda de araña no inducen la activación inmunológica del BMDC *in vitro*
Preparación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC)

Las BMDC se generaron a partir de células de médula ósea primaria obtenidas mediante el lavado de tibias y fémures de ratones C57BL/6Rj con PBS frío. La lisis de eritrocitos se realizó con BD Pharm Lyse (BD Biosciences, EE. UU.) durante 1 min. A continuación, las células se resuspendieron en medio BMDC completo que consiste en RPMI 1640 (Biowest, Francia) suplementado con 10 % de FCS (Biological Industries, Israel), 1 % de L-glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 U/mL de estreptomycin, 50 µM de 2-mercaptoetanol y 0.5 mM de piruvato sódico (todos de PAA Laboratories, Austria), suplementado con 40 ng/ml de GM-CSF (PeproTech, EE. UU.). Las células débilmente adherentes se recolectaron después de 6 días de diferenciación. El porcentaje de células CD11c⁺ CD11b⁺ fue habitualmente superior al 70%.

El BMDC (5x10⁴ células/pocillo) se cultivaron con partículas de seda de araña a 50 µg de partículas (partículas de seda de araña)/mL.

Fenotipado de BMDC

Después de lavar con tampón FACS compuesto por PBS (Eurobio, Francia) suplementado con 2 mM de EDTA (Calbiochem, Alemania) y 0.5 % de BSA (laboratorios PAA, Austria), las células se incubaron con CD16/32 anti-ratón para bloquear los receptores Fc (Biolegend, EE. UU.). Después de 10 minutos de incubación a 4°C, se agregaron los anticuerpos para los marcadores de activación inmune o sus respectivos controles de isotipo: PB-CD80, PE-CD86, APC-MHCI y FITC-CD11b (todos de Biolegend, EE. UU.). Las células muertas se excluyeron utilizando colorante violeta zombi (Biolegend, EE. UU.). Después de 30 minutos de incubación a 4 °C, las células se lavaron y se resuspendieron en tampón FACS antes de la adquisición.

Después de 24 horas de incubación, los BMDC se analizaron mediante citometría de flujo, mientras que el sobrenadante se recogió para la cuantificación de citoquinas.

Análisis de la producción de citoquinas mediante ELISA

Se utilizaron los equipos ELISA Max deluxe para IL-6 de ratón (Biolegend, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para la concentración de proteínas, se midió la absorbancia a 570 nm y se restó de la absorbancia a 450 nm mediante un lector de placas Infinite 200 PRO (TECAN, Suiza). Las concentraciones se calcularon de acuerdo con la curva estándar realizada por duplicado.

La Figura 2A muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los marcadores de activación de superficie de BMDC MHC I y MHC II de células BMDC cultivadas con SIIN, C16-SIIN, CathBseq-SIIN y C16-CathSseq-SIIN en comparación con la muestra no tratada. El adyuvante R848 (R8), un agonista de TLR7, se utilizó como control positivo. No se pudo detectar un aumento significativo de los marcadores de activación inmunitaria MHC I y MHC II. Esto demuestra que las partículas de seda de araña, así como las partículas híbridas de seda de araña, no son inmunogénicas.

La Figura 2B muestra la cuantificación de citoquinas con ELISA. El adyuvante R848 (R8), un agonista de TLR7, se utilizó como control positivo. Esto demuestra que las partículas de seda de araña, así como las partículas híbridas de seda de araña, no tienen una actividad inmunoestimulante intrínseca.

Ejemplo 8: Las partículas de seda de araña son absorbidas eficientemente por las células presentadoras de antígenos.

BMDC (5x10⁴ células/pocillo) se cultivaron con partículas de seda de araña marcadas con FITC (C16-SIIN, C16-CathBseq-SIIN y C16-CathSseq-SIIN) a 50 µg de partícula/mL de acuerdo con el ejemplo 6. Después de 24 horas de incubación, se aislaron BMDC para análisis de citometría de flujo.

La captación de partículas de seda de araña por BMDC se evaluó mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Para la citometría de flujo, se excluyeron las células muertas utilizando el colorante violeta zombi (Biolegend, EE. UU.). Después del bloqueo del receptor Fc, se añadieron los siguientes anticuerpos: APC-CD11b, APC-Cy7-CD11c (ambos de Biolegend, EE. UU.). Luego se determinó el porcentaje de células FITC⁺ positivas en la población CD11b⁺CD11c⁺. Para la microscopía confocal, los BMDC se incubaron con Blue DND-22 LysoTracker (Molecular Probes, EE. UU.) durante 1 hora y partículas FITC-positivas durante 4 horas adicionales antes de obtener imágenes con microscopía confocal (Zeiss, Alemania). Se determinó el porcentaje de células FITC-positivas dentro de la población BMDC (CD11c⁺). El polipéptido SIIN sirvió como control negativo.

La Figura 3A muestra la absorción de partículas C16 sin SIIN (C16), partículas híbridas C16 C16-SIIN, partículas híbridas C16 con sitio de escisión de cathepsina B (C16-CathBseq-SIIN) y partículas híbridas C16 con sitio de escisión de cathepsina S (C16-CathSseq-SIIN). Las células no tratadas (no tratadas) y el polipéptido SIIN (SIIN) sirvieron como controles. Se pudo conseguir una absorción de partículas superior al 90 % para las partículas híbridas. No se pudo detectar ninguna diferencia significativa en la captación entre los polipéptidos

híbridos C16-CathBseq-SIIN y C16-CathSseq-SIIN y las partículas sin antígeno (C16). Esto demuestra que las partículas híbridas se absorben tan bien como las partículas sin antígeno (C16).

Los esplenocitos se aislaron de ratones C57BL/6JRj, se pasaron a través de un colador de células de 20 µm y se realizó la lisis de eritrocitos. Las células muertas se excluyeron utilizando colorante violeta zombi (Biolegend, EE. UU.). Los esplenocitos recién aislados (5x10⁴ células/pocillo) se cultivaron durante 6 horas con partículas de seda de araña marcadas con FITC. Después del bloqueo del receptor Fc, se añadieron los siguientes anticuerpos: PerCP-CD3, APC-CD11b, APC-Cy7-CD11c (todos de Biolegend, EE. UU.). Después de 6 horas de incubación, las células se analizaron mediante citometría de flujo.

La Figura 3B muestra el porcentaje de células FITC-positivas determinadas en poblaciones de células inmunes definidas: Células T (CD3+), células dendríticas (CD11c+CD11b+) y monocitos/macrófagos (CD11c-CD11b+) en comparación con células no tratadas. Las partículas híbridas C16-CathSseq-SIIN fueron absorbidas eficientemente por las células dendríticas, seguidas por los monocitos/macrófagos y las células T.

Ejemplo 9: La secuencia de catepsina S es más eficaz para inducir la proliferación de células T in vitro dependiente de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11)

Proliferación de células T in vitro

BMDC (5x10⁴ células/pocillo) se cultivaron con partículas de seda de araña a 50 µg de partícula/mL. Se utilizó R848 (0.25 µg/mL) como adyuvante para inducir la activación de BMDC. Después de 24 horas de incubación, se agregaron células CD3+CD8+ OT-I marcadas con CFSE (10⁵ células/pocillo). Después de 3 días de cocultivo, se analizó la detección de células CD3+CD8+ positivas para CFSE mediante citometría de flujo.

Después de 24 horas de incubación, se seleccionaron negativamente las células T CD8+ de los esplenocitos OT-I utilizando el kit de aislamiento de células T CD8 (Miltenyi Biotech, Alemania). Luego, estas células se tiñeron con CFSE (Molecular Probes, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se agregaron al cultivo de BMDC (10⁵ células/pocillo). 3 días después, las células se tiñeron para análisis de citometría de flujo. Después del bloqueo de Fc, se agregaron los siguientes anticuerpos: PB-CD3, APC-Cy7-CD8 (todos de Biolegend, EE. UU.). La proliferación estuvo determinada por el porcentaje de células CFSE^{DIM} dentro de la población de células CD3+CD8+.

La Figura 4A muestra el porcentaje de células T CD8+ proliferantes dentro de la población de células T (CD3+CD8+). El porcentaje de proliferación de células T CD8 expuestas a células BMDC con partículas C16 CathSseq-SIINFEKL y partículas C16 CathBseq-SIINFEKL fue significativamente mayor en comparación con el control no tratado. El porcentaje de proliferación de células T CD8 expuestas a células BMDC con CathSseq-SIINFEKL fue significativamente mayor que el porcentaje de células T CD8 expuestas a células BMDC con C16 CathBseq-SIINFEKL.

Las partículas de proteína híbrida son capaces de inducir la proliferación de células T mediante la liberación de péptido de SIINFEKL (SEQ ID NO: 11). Las partículas C16-CatS_SIIN son más efectivas que las partículas C16-CatB-SIIN.

Ejemplo 10: Las partículas de seda de araña híbrida se acumulan en el ganglio linfático de drenaje *in vivo*

Para estudios de biodistribución *in vivo*, se inyectaron partículas en el flanco de los ratones y 24 horas después, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los órganos para su análisis.

Se alojaron ratones hembra C57BL/6JRj (Janvier, Francia) y ratones transgénicos OT-I OVA-TCR (Charles River, Alemania) en condiciones específicas libres de patógenos y se utilizaron en 6-12 semanas de edad. La experimentación con animales se llevó a cabo de acuerdo con la ley federal suiza sobre experimentación con animales.

Se inyectaron por vía subcutánea a ratones C57BL/6JRj 505 µg de partículas C16-CathSseq-SIINFEKL marcadas con FITC en 100 µL de PBS por ratón en el flanco derecho de 3 ratones. Se utilizó PBS como control negativo. Después de 24 horas, se aislaron los ganglios linfáticos de drenaje inguinal ipsilateral (DLN), los inguinales contralaterales (no DLN) y el bazo para el análisis de citometría de flujo y se realizaron suspensiones de células individuales como se describió anteriormente. Las células muertas se excluyeron utilizando colorante violeta zombi (Biolegend, EE. UU.). Después del bloqueo del receptor Fc, se añadieron los siguientes anticuerpos: PerCP-CD3, Pe-Cy7-CD11b, APC-CD11c (todos de Biolegend, EE. UU.).

La Figura 5A muestra el número de células FITC positivas (que comprenden partículas C16-CathSseq-SIINFEKL marcadas con FITC) en los ganglios linfáticos de drenaje (DLN) de 3 ratones tratados con partículas FITC en comparación con un grupo de control de 3 ratones tratados con PBS en varios tejidos (DLN, no DLN y bazo).

El análisis mostró que las partículas enlazadoras de catepsina S (C16-CathSseq-SIINFEKL) se acumularon en los ganglios linfáticos locales y preferiblemente en las células dendríticas y no en las células no DLN o el bazo. Durante la cirugía para la extracción de órganos, todavía había partículas en el lugar de la inyección. Las partículas híbridas C16 forman un depósito debajo de la piel y se acumulan preferiblemente en los ganglios linfáticos locales.

La Figura 5B muestra la captación de partículas enlazadoras de catepsina S (C16-CathSseq-SIINFEKL) solo en células dendríticas (CD11c+CD11b+) en contraste con monocitos/macrófagos (CD11c-CD11b+). Las células dendríticas son la clase más potente de células presentadoras de antígenos. Si la presentación del antígeno ocurre en los ganglios linfáticos locales, las partículas no se difunden de forma incontrolable por el cuerpo.

Ejemplo 11: Las partículas de seda de araña que contienen SIINFEKL inducen la proliferación de células T dependientes de antígenos *in vivo*

Proliferación de células T *in vivo*

Después del aislamiento de células T CD8+ de los esplenocitos OT-I, las células se tiñeron con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante en ausencia de FCS. Se inyectaron por vía intravenosa en ratones 10⁶ células OT-I CD3+CD8+ marcadas con CFSE en 100 µL de PBS. 18 horas después, los ratones con partículas en el flanco derecho (en 100 µL de PBS) fueron inmunizados subcutáneamente con 505 µg de partículas C16 y C16-CathSseq-SIINFEKL (505 µg de partículas en 100 µL de PBS por ratón). Se utilizó R848 (25 µg en 100 µL) como adyuvante. El adyuvante PBS y R848 sin partículas híbridas sirvió como control negativo. Tres días después de la vacunación, se aislaron los DLN inguinales para análisis de citometría de flujo para determinar la proliferación de células OT-I CD3+CD8+ marcadas con CFSE. Las suspensiones de células individuales se obtuvieron pasándolas a través de un colador de células de 20 µm. Después del bloqueo del receptor Fc, se añadieron los siguientes anticuerpos: PB-CD3, APC-Cy7-CD8 (todos de Biolegend, EE. UU.). La proliferación estuvo determinada por el porcentaje de células CFSE^{DIM} dentro de la población de células CD3+CD8+.

Análisis estadístico

Todos los gráficos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 6.0g (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.), donde las barras de error indican el error estándar de las medias (SEM). La significancia estadística de múltiples grupos con respecto al grupo de control (muestra no tratada) se realizó utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

La Figura 6 muestra la proliferación de células T CD8 de ratones inmunizados con partículas C16-CathSseq-SIINFEKL. La proliferación de células T CD8 fue notablemente mayor sin el adyuvante R848. Se pudo demostrar que la inmunización con C16-CathSseq-SIINFEKL sin adyuvante resultó en una proliferación similar y respectivamente mayor de células T CD8 que la inmunización con C16-CathSseq-SIINFEKL con adyuvante. Esto no se podía esperar, porque la respuesta inmune suele ser mayor después de la coadministración de un adyuvante inmunoestimulante.

REIVINDICACIONES

1. Un artículo para uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde el artículo comprende un polipéptido que comprende
 - (i) un polipéptido de seda, y
 - (ii) un antígeno.
- 5
2. El artículo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende además un enlazador escindible enzimáticamente.
3. El artículo para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el antígeno está conectado al polipéptido de seda a través del enlazador escindible enzimáticamente.
- 10
4. El artículo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3, en el que el enlazador escindible enzimáticamente es un enlazador escindible por proteasa.
5. El artículo para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el enlazador escindible por proteasa es un enlazador escindible por cathepsina, preferiblemente un enlazador escindible por cathepsina S o un enlazador escindible por cathepsina B.
- 15
6. El artículo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el artículo es una partícula.
7. Una composición farmacéutica para uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende el artículo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 20
8. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición comprende además un adyuvante.
9. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en la que la composición no comprende además un adyuvante.
- 25
10. Una composición farmacéutica sin adyuvante para uso en la inducción de una respuesta inmune contra una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmune o cáncer, en donde la composición comprende un artículo que comprende un polipéptido que comprende
 - (i) un polipéptido de seda, y
 - (ii) un antígeno.

Fig. 1

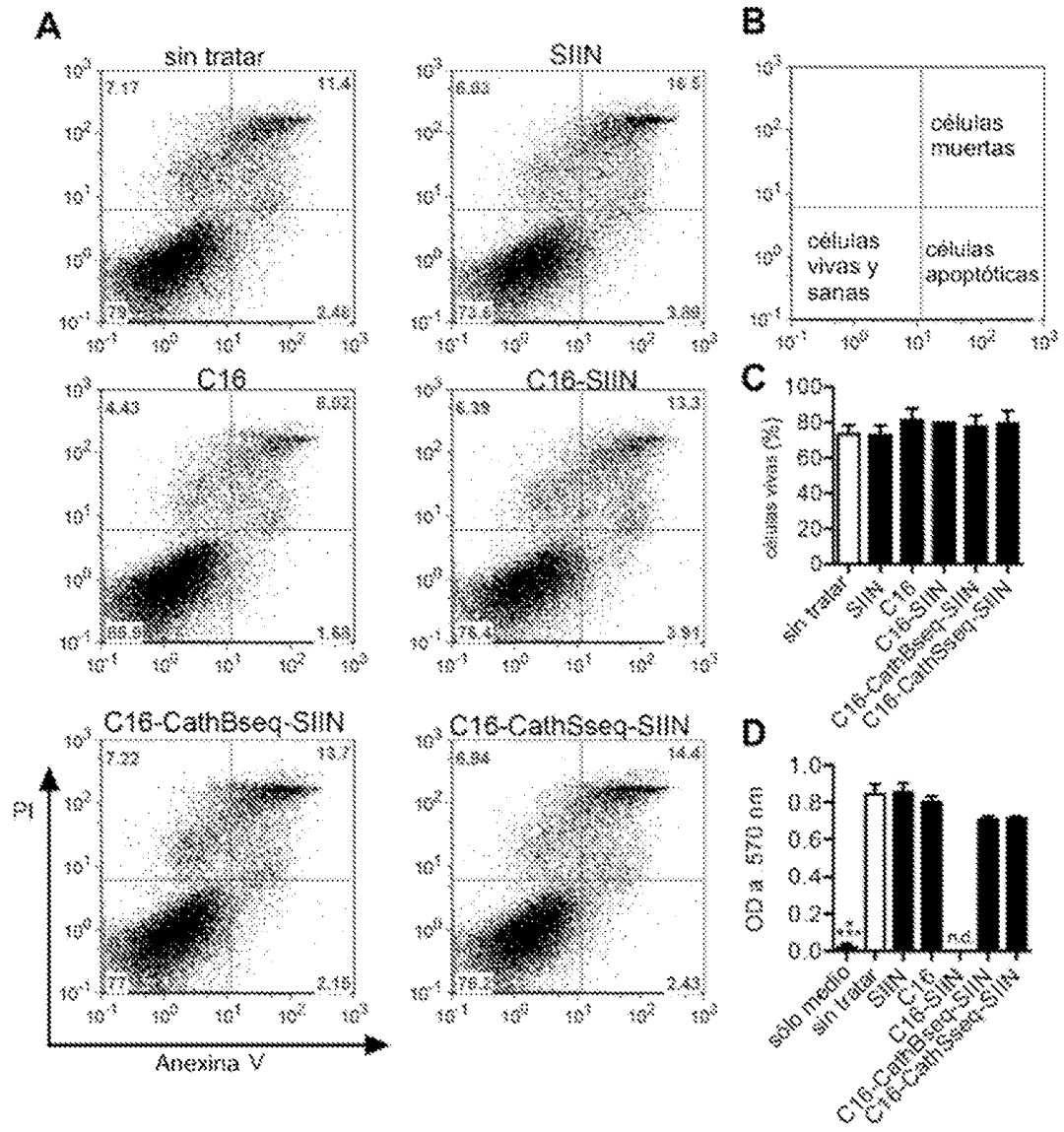


Fig. 2

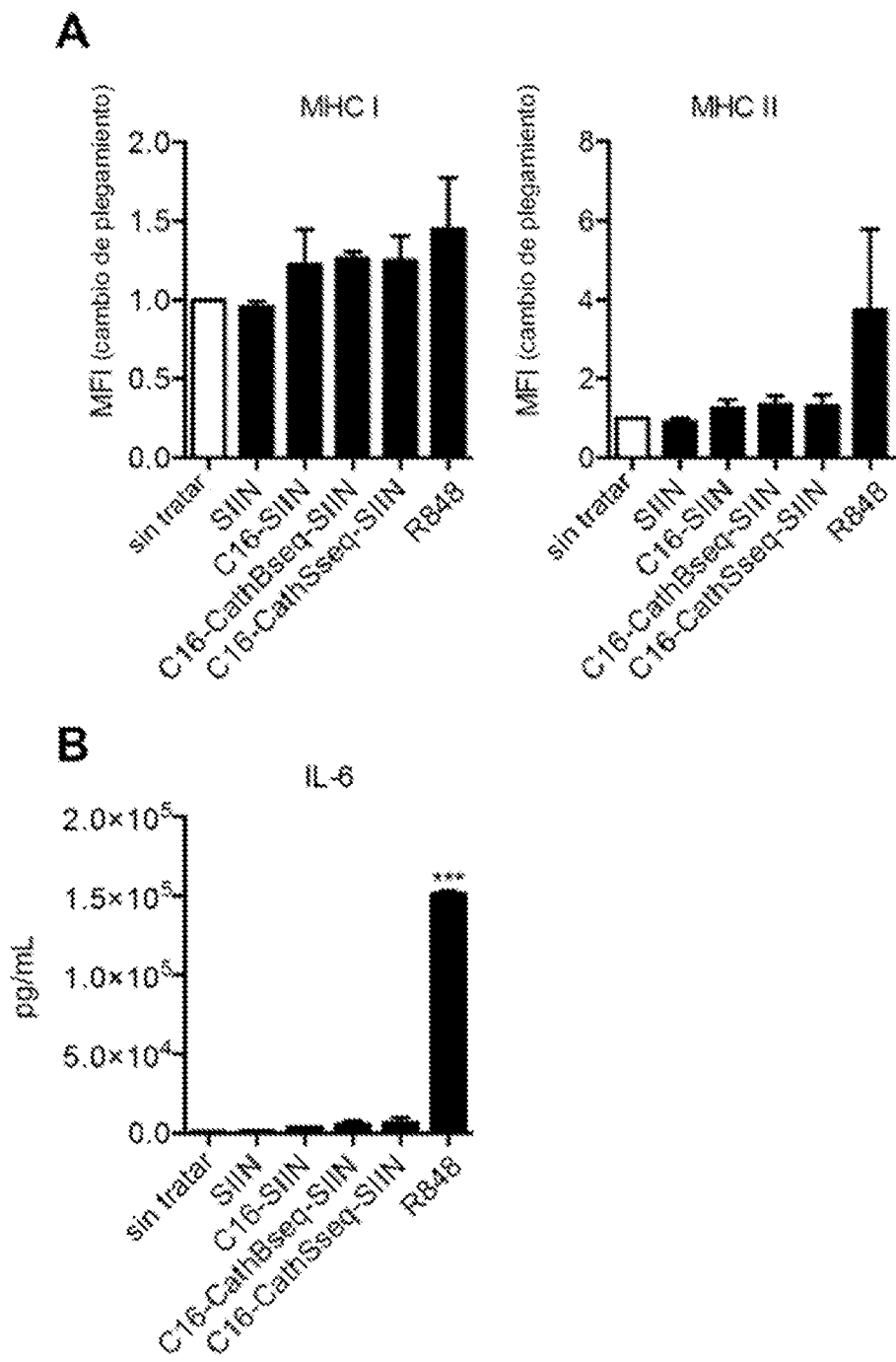


Fig. 3

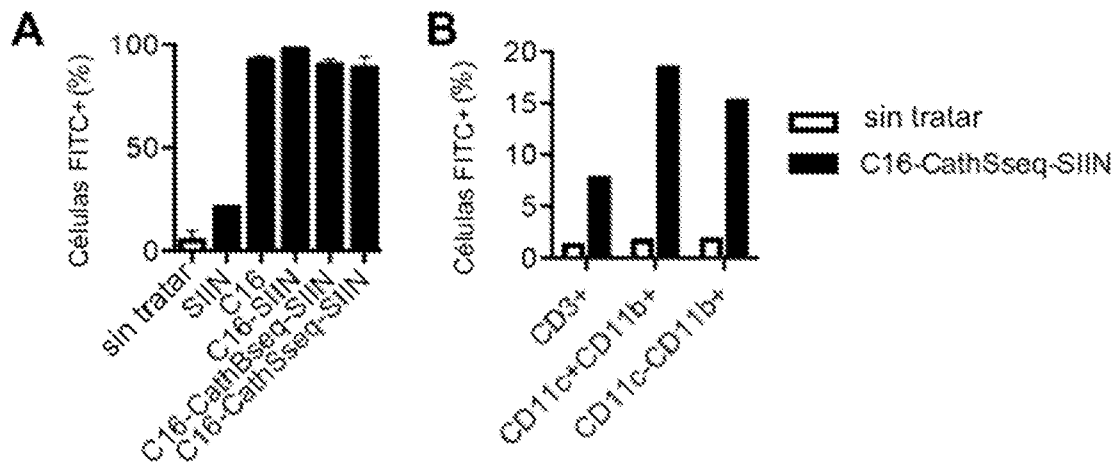


Fig. 4

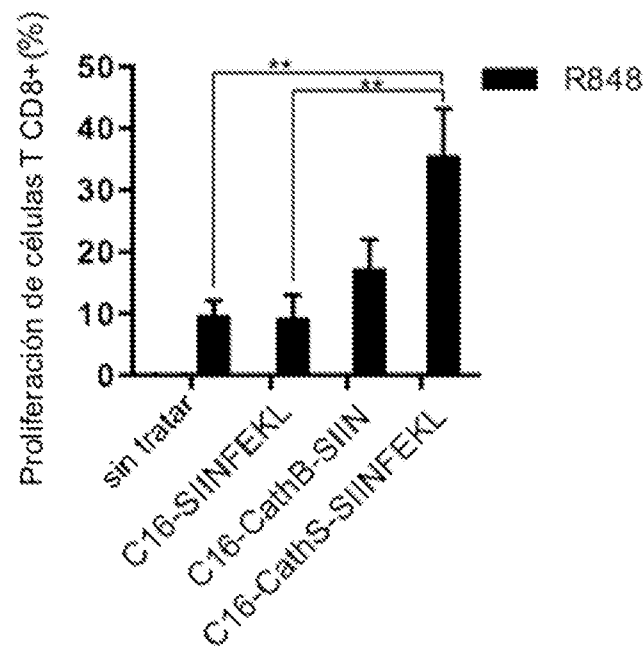


Fig. 5

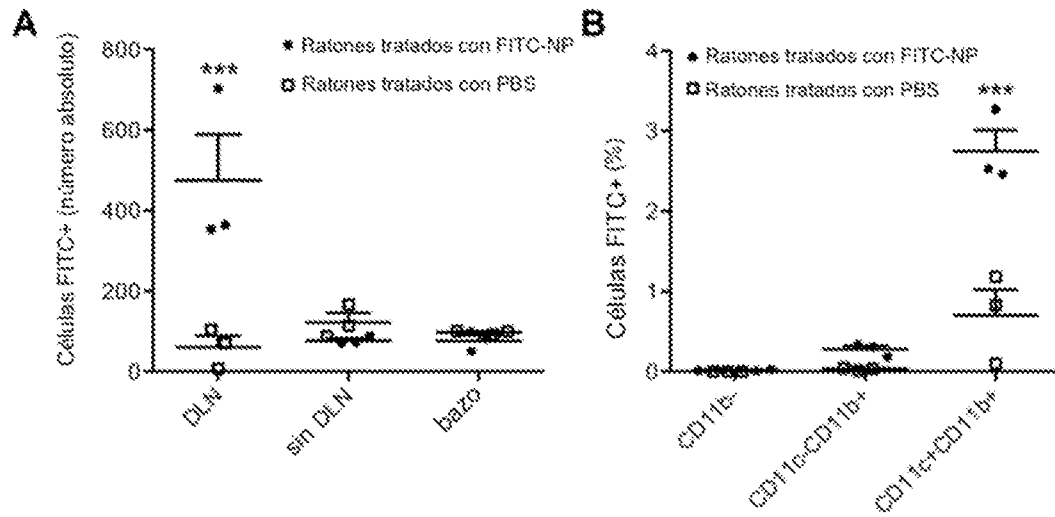


Fig. 6

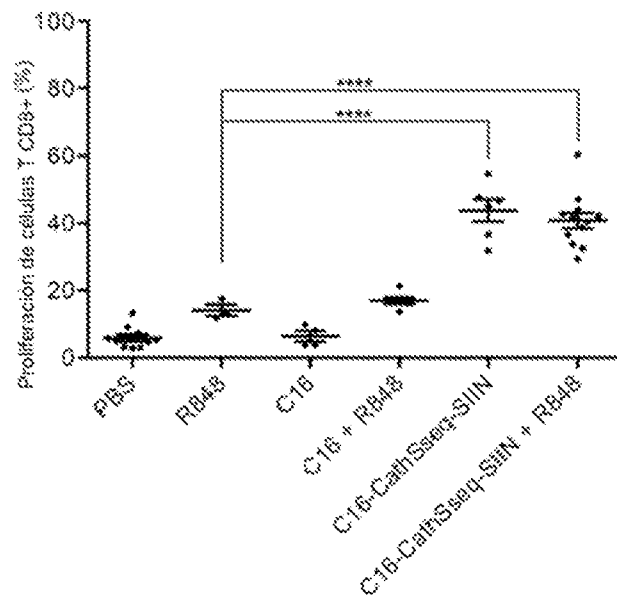
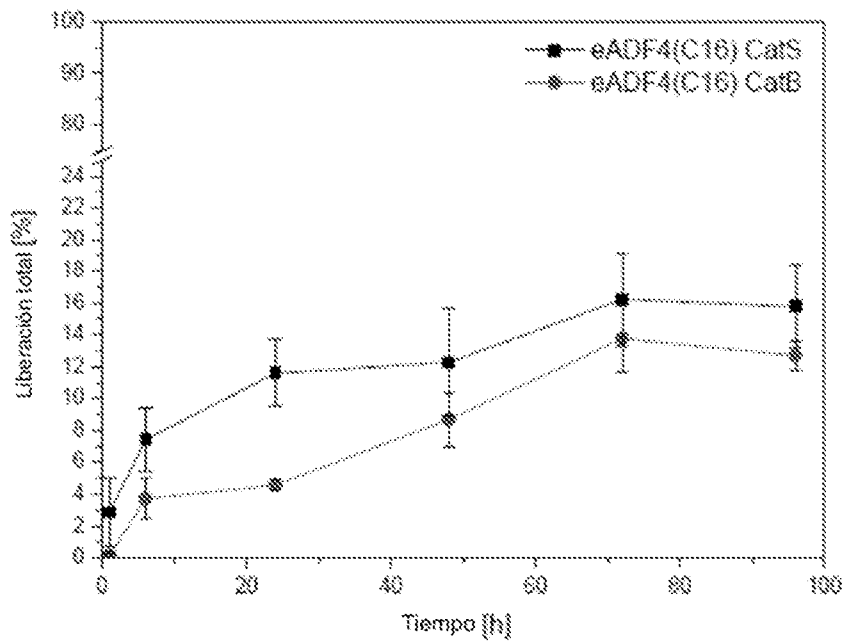


Fig. 7

A



B

