

03 036343

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 03036343 00000000 Folios: 90
Fecha (AND): 2003-05-02 14:13:37
Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: CENTRO DE INGENIERIA
GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

Dirección: Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán,
Playa, C. Habana 12100, CUBA

Nacionalidad o Domicilio: CUBA

Lugar de Constitución: CUBA

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CARRERA 9 No. 93-09

Teléfono: 610 74 80 Fax 610 07 06
E-mail: acastell@impsat.net.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número 39'779.65 TPA 70.819

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: (VER ANEXO No. 1)

Dirección:

Nacionalidad o Domicilio: Cubanos

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/CU01/00007

Fecha 1/11/01

Publicación Internacional No. WO 02/36160

Fecha 10/5/02

⑥

Título (54)

METODO DE OBTENCION DE ESTRUCTURAS ANTIGENICAS QUE POTENCIAN LA
REACTIVIDAD CRUZADA ESPECIFICA

⑦

Clasificación Internacional (51)

A 61 K 39/12 ; 39/21 ; 39/29 ; 39/385

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

CU

03-11-00

242/2000

⑨

Comprobante de pago No.

03-29.965

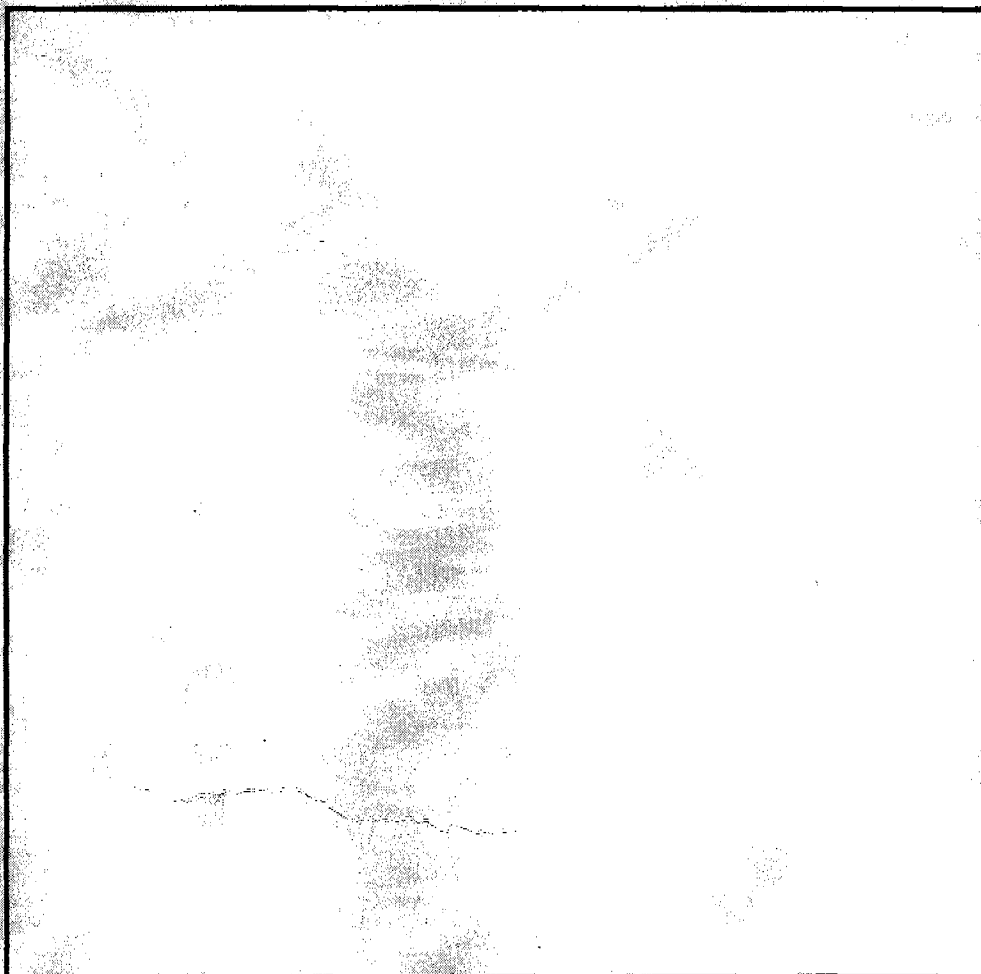
Fecha Abril 30, 2003

10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

Margarita Castellanos
C.C: No. 39.779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

2 MAYO 2003

83
ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
A B O G A D O S
Carrera 9 No. 93-09
Apartado 6349
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO No. 1

INVENTORES

NOMBRE

DOMICILIO

- | | |
|-------------------------------------|---|
| 1.- LUIS JAVIER CRUZ RICONDO ✓ | Calle A No. 120 entre 2da y 3ra, San Miguel del Padrón, Ciudad Habana 11000, CUBA |
| 2.- JULIO CESAR AGUILAR RUBIDO ✓ | Ave. 61 No. 7008 entre 70 y 72, Guanajay, Provincia Habana 32200, CUBA |
| 3.- ENRIQUE IGLESIAS PEREZ ✓ | Edificio 25 Apto 103, Reparto Camilo Cienfuegos, Habana del Este, Ciudad Habana 11700, CUBA |
| 4.- OSVALDO REYES ACOSTA ✓ | Ave. 31 entre 182 y 184, Cubanacán, Playa, Ciudad Habana 10600, CUBA |
| 5.- HILDA ELISA GARAY PEREZ ✓ | Ave. 31 entre 182 y 184, Cubanacán, Playa, Ciudad Habana 10600, CUBA |
| 6.- VERENA MUZIO GONZALEZ ✓ | Calle 39, No. 871 entre 24 y 26, Nuevo Vedado, Ciudad Habana 10400, CUBA |
| 7.- GERARDO ENRIQUE GUILLEN NIETO ✓ | Línea No. 6 entre N y O, Piso 4, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad Habana 10400, CUBA |
| 8.- CARLOS DUARTE CANO ✓ | Ave. 31 entre 182 y 184, Cubanacán, Playa, Ciudad Habana 10600, CUBA |
| 9.- EDUARDO PENTON ARIAS ✓ | Ave. 31 No. 18207 entre 182 y 184, Apto 49, Cubanacán, Playa, Ciudad Habana 10600, CUBA |

4

**(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

**(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional**



**(43) Fecha de publicación internacional
10 de Mayo de 2002 (10.05.2002)**

PCT

**(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/36160 A2**

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 39/12

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU01/00007 ✓

**(22) Fecha de presentación internacional:
1 de Noviembre de 2001 (01.11.2001)**

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

**(30) Datos relativos a la prioridad:
242/2000 3 de Noviembre de 2000 (03.11.2000) CU**

**(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y
BIOTECNOLOGIA [CU/CU]; Ave. 31 entre 158 y 190,
Cubanacán., 10600 Ciudad de la Habana. (CU).**

(72) Inventores; e

**(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): CRUZ RI-
CONDO, Luis, Javier [CU/CU]; Calle A No. 120 entre
2da y 3ra, San Miguel del Padron, 11000 Ciudad Habana
(CU). AGUILAR RUBIDO, Julio, César [CU/CU]; Ave.
61 No. 7008 entre 70 y 72, Guanajay., 32200 La Habana
(CU). IGLESIAS PEREZ, Enrique [CU/CU]; Edificio 25
Apto. 103, Reparto Camilo Cienfuegos, Habana del Este.,
11700 Ciudad de la Habana (CU). REYES ACOSTA, Os-
valdo [CU/CU]; Ave. 31 entre 182 y 184, Playa., 10600**

Ciudad de la Habana (CU). GARAY PÉREZ, Hilda, Elisa
[CU/CU]; Ave. 31 entre 182 y 184, Playa., 10600 Ciu-
dad de la Habana (CU). MUZIO GONZÁLEZ, Verena,
Lucila [CU/CU]; Calle 39, No. 871 entre 24 y 26, Nuevo
Vedado., 10400 Ciudad de la Habana (CU). GUILLÉN NI-
ETO, Gerardo, Enrique [CU/CU]; Línea No. 6 entre N y
O, Piso 4, Vedado, Plaza de la Revolución., 10400 Ciudad
de la Habana (CU). DUARTE CANO, Carlos [CU/CU];
Ave. 31 entre 182 y 184, Playa., 10600 Ciudad de la Ha-
bana (CU). PENTÓN ARIAS, Eduardo [CU/CU]; Ave.
31 No 18207 entre 182 y 184, Apto 49 Playa, 10600 Ciu-
dad de la Habana (CU).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING ANTIGENIC STRUCTURES ENHANCING SPECIFIC CROSS REACTIVITY

**(54) Título: MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS ANTIGÉNICAS QUE POTENCIAN LA REACTIVIDAD CRU-
ZADA ESPECÍFICA**

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining high cross reactivity antigenic structures that are capable of enhanc-
ing an immune response to peptidic antigens administered systemically and/or mucosally and to the chemical structures obtained
with said method and the formulations obtained from said structures and their utilization. The method describes the obtention of
new dendrimeric structures from the selection and synthesis of dendrimers that are subsequently coupled to carrier molecules. The
resulting structures can be used conveniently adjuvated or in a formulation in which several antigens of this type can be introduced,
a synergistic effect taking place between these components in relation to the cross reactivity and the immunogenicity of the response
obtained. The preparation may also contain stabilizers and preserving agents. The resulting antigenic structures can be used in the
pharmaceutical industry as vaccine formulations for human and veterinary use and as part of diagnostic systems.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con un método para la obtención de estructuras antigénicas de alta reactividad
cruzada, capaces de potenciar la respuesta inmune a antígenos peptídicos administrados por vía sistémica y/o mucosal, así como
con las estructuras químicas obtenidas a partir este método, y con las formulaciones obtenidas a partir de dichas estructuras y su
uso. El método describe la obtención de nuevas estructuras dendríméricas, partiendo de la selección y síntesis de dendrímeros, que
posteriormente son acoplados a moléculas portadoras. Las estructuras resultantes pueden utilizarse convenientemente adyuvadas o
en una formulación donde pueden introducirse varios antígenos de este tipo, encontrándose un efecto sinérgico entre estos compo-
nentes con respecto a la reactividad cruzada y la inmunogenicidad de la respuesta obtenida. Además la preparación puede contener,
estabilizadores y preservos. Las estructuras antigénicas resultantes son aplicables en la industria farmacéutica como formulaciones
vacunales tanto para uso humano como veterinario y como parte de sistemas de diagnóstico.

WO 02/36160 A2

5 4

domiciliado(s) en Ave. 31.e/. 158. y...
190... Cubanacan... Playa.. Ciudad...
de la Habana. Cuba.

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso-administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones: a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas; depósito de nombres y enseñanzas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de su traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencia de uso de esos derechos; b) acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos que promovamos o se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y gestiones arriba determinados sustituir este mandato, transigir, desistír, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

en Ciudad de La Habana, Cuba.....

I (we) the undersigned

of

attorneys residing at
Cra. 9#93-09. Bogotá, COLOMBIA to.....

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons, specially those, administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of trademarks, service, collective and defensive marks; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licences of use of the above rights; b) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licences; and in general the civil, penal and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by us or against us; and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys-in-fact in or out of Court.

Given and signed this

in

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

By: *[Signature]*
side)

(Consular legalization necessary)



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, ... de de 19....
compareció(eron) personalmente
Dr. Manuel Limonta Vidal

a quien(es) conozco como la(s) persona(s) que
firma(n) este documento en representación de
la Sociedad/Compañía denominada

Centro de Ingeniería Genética
y Biotecnología
Certifico

a) Que Centro de Ingeniería G. y B. es una sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de la República de Cuba.

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es .Ava..31., .Cubancán., .Playa
Ciudad de La Habana, Cuba.

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

d) Que el Sr. Dr. Manuel Limonta... Vidal

está autorizado para otorgar el presente Poder. Lo anterior está probado por medio de los siguientes documentos, que certifico he visto:*

(Ciudad)

(Estado)

Hoy:

de 19

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this day of 19....
personally appeared

whom I know to be the person(s) who signed
this documents as representative(s) of the
Corporation/Company named

I Certify:

a) That

is a Corporation/Company legally constituted
and in existence in accordance with the laws
of

b) That the domicile of said Corporation/Company is

c) That the purpose or purposes for which the
present Power of Attorney is granted are comprised within the object set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

d) That Mr.

is (are) authorized to grant the present Power
of Attorney. The aforementioned was duly
proven through the following documents and
I duly certify having seen them:*

(City)

(State)

this day of 19

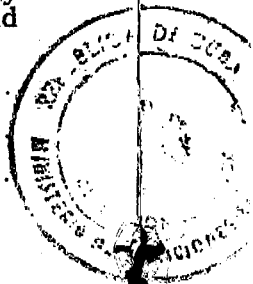
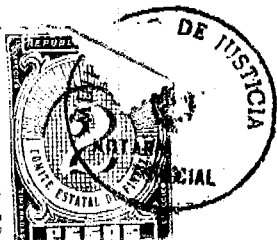
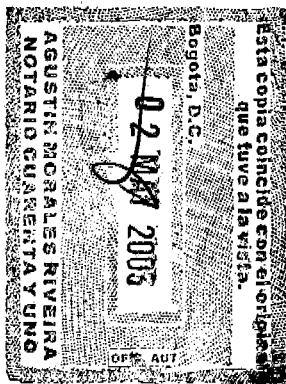
(Notary Public)

* Documents must be identified with date and origin.

LIC. *Agustín Morales Riveira*
Notario de la Notaría Especial a cargo
de la Dirección de Registros y Notarías
del Miniat. de Justicia de la República
de Cuba.

POY VE. Que la(s) firma(s) que
antecedente son auténticas por la
semejanza que guardan con la misma
que acostumbran a usar en todos sus
actos.

La Habana, a los 6 días del mes
de mayo de 1993



[Handwritten signature]



REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION JURIDICA

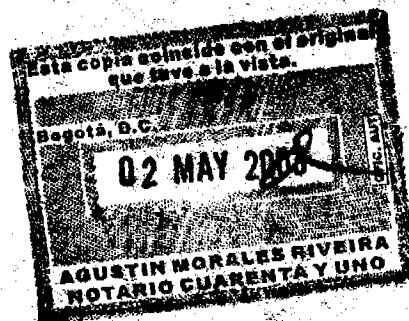
Olga Miranda Bravo, /o Victor Kautzman Torres,
/o María Silvia Fernández Villar, /o Clara Rivero-
Valdés, /o Orlando Acosta Foz. Funcionarios auto-
rizados para certificar autenticidad de firmas
en Documentos.

CERTIFICO QUE AL PRESENTARSE A LA OFICINA DEL
FUNCTOR AUTORIZADO DE ESTE MINISTERIO,
LA FIRMA QUE ANTES DE MI LA SEÑALABA SE
GUARDE CON LA DEBIDA PRECAUCION EN ESTE
CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMBRA A
USAR EN SUS FIRMAS OFICIALES.

EN FE DE LO CUAL SE LE PRESENTE CON LA
FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO.

LA HABANA

075.95





Consulado General de Colombia
La Habana - Cuba



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
CUBA

No. 308/93

La Habana, Mayo 27 de 1993
(Lugar y fecha)

El suscrito Cónsul de Colombia CERTIFICA:
que el señor, Orlando Acosta Faj

quien autoriza el presente documento, ejercía
legalmente, en la fecha allí expedida, las funciones
de Dirección Jurídica del MINREX
y que la firma y sello que en el documento aparecen
como suyos son los que usa y acostumbra en
sus actos oficiales, de acuerdo con el registro
que se lleva en este Consulado.

El Cónsul no asume responsabilidad alguna por
el contenido del documento.

(Firma y sello del Cónsul)

(sello)

Pagado Impuesto de Timbre: us\$ 16.00 (dieciséis)
(en números y letras) dólares

No. **453837**

MINISTERIO RELACIONES EXTERIORES
AREA DE NEGOCIOS GUBERNAMENTALES
HACE CONSTAR

Que el señor (a):
DORIAL PERTUZ

Cuya firma aparece al pie del presente
documento, desempeñaba en esa fecha
las funciones allí indicadas.
Santafé de Bogotá, D. C.,
1111 1993

El suscrito Jefe de Legalizaciones no
asume responsabilidad alguna por el
contenido de este documento.

NELSON SANCHEZ TORRES
JEFE LEGALIZACIONES



8
SUPERINTENDENCIA : COMERCIAL
Radicacion : 03036343 00000000
Fecha (AMD): 2003-05-02 14:13:37 Folios: 90
Tramite : 011 PCT-PATENT 370 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 29,965
: ABRIL 30 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
MONICA VALENCIA	ABONANDO CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	6482874	30/04/2003	2,639,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50003-01-01 SOLICITUDES	
	110 PTC SOLICITUD DE PATENTE DE INVEN	400,000.00
	TOTAL :	\$ 400,000.00

CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ESTRUCTURAS ANTIGÉNICAS QUE POTENCIAN LA REACTIVIDAD CRUZADA ESPECÍFICA.

Sector Técnico

- 5 La presente invención está relacionada con la rama de la medicina, particularmente con formulaciones vacunales basadas en nuevas estructuras antigénicas que potencian la reactividad cruzada.

Técnica Anterior

- Los péptidos tienen por sí solos muy baja inmunogenicidad por lo que generalmente
10 son conjugados a proteínas portadoras que aportan epítomos para células T auxiliaadoras (efecto portador) (Herrington, D.A. et al. 1987 Nature 328:257-259). En el proceso de conjugación los péptidos pueden perder las propiedades antigénicas deseadas debido entre otras cosas a que los métodos de conjugación, al resultar relativamente inespecíficos, pueden enlazar al péptido por parte de la secuencia
15 relevante para el reconocimiento del sistema inmune. Para evitar los problemas asociados a la conjugación de péptidos a proteínas portadoras se generó otra forma de presentar secuencias peptídicas al sistema inmune llamada sistemas peptídicos multiantigénicos (MAPs) los cuales se basan en la inclusión de epítomos para células B y T dentro de un núcleo ramificado de lisinas (Tam, J. P. et al. 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 86:5409-5413-5) (Tam, J. P. 1989 Methods Enzymol. 168:7-15) (Tam, J. P. 1990
20 WO 90/11778) (Tam, J. P. 1993 WO 93/03766). Entre las ventajas de este sistema portador de antígenos sobre los conjugados de péptidos a proteínas se encuentran su estructura y composición definidas así como la alta proporción del epítomo de interés respecto del total de la molécula. En algunos estudios se ha mostrado la superioridad
25 en cuanto a inmunogenicidad del sistema portador MAPs sobre los conjugados (Wang, C. Y. et al. 1991 Science 254: 285-288); aunque esto no ha sido siempre consistente pues en otros estudios ha sucedido lo contrario (Riley, E.M. et al. 1996 Veterinary Immunology and Immunopathology 55: 243-253), lo cual podría ser un fenómeno asociado a la proteína portadora.
- 30 La reactividad cruzada es una propiedad que, al igual que la neutralización cruzada, ha sido descrita previamente para péptidos sintéticos (Wang, C. Y. et al. 1991. Science 254: 285-288). Varios investigadores han reportado además que anticuerpos para péptidos del lazo V3 del HIV-1 presentan neutralización cruzada frente a diferentes

aislamientos de campo de HIV-1 (Wang, C. Y. et al. 1991 Science 254: 285-288). En resumen, la neutralización cruzada y por tanto la reactividad cruzada están asociadas a la estructura de péptidos, como por ejemplo péptidos del lazo V3 de VIH-1.

La estrategia de MAPs ha sido usada para generar una respuesta anti V3 neutralizante en humanos (Geoffrey, J. et al. 1996 Journal of Infectious Diseases, 173: 330-3398). La desventaja de esta estrategia vacunal consistió en que para obtener una inmunogenicidad y efecto neutralizantes mayores fue necesario inocular una cantidad excesivamente alta, 500 µg, de MAP (Kahn, J. et al. 1994 Tenth International Conference on AIDS Yokohama, Japan 7-12 August., Vol. 1)(Li, D. et al. 1997 Asian Pac J Allergy Immunol. 15:105-13). Si se pensara en preparar una mezcla de MAPs basados en la selección de diferentes V3 buscando el más amplio espectro de neutralización de aislamientos clínicos la cantidad necesaria de microgramos totales de MAPs sería incompatible con las prácticas habituales de inmunización.

La reactividad cruzada se define como la habilidad que posee un inmunógeno para reaccionar con ligandos relacionados (Paul, W. Fundamental Immunology. 4th edition). Aunque el fenómeno de la reactividad cruzada se conoce desde los mismos inicios de la inmunología, hasta la fecha ninguna preparación vacunal con probada eficacia se ha basado *a priori* en la reactividad cruzada. Esto quizás explique en parte por qué la inmensa mayoría de las vacunas en uso actualmente en los programas de inmunización de diferentes países protegen contra patógenos que no presentan una alta variabilidad entre sus diferentes aislamientos clínicos.

La reactividad cruzada entre péptidos con secuencias presentando homología es una propiedad particular de cada péptido y ésta puede ser potenciada de acuerdo a diferentes formas de presentación del mismo al sistema inmune. Pudiera considerarse obvio que el aumento de la inmunogenicidad trae consigo una potenciación de la reactividad cruzada, sin embargo, no resulta así. En un estudio con péptidos T-B se demostró que la inducción de anticuerpos con reactividad y/o neutralización cruzadas no correlaciona con la inmunogenicidad de los péptidos (Kasmi, K.C, et. al. 1998 Molecular Immunology 35:905-918).

Para poder generar una respuesta inmunológica capaz de reconocer un gran número de variantes antigénicas de un patógeno se han generado una serie de ideas. Una de éstas consiste en la inclusión dentro de un polipéptido multiepitópico de todas las variantes de un epítipo o aquellas más importantes. Los polipéptidos multiepitópicos

generados a partir de secuencias para epítomos B no han sido siempre una opción viable (Flynn, J.N, et. al. 1997 J Virol 71: 7586-92). En primer término la generación de un polipéptido quimérico implica la producción de una molécula de estructura tridimensional impredecible que no tiene por qué exponer adecuadamente todos los epítomos representados lo cual favorece la respuesta hacia algunos e impide totalmente la respuesta contra otros. Por otro lado, resulta también impredecible la relación de dominancia que se impondrá entre los diferentes epítomos, lo cual puede silenciar incluso aquellos que se encuentran expuestos adecuadamente. Otra estrategia ha sido la generación de bibliotecas peptídicas que representan en si mismas toda o parte de la variabilidad posible. Las bibliotecas peptídicas obtenidas de regiones altamente variables han tenido un éxito relativo dado por la alta representatividad del número de epítomos que se pretende introducir en la formulación vacunal, sin embargo cada epítomo particular queda "diluido" dentro de un cúmulo muy grande de secuencias diferentes lo cual hace impredecible si se obtendrá una respuesta inmune al nivel requerido (Allen, D. et al. 1998 J. of Virol. 27: 651-659)(Jerome, E. et al. 1994 Eur. J. Immunol. 24: 2789-2795).

Otra estrategia es la diseñada en el caso del VIH con el objetivo de cubrir un amplio espectro de secuencias V3, es la generación de péptidos consenso. Esta se basa en el estudio de la variabilidad de los epítomos en los aislamientos de campo o clínicos, estableciendo para cada posición al aminoácido más conservado entre todos los aislamientos (Holley, L.H. et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. 88:6800-6804).

Divulgación de la invención

El objetivo técnico que se persigue con la invención propuesta es el desarrollo de un método de obtención de estructuras antigénicas de alta reactividad cruzada y capaces de potenciar la respuesta inmune a antígenos peptídicos administrados por vía sistémica y/o mucosal. Este método genera estructuras dendriméricas conjugadas que cuentan con una parte sintética acoplada a proteínas portadoras en proporciones adecuadas. La adición de estructuras semejantes portando otros epítomos B ha permitido incrementar la reactividad cruzada, con lo que se consigue además un incremento de la inmunogenicidad general de los antígenos coadministrados. Otros antígenos y adyuvantes pueden ser adicionados a esta preparación.

Por lo tanto, uno de los objetos de la presente invención es un método de obtención de estructuras antigénicas que potencian la reactividad cruzada específica. Dicho método comprende los siguientes pasos:

A) Selección del epítipo de interés;

- 5 B) Obtención de estructuras dendriméricas con los epítopos seleccionados en el paso (A) mediante un método de síntesis, el cual puede ser la síntesis sobre un núcleo de lisinas o ácido aspártico; ó la síntesis sobre núcleos de moléculas orgánicas; la síntesis sobre un núcleo dendrimérico; el acoplamiento de péptidos sobre un núcleo dendrimérico; o mezclas sobre un mismo núcleo de epítopos de células B, de células T
10 o de ambas;

(C) Conjugación de una o varias de las estructuras dendriméricas obtenidas en el paso (B), a una o varias moléculas portadoras mediante un método de conjugación que puede ser la conjugación utilizando glutaraldehído, anhídrido succínico, éster de ácido β -maleimidopropionico-N -hidroxisuccinimida (MPS) o empleando un espaciador sin cadenas laterales aromáticas, ya que se evidenció que la presencia de estas cadenas
15 elimina la reactividad hacia la estructura dendrimérica acoplada.

- D) Mezcla de los conjugados obtenidos en el paso (C) para la obtención de las formulaciones mediante la adición del péptido del dominio de unión al CD4 o un conjugado que contenga este epítipo, lo cual potencia la reactividad cruzada y la
20 inmunogenicidad de la estructura antigénica resultante; y finalmente

E.) Aduvar en alúmina u otro adyuvante apropiado.

En el método de la invención, los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el paso (B) pueden ser regiones del Virus de Inmunodeficiencia Humana 1 ó 2, específicamente regiones variables como la región V3.

- 25 Igualmente pueden ser empleadas regiones de virus que poseen determinado nivel de variabilidad y diversidad, entre ellos el virus de la Hepatitis C, B y los virus del Dengue.

Igualmente pueden ser empleados antígenos que se correspondan con regiones polisacáridicas de *Neisseria meningitidis*, así como péptidos que mimetizan regiones antigénicas polisacáridicas, o cualquier región de un microorganismo o un patógeno.

- 30 De igual modo el método de la invención puede utilizar regiones de antígenos propios o antígenos relevantes en la obtención de vacunas contra el cáncer, como por ejemplo las regiones de la hormona liberadora de la gonadotropina.

Entre las moléculas portadoras que pueden emplearse en el método de la invención se incluyen el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, HbsAg, la proteína p64K de *Neisseria meningitidis*, el antígeno de la nucleocápsida del HIV, el antígeno de la nucleocápsida del virus de la Hepatitis B. También pueden ser empleadas para este fin

5 moléculas de naturaleza polisacáridica como las partículas de dextrana.

El método de la invención también comprende la conjugación de una o varias de las estructuras dendriméricas obtenidas en el paso (B), a una o varias moléculas portadoras mediante conjugación covalente o asociación electrostática o por hidrofobicidad.

10 Otro objeto de la invención es la estructura antigénica que se obtiene mediante el método anterior, la cual potencia la reactividad cruzada específica de preparados que la contienen, y que comprende los epítopos antigénicos descritos previamente en forma dendrimérica y acoplados a moléculas portadoras en una proporción entre 1 y 30% de la estructura resultante.

15 Los epítopos seleccionados pueden ser de naturaleza oligosacáridica o peptídica y dentro de esta última pueden utilizarse consensos peptídicos de regiones variables seleccionados por subtipos, subgrupos, serotipos u otra forma de asociación, así como son bibliotecas de secuencias peptídicas del microorganismo seleccionado, o péptidos miméticos.

20 Particularmente los péptidos que forman parte de la región dendrimérica pueden corresponderse con regiones variables del Virus de Inmunodeficiencia Humana 1 ó 2, y dentro de estas la región V3, y regiones de otros virus que poseen determinado nivel de variabilidad y diversidad, entre ellos el virus de la Hepatitis C, B y los virus del Dengue.

25 Estas estructuras comprenden antígenos que se correspondan con regiones polisacáridicas de *Neisseria meningitidis*, así como péptidos que mimetizan regiones antigénicas polisacáridicas, o cualquier región de un microorganismo o un patógeno.

De igual modo las partículas pueden contener regiones de antígenos propios o antígenos relevantes en la obtención de vacunas contra el cáncer, como por ejemplo

30 las regiones de la hormona liberadora de la gonadotropina.

Entre las moléculas portadoras que conforman estas partículas pueden seleccionarse el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, HbsAg, la proteína p64K de *Neisseria meningitidis*, el antígeno de la nucleocápsida del HIV, el antígeno de la

nucleocápsida del virus de la Hepatitis B. También pueden incluir moléculas de naturaleza polisacáridica como las partículas de dextrana.

La invención también se relaciona con el uso de las estructuras antigénicas previamente descritas con fines de diagnóstico o para su inclusión en preparados
5 vacunales profilácticos y terapéuticos en enfermedades infecciosas, autoinmunes, cáncer, así como con las formulaciones vacunales que se obtienen a partir de las mismas, las cuales pueden ser aplicadas por vía sistémica y mucosal.

En el caso específico del lazo V3, se demuestra que es posible incrementar aun más la reactividad y la neutralización cruzadas con la adición de conjugados que porten al
10 péptido de unión a CD4, siguiendo el mismo tipo de estructura que se desarrolló para potenciar la reactividad cruzada de los péptidos de regiones variables.

La adición de estas estructuras incrementa la reactividad cruzada anti-V3 y la inmunogenicidad de antígenos coadministrados. El hecho de que este método favorezca la reactividad cruzada en estrategias vacunales que lo requieran no excluye
15 que se aplique en otras estrategias vacunales que se puedan favorecer por el incremento de la inmunogenicidad.

La invención proporciona la metodología de obtención de nuevas estructuras químicas, basadas en una diferente presentación al sistema inmunológico de epítopos B de regiones variables de microorganismos en los que la variabilidad está relacionada a su
20 patogenicidad, también de epítopos B de poca variabilidad pero que inducen una respuesta neutralizante o protectora, así como epítopos B de antígenos propios, todos ellos dispuestos con una estructura dendrímica sobre proteínas portadoras capaces de potenciar su reactividad cruzada y su inmunogenicidad.

El método de obtención propuesto permite obtener antígenos vacunales presentados al sistema inmunológico de manera diferente a los convencionales y con mayor densidad
25 epitópica, lo que incrementa la inmunogenicidad y la reactividad cruzada anti-péptido que se genera al conjugar el péptido multiantigénico a la proteína portadora. El método general descrito permite, además, disminuir las cantidades de las estructuras dendrímicas a utilizar para obtener mejores niveles de anticuerpos así como nuevas
30 propiedades resultantes de esta distinta forma de presentación.

Es fundamental destacar que en el caso de péptidos provenientes de regiones variables es posible aumentar la reactividad cruzada sin afectar la inmunogenicidad, como se describe en los ejemplos. Además de potenciarse la inmunogenicidad, se

14
evidenció una potenciación de la reactividad cruzada, esto, además de posibilitar la obtención de mejores respuestas usando menores cantidades de péptidos, es una propiedad adicional que se potencia hasta niveles significativos.

Por otra parte, este método permite acoplar diferentes estructuras dendriméricas a una misma molécula portadora. Igualmente se demostró que la combinación de mezclas de
5 este tipo de estructuras, con estructuras semejantes portando el péptido de unión a CD4, permite incrementar la inmunogenicidad y reactividad cruzada de la respuesta anti péptido V3.

La nueva estructura puede contener una parte dendrimérica constituida solamente por los epítomos B ya que la ayuda T proviene del elemento portador, o sea el concepto de
10 MAP usado como subunidad vacunal completamente sintética evadiendo el uso del elemento portador, se flexibiliza con la obtención de macromoléculas mitad natural o recombinante (portador de epítomo T) y mitad sintética y de naturaleza dendrimérica. Esta estrategia permite una mayor accesibilidad y exposición de los epítomos B de
15 interés y brinda al sistema inmune una variedad de distancias entre los péptidos presentados. Además, con el uso de los conjugados de estructuras dendriméricas a proteínas portadoras, se logra una potenciación de la reactividad cruzada y/o de la inmunogenicidad con dosis mucho más bajas respecto a las dosis de las estructuras dendriméricas (Ej. MAPs) en solución.

20 Por otra parte, ha sido probado el efecto sinérgico que puede obtenerse sobre la inmunogenicidad y sobre la reactividad cruzada con mezclas de estos conjugados.

La presente invención se puede aplicar por vía mucosal, y aún más, facilita por primera vez a la metodología de inmunización con MAPs alcanzar su uso por esta vía, una de las rutas de mayor interés en la actualidad.

25 EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Método de obtención de las estructuras antigénicas.

Las estructuras antigénicas pueden ser obtenidas a partir de la unión de estructuras dendriméricas a proteínas portadoras. La unión de estas se llevó a cabo utilizando el anhídrido succínico (AS) como agente espaciador. Este espaciador enlaza
30 covalentemente a ambos antígenos a través de sus grupos aminos. Para esto, primeramente se pusieron a reaccionar las proteínas portadoras en buffer tampón pH 8.5 con el AS durante 30 minutos aproximadamente. El AS se activa en condiciones básicas formando el acilo correspondiente que reaccionará con los grupos aminos de la

proteína. Posteriormente, los restos de AS son eliminados mediante el proceso de diálisis para evitar los entrecruzamientos de las moléculas dendriméricas (MAP) y péptido-péptido no deseados. La conjugación de los antígenos sintéticos a las proteínas portadoras se lleva a cabo activando previamente los grupos carboxilos con
5 ECDI (una carbodiimida soluble) durante 5 minutos y adicionando seguidamente la macromolécula sintética (MAPs). La separación de los conjugados se realizó mediante cromatografía de filtración en gel. Finalmente, estos fueron caracterizados por ELISA y Western Blotting empleando anticuerpos monoclonales (A₁M) y sueros de ratones.

Ejemplo 2. Método de obtención de las estructuras antigénicas empleando diferentes
10 agentes espaciadores.

La obtención de las estructuras antigénicas se realizó utilizando diferentes agentes espaciadores. Un requisito deseable para obtener un conjugado de buena calidad inmunológica es que la unión a la proteína se realice lo más lejos posible de los
residuos que forman parte del epítipo o epítopos relevantes. Para evitar este
15 fenómeno, fueron empleados diferentes agentes espaciadores: glutaraldehído, éster de M-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de ácido β -maleimidopropionico-N-hidroxisuccinimida (MPS) y anhídrido succínico (AS). Idealmente, un buen agente espaciador no debe generar respuesta de anticuerpos contra sí mismo. En los estudios realizados se encontró que los títulos generados
20 contra el epítipo JY1 por los diferentes conjugados de HBsAg-MAP utilizando diferentes agentes espaciadores fueron altos, excepto para el conjugado de MBS en el cual la respuesta fue nula, siendo alta la respuesta anti espaciador cuando se inmunizaron los ratones con conjugados que difirieron en agente acoplante. Este hecho demuestra que todos los agentes espaciadores reportados en la literatura no se
25 comportan de igual manera, lo cual indica que en la obtención de este tipo de estructuras no es obvio el uso de cualquier agente acoplante previamente descrito en el estado del arte.

Ejemplo 3. Diseño, síntesis y conjugación de nuevas estructuras dendriméricas al HBsAg.

30 Teniendo en cuenta que las estructuras antigénicas (conjugados MAP-proteínas) generaron altos títulos contra péptidos de interés. Se realizó la síntesis individual de nuevas estructuras dendriméricas, pero esta vez sin necesidad de incluir en su secuencia péptidos T auxiliares producto de la presencia de los epítopos T de la

proteína portadora. Este hecho facilita la síntesis de este tipo de estructuras, posibilita la incorporación de epítomos B de mayor tamaño y evita la formación de estructuras extrañas que se generan por la secuencia lineal T-B. Una vez sintetizado los dendrímeros fueron conjugados individualmente al HBsAg como fue descrito en el ejemplo 1. La síntesis de estos MAPs se realizó como fue descrito por J. Tam *et al.* (1988). Posteriormente, los conjugados son separados de las estructuras dendriméricas por cromatografía de filtración en gel y la concentración se determinó por Comassie.

Ejemplo 4. Estudio de potenciación de la inmunogenicidad y la reactividad cruzadas.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la conjugación del MAP a una proteína portadora sobre la inmunogenicidad y la reactividad cruzada se inmunizaron por vía subcutánea en ACF/AIF, 2 grupos de 10 ratones Balb/c hembras entre 6-8 semanas cada uno. Los grupos fueron: 1, MAP8 (TT-JY1) y 2, HBsAg-MAP8 (TT-JY1). Las dosis fueron de 50 y 10 µg respectivamente. El esquema de inmunización fue de 0-14-28-40 días y se desangró a los ratones en los días 36 y 51. El conjugado HBsAg-MAP8 (TT-JY1) se obtuvo utilizando como agente espaciador al anhídrido succínico como fue descrito en el ejemplo 1. El MAP8 (TT-JY1) contiene 8 copias del epítomo para células T, que pertenece a la región 830-844 del toxoide tetánico (TT) y contiene 8 copias para células B, que comprende la región central del lazo V3 de la gp120 del aislamiento JY1 del HIV-1 (Cruz, L.J. *et al.* 2000 *Journal of Peptide Science* 6: 217-224). Después de la tercera y cuarta dosis se estudió la respuesta anti JY1 por ELISA y la reactividad cruzada. La respuesta de anticuerpos se cuantificó por ensayo inmuno-enzimático (ELISA) para la determinación de IgG anti-péptido JY1 en suero.

El estudio de la reactividad cruzada se hizo por ELISA indirecto recubriendo con los diferentes péptidos V3 conjugados a BSA (Gómez, C.E. *et al.* 1998 *J. Virol. Methods* 71: 7-1618). Las mezclas de los sueros fueron ensayadas a una dilución 1/100.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa y $p < 0.01$ altamente significativa.

Después de la tercera dosis no hubo diferencias en cuanto a inmunogenicidad entre los grupos aunque se puso 5 veces menos cantidad en cuanto a masa del conjugado respecto del MAP lo cual evidencia la ventaja en cuanto a economía de antígeno de esta estrategia (Fig. 1A). En el grupo inmunizado con el conjugado se observa una reactividad cruzada hacia otros péptidos V3 que no aparecen en el grupo inmunizado con el MAP incluso con similares niveles de inmunogenicidad (Fig. 1B). Luego de

grupos inmunizados con MAP4 (TT-JY1) y MAP8 (TT-JY1) con los grupos HBsAg-MAP8 (TT-JY1) y HBsAg-MAP4 (TT-JY1), se encuentran niveles semejantes. Sin embargo, es importante notar que los grupos inmunizados con los conjugados recibieron una menor cantidad de proteína y a su vez tienen una inoculación menos que los grupos inmunizados con MAPs. El análisis de la reactividad cruzada de los MAPs con solo cuatro dosis (ejemplo 4) evidenció una reactividad cruzada mucho menor, evidenciándose la potenciación de la reactividad cruzada luego de la conjugación. Por tanto, este experimento corrobora el resultado obtenido en el ejemplo 4.

Ejemplo 8. Evaluación inmunológica de nuevos conjugados de dendrímeros con HBsAg. Análisis del reconocimiento de los sueros frente a un panel de péptidos V3.

Con el objetivo de evaluar las interacciones entre diferentes conjugados previendo el uso de una multiplicidad de este tipo de estructura en las vacunas que describimos y con el objetivo de demostrar la actividad potenciadora sobre la inmunogenicidad y la reactividad cruzada de la mezcla de conjugados MAP-HBsAg por vía subcutánea, se ensayaron los siguientes grupos de inmunización: 1, HBsAg-MAP4 (péptido consenso de V3); 2, HBsAg-MAP4 (CD4); 3, Mezcla de los conjugados HBsAg-MAP4 (péptido consenso) y HBsAg-MAP4 (CD4); 4, HBsAg-MAP4 (péptido librería de V3); 5, Mezcla de los conjugados HBsAg-MAP4 (péptido librería de V3) y HBsAg-MAP4 (CD4). La secuencia de los péptidos aparece resumido en la tabla 5. Se inmunizaron ratones Balb/c hembras por vía subcutánea en grupos de 10 en un volumen final de 100 μ L. Las dosis fueron de 10 μ g para los grupos 1, 2 y 4; los grupos 3 y 5 se inmunizaron con 5 μ g de cada conjugado en la mezcla. El esquema de inmunización fue: 0, 14, 28, 56, 84 días, desangrándose los ratones 10 días después de la última dosis. Un resumen del esquema de inmunización se presenta en la tabla 4.

Se evaluó la reactividad cruzada frente a un panel de 50 péptidos V3 sintetizados sobre membrana de celulosa correspondientes a diferentes aislamientos del VIH-1. Además, se evaluó la reactividad cruzada por ELISA frente a los 5 péptidos V3 mencionados en el ejemplo de la figura 1. Siempre se usaron las mezclas de sueros de cada grupo diluidas 1/100.

La respuesta de anticuerpos se cuantificó por ensayo inmuno-enzimático (ELISA) para la determinación de IgG anti-péptidos consenso de V3, CD4 y librería de V3 en suero.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa y $p < 0.01$ altamente significativa.

En el caso de los grupos HBsAg-MAP4 (librería) y HBsAg-MAP4 (consenso) se observa una respuesta de anticuerpos muy débil contra péptidos homólogos aún después de cinco dosis (tabla 6). Es notable que la mezcla de los sueros de los animales inmunizados con MAP librería no reconoce ningún péptido V3 de los ensayados en el estudio de la reactividad cruzada, ni siquiera fue capaz de reconocer al MAP homólogo, ni al péptido consenso conjugado a BSA. Sin embargo, en el grupo inmunizado con la mezcla de conjugados conteniendo los MAPs para CD4 y librería aparecen altas reactividades para el péptido consenso así como para el MAP librería lo cual no puede atribuírsele al MAP CD4 puesto que en el grupo inmunizado con este no aparece ninguna reactividad contra alguno de estos antígenos. Del último resultado se puede concluir que existió un efecto sinérgico en la mezcla de los conjugados que resultó en una potenciación muy elevada de las respuestas humorales anti consenso y anti librería. O sea, el MAP CD4 tiene un efecto inmunopotenciador apreciable sobre la respuesta anti V3 que se manifiesta muy potente usando dosis de inmunógenos 2 veces menor en la mezcla respecto a los conjugados inoculados individualmente. El mismo efecto sinérgico se observa en el grupo de la mezcla CD4 y consenso.

En este experimento se demostró que en los ratones inmunizados con las mezclas de los conjugados (grupos 3 y 5) se obtuvo una respuesta hacia ambos epítomos B incluidos en la formulación (tabla 6). Estos conjugados fueron preparados de forma independiente y luego mezclados en la formulación para evitar la dificultad de las proporciones de uno con respecto al otro. Esto se reflejó en las tres mezclas utilizadas donde se obtuvieron niveles de respuesta anti-péptido similares para cada péptido.

La respuesta anti péptido consenso y anti librería fue significativamente superior cuando ambos se inmunizaron en la mezcla con el péptido CD4 con respecto a la respuesta contra ellos mismos inmunizados como conjugados individuales. La respuesta anti consenso se incrementó y la respuesta anti librería apareció a un alto nivel como se aprecia en la figura 5b (gráficos 1 y 2). No obstante que en la mezcla se inoculó la mitad de la dosis que se administra con los conjugados individuales. Este resultado evidencia que es posible potenciar la respuesta anti V3 con la formulación de mezclas conteniendo al péptido CD4 conjugado (Figura 5, Gráficos 1 y 2).

El incremento en la reactividad cruzada se evidenció por ELISA anti péptidos del V3. Se tomaron los péptidos presentes en la proteína TAB9, previamente descritos en la figura 1 y se evaluaron los sueros de este esquema. Con respecto a la interacción entre los péptidos consenso y CD4 se observó que la mezcla generó altos títulos de respuesta por reactividad cruzada propia del CD4 y por la reactividad normal del consenso incrementada por el efecto potenciador de la adición del conjugado HBsAg-MAP4 (CD4). Además las mezclas de los sueros de los grupos 3 y 5 después de cuarta y quinta dosis fueron analizadas frente a un panel de 50 péptidos V3. En el caso del grupo 5 (mezcla CD4 y librería) se reconocen luego de cuatro dosis el 26% (13/50) de los péptidos ensayados, llegando hasta un 30% (15/50) después de 5 dosis. En cuarta dosis un 53% (7/13) de los péptidos reconocidos tuvieron una elevada reactividad y luego de 5 dosis un 46% (7/15) de estos.

Para el caso de la mezcla del grupo 3 (mezcla CD4 y consenso) cuando fue analizada frente al mismo panel de péptidos se obtuvo un reconocimiento del 72% (36/50) luego de cuatro dosis y un 92% (46/50) después de cinco dosis. El 50% (18/36) de los péptidos reconocidos luego de cuatro dosis tuvieron una alta reactividad y luego de 5 dosis fue del 48% (22/46).

De este experimento podemos concluir que con la mezcla HBsAg-MAP4 (consenso) y HBsAg-MAP4 (CD4) se obtuvo un mayor espectro de reconocimiento que en el caso de la librería. Como el péptido consenso se generó a partir de la selección de los aminoácidos más frecuentes para cada posición dentro del conjunto del panel de péptidos ensayados y la librería a su vez también fue generada a partir del mismo panel podemos concluir que la estrategia más aceptada para generar el mayor espectro de reconocimiento consiste en la inmunización de un MAP conteniendo el péptido consenso conjugado a una proteína y mezclado con otro conjugado que ejerce un efecto sinérgico.

Ejemplo 9. Comparación de la respuesta inmunológica del péptido V3 (JY1) en forma lineal y de MAP, acoplado a diferentes proteínas portadoras.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la conjugación de la estructura dendrímica (en este caso MAP) a diferentes proteínas portadoras sobre la inmunogenicidad y la reactividad cruzada, el péptido JY1 en forma lineal y de estructura dendrímica MAP se acopló a diferentes proteínas portadoras (HBsAg, KLH y P64k).

24
25

La conjugación del péptido y el MAP a los diferentes portadores se efectuó por el método del anhídrido succínico en los grupos del 5 al 9. El grupo 10 fue un control de conjugado HBsAg-MAP utilizando MPS como agente espaciador.

Se inocularon 9 grupos de 8 ratones Balb/c hembras por vía subcutánea. El esquema
5 de inmunización fue de 0-14-28-56 días y se desangró a los ratones 10 días después de la última dosis. Los grupos inmunizados, las dosis y los adyuvantes utilizados se presentan en la tabla 8.

La respuesta de anticuerpos se cuantificó por ensayo Inmuno-enzimático (ELISA) para la determinación de IgG anti-péptido JY1 en suero. La reactividad cruzada también fue
10 evaluada por ELISA empleando un panel de péptidos descritos en el ejemplo 5, además se utilizó como control un péptido no relacionado.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa y $p < 0.01$ altamente significativa.

La respuesta de anticuerpos de los conjugados de proteínas-MAP fue en todos los
15 casos superior a la respuesta inmunológica de los conjugados de péptido-proteína (Fig. 6B). La respuesta del conjugado HBsAg-MAP8 (TT-JY1) fue similar a la respuesta de la KLH-MAP8 (TT-JY1) y estas a la vez fueron superiores estadísticamente a la obtenida con el conjugado P64k-MAP8 (TT-JY1). Por otra parte, la respuesta de anticuerpos obtenida por los conjugados de MAPs a proteínas portadoras fue significativamente
20 superior ($p < 0.05$) a la del MAP8 JY1 *per se* excepto para el caso del conjugado de P64k-MAP8 (TT-JY1) aunque es importante señalar que se inoculó una masa total inferior. Estos resultados demuestran que el empleo de los conjugados de estructuras dendriméricas a proteínas portadoras optimiza la cantidad total de inmunógeno a utilizar.

25 Se observó reactividad cruzada inmunizando con todos los conjugados contra más de dos péptidos V3 heterólogos como mínimo y fue en aumento de tercera a cuarta dosis (Fig. 6C). Además se pudo evidenciar que la reactividad cruzada fue significativamente superior en las variantes en que los dendrímeros (MAPs) se acoplan a los conjugados con respecto a los MAPs sin acoplar y a los conjugados de péptidos (Fig. 6C).

30 **Ejemplo 10.** Determinación de la Inmunogenicidad y reactividad cruzada de los sueros generados por estructuras dendriméricas del péptido del lazo V3 del aislamiento RF.

Con el objetivo de demostrar que el efecto de potenciación de la inmunogenicidad y de la reactividad cruzada encontrada es independiente de la secuencia del péptido V3

el papel crítico de la conjugación para la obtención de respuestas contra el dendrímero, además de que demostró la generación de una fuerte reactividad cruzada contra diferentes péptidos V3 por vía mucosal.

Otros dendrímeros que tuvieron idéntico resultado fueron los preparados de acuerdo al ejemplo 2, utilizando como elementos portadores a los antígenos de nucleocápsida de los virus de Hepatitis B, de Hepatitis C y de Dengue Virus.

Asimismo utilizando como la parte sintética de la estructura dendrímica a péptidos de la hormona liberadora de la gonadotropina sobre los antígenos anteriormente mencionados, se pudo comprobar una reducción en el tamaño de las gónadas significativamente respecto al control de los péptidos solos y de los ratones sin inmunizar.

Ejemplo 13. Análisis de la neutralización cruzada a diferentes aislamientos del HIV-1 de sueros con reactividad cruzada.

Con el objetivo de evaluar la neutralización cruzada de sueros que reconocen a diferentes péptidos del lazo V3 de la gp 120 del HIV-1, se realizó un ensayo *in vitro* usando diferentes aislamientos de laboratorio del HIV-1 (MN, RF, IIIB y un aislamiento similar a JY1). Para esto se tomaron *pools* de los sueros de aquellos grupos cuyos inmunógenos tuvieron mayor capacidad de reactividad cruzada: HBsAg-MAP8 (TT-JY1) (ejemplo 4), HBsAg-MAP8 (TT-RF) (ejemplo 10) y la mezcla HBsAg-MAP4 (CD4) con HBsAg-MAP4 (consenso) (ejemplo 8).

Estos estudios mostraron que dentro de la respuesta de anticuerpos inducida por cada inmunógeno hay capacidad para ejercer un efecto neutralizante sobre aislamientos heterólogos.

Se demostró que los sueros de ratones inmunizados con conjugados dendrímicos conteniendo un epítipo de un solo aislamiento fueron capaces de generar neutralización cruzada frente a diferentes aislamientos del HIV-1 mencionados más arriba. Se evidenció además que los sueros de ratones inmunizados con la mezcla HBsAg-MAP4 (CD4) con HBsAg-MAP4 (consenso) tuvieron un alto nivel de neutralización cruzada.

Ejemplo 14. Síntesis de estructuras dendrímicas empleando diferentes núcleos.

Con el objetivo de incrementar la amplificación de los epítopos B por unidad molecular. Se realizó la síntesis indirecta la cual consiste en sintetizar el núcleo y los péptidos de forma separada. Este sistema evita los errores inherentes en la síntesis de secuencias

largas y permite una mayor incorporación de epítopos B o T dentro de una misma matriz adecuadamente funcionalizada.

La síntesis del núcleo dendrimérico se llevo a cabo por reacción de los grupos aminos del 1, 6 diaminohexano con los grupos carboxilos del aminoácido Boc-Lys (Boc)-OH
5 empleando diciclohexilcarbodiimida (DCC) como activador. Luego, se realizó la desprotección con trifluoroacético (TFA) al 37% en diclorometano (DCM), obteniéndose un núcleo con 4 extremos reactivos para producir una estructura dendrimérica tetravalente, después hay un segundo y un tercer nivel de acoplamiento de Boc-Lys (Boc)-OH, empleando el mismo ciclo de reacciones para obtener un núcleo que
10 contiene 16 grupos amino reactivos. Posteriormente, se ponen a reaccionar estos grupos aminos con el grupo carboxilo del anhídrido del ácido bromo acético. El núcleo es purificado por RP-HPLC empleando una columna C8. El péptido JY1 fue sintetizado previamente conteniendo una cisteína en el extremo C-terminal el cual se pone a reaccionar en proporciones adecuadas con el núcleo obtenido. La formación del tioéter
15 debido a la interacción entre el grupo heteroátomo del núcleo y el grupo tiol de la cisteína del péptido se llevo a cabo en condiciones básicas (pH, 8-9) (Fig.9). El grado de incorporación fue determinado por SDS-PAGE y filtración por gel. Se obtuvieron moléculas dendriméricas entre 40 y 50 kD.

Esta estructura dendrimérica fue acoplada a diferentes proteínas portadoras utilizando
20 los espaciadores anteriormente descritos en el ejemplo 2. Las estructuras antigénicas obtenidas fueron utilizadas en diferentes esquemas de inmunización donde fue demostrada la superioridad inmunológica de estas.

Este sistema ofrece diversas ventajas; varios péptidos antigénicos B o T preparados separadamente pueden ser incorporados dentro de una única matriz adecuadamente
25 funcionalizada (4-6H), los péptidos antigénicos pueden ser conjugados por el C o N-terminal según las características del epítopo del interés. Además, permitiendo la purificación de los determinantes individuales, evitando errores inherentes en la síntesis de secuencias largas.

Breve descripción de las figuras.**Figura 1:**

A) Estudio de la inmunogenicidad después de tres y cuatro dosis. Grupos: 1, MAP8 (TT-JY1) y 2, HBsAg-MAP8 (TT-JY1). Las dosis fueron de 50 y 10 µg respectivamente.

- 5 B) Estudio de la reactividad cruzada. Después de tres y cuatro dosis. Se ensayaron pools de sueros de ambos grupos a una dilución fija de 1/100. Se realizó un ELISA indirecto recubriendo con los diferentes péptidos V3 conjugados a BSA.

C) Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de los péptidos V3 del VIH-1 ensayados.

Figura 2:

- 10 A) Estudio del reconocimiento hacia varios péptidos V3 de las mezclas de sueros después de cuatro dosis. Grupos: 1, MAP8 (TT-JY1); 2, TAB9. Las dosis fueron de 16,4 y 100 µg respectivamente.

Figura 3:

A) Tabla 2. Grupos inmunizados:

- 15 B) Estudio comparativo de la inmunogenicidad de las diferentes formas de presentación del péptido JY1 al sistema inmune.

Figura 4:

A) Tabla 3. Resumen del esquema de inmunización.

- 20 B) Estudio de reconocimiento de los diferentes péptidos V3 de sueros obtenidos a partir de diferentes formas de presentación del péptido JY1 al sistema inmune.

Figura 5:

A) Tabla 4. Resumen del esquema de inmunización.

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de los péptidos CD4, consenso y composición de la librería del VIH-1 ensayados.

- 25 Tabla 6. Resultados de inmunogenicidad después de cuatro y cinco dosis.

Gráfico 1. Estudio de la reactividad cruzada después de cinco dosis con los sueros de los grupos 2, 3 y 6 descritos en la tabla 3.

Gráfico 2. Estudio de la reactividad cruzada después de cinco dosis con los sueros de los grupos 4, 5 y 6 descritos en la tabla 3.

- 30 C) Tabla 7. Estudio del reconocimiento frente a un panel de péptidos V3 sintetizados sobre soporte de celulosa. El patrón cualitativo refleja las intensidades relativas de las respuestas de los pools de sueros de cuarta y quinta dosis. 1 y 2, mezcla (HBsAg-MAP4 (librería), HBsAg-MAP4 (CD4)); 3 y 4, mezcla (HBsAg-MAP4 (consenso),

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de estructuras antigénicas que potencian la reactividad
5 cruzada específica caracterizado por que comprende los siguientes pasos:
 - A) Selección del epítipo de interés;
 - B) Obtención de estructuras dendriméricas con los epítopos seleccionados en el paso
(A) mediante un método de síntesis seleccionado dentro del grupo consistente en
10 síntesis sobre un núcleo de lisinas o ácido aspártico; síntesis sobre núcleos de
moléculas orgánicas; síntesis sobre un núcleo dendrimérico; acoplamiento de péptidos
sobre un núcleo dendrimérico; y mezclas sobre un mismo núcleo de epítopos de
células B, de células T o de ambas;
 - C) Conjugación de una o varias de las estructuras dendriméricas obtenidas en el paso
(B), a una o varias moléculas portadoras mediante un método de conjugación
15 seleccionado dentro del grupo consistente en: conjugación utilizando glutaraldehído,
anhídrido succínico, éster de ácido β -maleimidopropionico-N -hidroxisuccinimida (MPS)
y un espaciador sin cadenas laterales aromáticas;
 - D) Mezcla de los conjugados obtenidos en el paso (C) para la obtención de las
20 formulaciones mediante la adición del péptido del dominio de unión al CD4 o un
conjugado que lo contenga; y
 - E) Adyuvar en alúmina u otro adyuvante apropiado.
2. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1,
caracterizado porque los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el
paso (B) se corresponden con regiones del Virus de Inmunodeficiencia Humana 1 ó 2.
- 25 3. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 2,
caracterizado porque los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el
paso (B) se corresponden con regiones variables del Virus de la Inmunodeficiencia
Humana 1 ó 2.
4. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 3,
30 caracterizado porque los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el
paso (B) se corresponden con región variable V3 del Virus de la Inmunodeficiencia
Humana 1 ó 2.

5. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1, caracterizado porque los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el paso (B) se corresponden con regiones del virus de la Hepatitis B.
6. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1, caracterizado porque los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el paso (B) se corresponden con regiones del virus de la Hepatitis C.
7. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1, caracterizado porque los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el paso (B) se corresponden con regiones de los Virus del Dengue.
8. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1, caracterizado porque los antígenos que forman parte de las estructuras obtenidas en el paso (B) se corresponden con regiones polisacáridicas de *Neisseria meningitidis*.
9. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1, caracterizado porque los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el paso (B) mimetizan regiones antigénicas polisacáridicas.
10. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1, caracterizado porque los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el paso (B) se corresponden con regiones de un microorganismo o un patógeno.
11. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1, caracterizado porque los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el paso (B) se corresponden con regiones de antígenos propios o auto-antígenos.
12. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 11, caracterizado porque los péptidos que forman parte de las estructuras obtenidas en el paso (B) se corresponden con regiones de la hormona liberadora de la gonadotropina.
13. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula portadora del paso (C) es el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, HBsAg.
14. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula portadora del paso (C) es la proteína p64K de *Neisseria meningitidis*.
15. Método de obtención de estructuras antigénicas según la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula portadora del paso (C) es el antígeno de la nucleocápsida del HIV.