



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 735**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01966829 .2**
96 Fecha de presentación : **14.09.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1326633**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **Composición que comprende micropartículas inmunogénicas.**

30 Prioridad: **14.09.2000 AU PR0117**
10.05.2001 AU PR4888
14.05.2001 AU PR4962

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.08.2011

73 Titular/es: **THE MACFARLANE BURNET INSTITUTE
FOR MEDICAL RESEARCH AND PUBLIC
HEALTH Ltd.**
85 Commercial Road
Melbourne VIC 3004, AU

72 Inventor/es: **Plebanski, Magdalena**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 363 735 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende micropartículas inmunogénicas.

5 La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas y a composiciones de vacuna para su uso en la generación de respuestas inmunes en un sujeto.

Antecedentes de la invención

10 La manipulación de los sistemas inmunes de seres humanos y animales es una forma reconocida de evitar o tratar ciertas enfermedades o afecciones.

15 Los mecanismos por los que el sistema inmune controla las enfermedades Incluyen la inducción de anticuerpos neutralizantes (una respuesta inmune humoral) y la generación de respuestas celulares o de células T. Estas últimas incluye células T auxiliares (T_H) y linfocitos T citotóxicos (CTL). En casos de infección vírica, por ejemplo, polio o hepatitis, los anticuerpos proporcionan protección impidiendo que el virus infecte las células. Los anticuerpos también pueden proteger frente a bacterias, por ejemplo neumococos y estafilococos, mediante el uso de mecanismos bactericidas y mediante toxinas bacterianas neutralizantes.

20 Las células T pueden estimularse cuando fragmentos peptídicos de un antígeno se unen a moléculas conocidas como MHC I o MHC II (complejos mayor de histocompatibilidad, clase I o clase II) y se presentan en la superficie de APC (células presentadoras de antígeno) profesionales, tales como DC (células dendríticas) o macrófagos. Las células T contienen receptores de antígeno que emplean para controlar la superficie de las células para determinar la presencia de los fragmentos peptídicos del antígeno. Los receptores de antígeno en células T_H reconocen péptidos antigénicos unidos a moléculas de MHC II. Por el contrario, los receptores en CTL reaccionan con antígenos presentados en moléculas de clase I.

30 Las células T estimuladas amplifican la respuesta inmune en el sentido de que cuando una célula T reconoce una célula diana que está infectada con el patógeno, o que contiene un epítipo que reconoce, se desencadena una cadena de acontecimientos y estos dan como resultado en última instancia la muerte de las células infectadas. Además, algunas células T pueden estimular la secreción de citocinas o linfocinas, que a su vez pueden ejercer efectos que en última instancia conducen a la inactivación o erradicación de patógenos.

35 Aunque hay muchas vacunas en el mercado, existe la necesidad de producir vacunas más eficaces y de intervalo más amplio para varias enfermedades o afecciones. También continúa existiendo la necesidad de protección frente a agentes infecciosos o patógenos contra los que actualmente no están disponibles vacunas o son ineficaces. Además, existe la necesidad de vacunas de una sola dosis eficaces, que son particularmente deseables por razones económicas, por su facilidad de administración y por la conformidad del paciente o sujeto.

40 La mayoría de las vacunas presentan la desventaja de que no son capaces de inducir una combinación óptima de los diversos tipos de respuestas humorales y celulares para ser inmunológicamente eficaces. Por ejemplo, algunas vacunas sólo estimulan respuestas de anticuerpos cuando serían más eficaces respuestas tanto de anticuerpos como celulares. En otros casos, son necesarias múltiples dosis de las vacunas, por ejemplo, inyecciones de refuerzo, para lograr protección contra el agente infeccioso pertinente.

45 En algunos otros casos, se induce producción de IgE junto con otras inmunoglobulinas deseadas tales como IgA, IgG e IgM. Las vacunas que inducen IgE no son deseables, ya que la inmunoglobulina está implicada en respuestas alérgicas.

50 La estimulación de la producción de IgA es una defensa de “primera línea” para patógenos que infectan por entrada a través de un sitio o superficie de la mucosa. Por lo tanto, también serían valiosas vacunas que puedan generar una respuesta inmune secretora de IgA elevada sin aumentar la producción de IgE.

55 En otros casos más, aunque una vacuna dé como resultado la estimulación de APC, el grado de estimulación inmune es subóptimo. Por ejemplo, las células dendríticas o DC están caracterizadas por una serie de subconjuntos de células que pueden distinguirse entre sí por moléculas de superficie, algunas de las cuales son ligandos específicos que se unen a receptores en células T. Por consiguiente, sería deseable producir una vacuna que se dirigiera selectivamente a un subconjunto de DC, por ejemplo, un subconjunto capaz de una sensibilización de células T CD8 eficaz puesto que estas células T desempeñan un papel vital en la inmunidad protectora frente a muchos patógenos intracelulares y cáncer, pero son notoriamente difíciles de inducir.

65 Además, con respecto a las vacunas, los antígenos extracelulares tradicionalmente no entran en la ruta de procesamiento del MHC-I en la mayoría de las células. En general, la producción de inmunidad por CTL usando vacunas no vivas es poco probable, aunque se han propuesto rutas de procesamiento y presentación alternativas para la clase I en APC a través de la captación de células apoptóticas, inmunocomplejos y partículas [1]. Se ha demostrado que las partículas tipo virus (VLP) no infecciosas compuestas por partículas de la proteína de superficie de Hepatitis B o de la proteína del retrotransposón de levadura se procesan eficazmente para presentación al MHC I por macrófagos para

ES 2 363 735 T3

inducir respuestas de CTL CD8 *in vitro* e *in vivo* [2, 3], Las VLP son partículas proteicas multiméricas que contienen lípidos, cuyo contenido de lípidos comprende más de 50% del peso seco.

5 Sin embargo, puesto que las partículas de la proteína de núcleo de Hepatitis B no son inmunogénicas y tienen un menor contenido de lípidos, se ha propuesto que las VLP son inmunogénicas no en virtud de su tamaño, sino por su composición bioquímica. Esto concordaría con la propuesta de que cuando un antígeno se presenta en formulaciones que contienen lípidos o detergente, son capaces de fusionarse con la APC, posiblemente dañando la membrana celular, y de este modo consiguen la entrada en el citoplasma.

10 El uso de microesferas dentro de las cuales quedan atrapados antígenos se ha explorado como una composición de vacuna posible. Las microesferas están hechas de poliésteres biodegradables de ácidos láctico y glicólico (PLA y PLGA). Las microesferas se construyen de modo que su tamaño y su composición polimérica controlan la velocidad a la que se degradan. A medida que se degradan las microesferas, el antígeno atrapado se libera de las mismas, y
15 moléculas se comunican con y reaccionan con células inmunes de la misma forma que las partículas proteicas cuya composición es biológicamente compatible con las membranas celulares.

Sin embargo, las dificultades con esta forma de composición de vacuna incluyen la estabilidad del antígeno, el tamaño de las esferas y la cinética de liberación del antígeno, teniendo todas que resolverse todavía para producir
20 una vacuna con una buena antigenicidad y una inmunogenicidad duradera, y para producir una vacuna que pueda fabricarse y administrarse económicamente [4].

En la Patente de Estados Unidos nº 4.225.581 se describe una composición que comprende una mezcla de partículas heterogéneas que varían en tamaño como útil para administrar antígenos que están adsorbidos sobre la superficie de las
25 partículas poliméricas en el cuerpo. Sin embargo, la administración con éxito, la antigenicidad y la inmunogenicidad de dicha vacuna no se ilustraron ni se demostraron. En concreto, no había referencias a la inducción de respuestas de células T CD8 o incluso el procesamiento en la ruta de presentación del MHC clase I. Se esperaba que el material polimérico de las partículas tuviera características similares a las de las micropartículas de PLA o PLGA analizadas anteriormente.

30 Por lo tanto, no se sabía antes de la presente invención si el propio tamaño de las partículas administradas como parte de vacunas podría inducir respuestas inmunogénicas.

En el trabajo conducente a la presente invención, el inventor ha descubierto sorprendentemente que micropartículas
35 de aproximadamente el mismo tamaño que virus asociadas con un antígeno proporcionan fuertes respuestas celulares y de anticuerpos humorales en sujetos.

Compendio de la invención

40 En una primera realización, la invención proporciona una composición inmunogénica para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un sujeto, comprendiendo dicha composición micropartículas compuestas por un material seleccionado de látex, moléculas ferrosas, oro, vidrio, fosfato cálcico, poliestireno, polilisina G y polímeros biodegradables y biocompatibles, con las que se asocia al menos un antígeno por acoplamiento covalente, en la que dichas micropartículas tienen un diámetro de 0,03 μm a 0,1 μm .

45 El término “que comprende” usado en relación con la composición inmunogénica significa que la composición incluye el antígeno y las micropartículas. También puede incluir otros componentes.

50 El término “antígeno” se refiere a cualquier molécula, resto o entidad capaz de generar una respuesta inmune. Esto incluye respuestas inmunes celulares y/o humorales. Dependiendo de la función deseada de la composición pueden incluirse uno o más antígenos.

55 El antígeno puede ser un péptido, proteína, lípido, carbohidrato, ácido nucleico u otro tipo de molécula, o una combinación de cualquiera de estos.

El antígeno puede proceder de un patógeno, tejido, célula, órgano o molécula dependiendo del propósito deseado de la composición, y puede ser un antígeno purificado o ser de origen recombinante producido en vectores adecuados, tales como bacterias, levaduras o cultivos celulares. El patógeno puede ser, por ejemplo, cualquier patógeno, intra-
60 o extracelular, porciones antigénicas o partes de las mismas, de origen viral, bacteriano o protozoario, tal como el VIH, virus de la gripe, virus de la hepatitis, malaria. En concreto, son ejemplos de los antígenos previstos por la presente invención los siguientes: pólenes, proteínas de núcleo, E1, E2 y NS2 del virus de la hepatitis C (VIH), antígenos de especies de Plasmodium tales como *P. vivax* y otras especies de Plasmodium incluyendo la proteína del circunsporozoíto de *P. falciparum* (CS) y TRAP, MSP-1, MSP-2, MSP-3, MSP-4, MSP-5, AMA-1, RESA, SALSA, STARP, LSA1 y LSA3 de *Plasmodium falciparum*, *vivax*, *ovatae* y *malariae* humano, glicoproteína de la envuelta gp120/160 del VIH, Ag proteico de superficie de estreptococos, nucleoproteína de influenza, infección superficial por hemaglutinina-neuraminidasa, subunidad de pilina TcpA, proteína VP1, nucleoproteína del LMCV, glicoproteína de superficie principal de Leishmania (gp63), proteína de superficie de *Bordetella pertussis*, proteína G del virus de la rabia, proteína M de Streptococcus, proteínas estafilocócicas o proteínas de *Helicobacter pylori*, proteínas F o G del

ES 2 363 735 T3

virus sincitial (RSV), gp340 o nucleoproteína 3A de virus Epstein Barr (EBV), hemaglutinina, proteína de superficie externa (Osp) A de *Borrelia burgdorferi*, lipoproteína de 38 kD o proteína de 30 kD (Ag85), proteínas de 10 kD o 65 kD de *Mycobacterium tuberculosis*, proteína externa de clase 1 de *Neisseria meningitidis*, IE62 y gpl del virus de la varicela-zóster, proteína de la cápside del virus de la rubeola, ag pre-S1 del virus de la Hepatitis B, glicoproteína G o gp D o CP27 del virus herpes simple tipo I, glicoproteína E del virus de la encefalitis del valle de Murray, VP1 del virus de la Hepatitis A, proteína de la cápside del virus de la polio VP1, VP2, VP3 y VP6, proteína superficial de *Chlamydia trachomatis*, Ag pre-S2 de la envuelta del virus de la Hepatitis B, cápside de rinovirus humano (HRV), péptidos de los oncogenes E6 y E7 de papilomavirus, proteína de superficie de Listeria, proteína de la envuelta del virus de la varicela, proteína de la envuelta de virus vaccinia, proteína superficial de Brucella, VP-3, VP-4, VP-5, VP-7 y VP-8 de Rotavirus, una combinación de uno o más de dichos antígenos, una subunidad de aminoácido de dichos antígenos que comprende cinco o más aminoácidos de longitud o combinaciones de una o más de dichas subunidades.

También pueden usarse como antígeno lisados o filtrados de cultivo de los patógenos ejemplificados anteriormente. Dichas fracciones pueden estar en forma purificada, concentrada o diluida, siempre que proporcionen antigenicidad y/o inmunogenicidad. Por lo tanto, hace posible “diseñar a medida” una composición inmunogénica para un paciente de acuerdo con la invención usando lisados de tumor del paciente o un conjunto específico de proteínas tumorales conjugadas con las micropartículas.

El antígeno también puede proceder de cualquier tipo tumoral o tumor maligno. Son ejemplos de tipos de cáncer de los que pueden proceder los antígenos cáncer de mama, pulmón, páncreas y colon, y melanoma. Son algunos ejemplos adicionales de antígenos específicos obtenidos de tumores un antígeno específico de melanoma (por ejemplo, el antígeno de la serie MAGE), antígeno carcinoembrionario (CEA) del colon, el antígeno de cáncer nm23 y otros antígenos de cáncer o, de hecho, antígenos extraídos de cualquier tumor, por ejemplo, mucina, tal como los antígenos MUC-1 a MUC-7. También pueden usarse péptidos o proteínas recombinantes en solitario o en combinación.

El antígeno también puede ser un epítipo sintético tal como un mimético o peptidomimético basado en uno o más de los antígenos mencionados anteriormente.

La expresión “en asociación con” se refiere a una asociación entre la micropartícula y el antígeno. Esta puede ser por adsorción o por conjugación o acoplamiento covalente. Preferentemente, el antígeno se une covalentemente a la micropartícula. Aún más preferentemente, el antígeno se conjuga con la superficie de la micropartícula.

El término micropartícula se refiere a una partícula pequeña. Esta puede estar en forma de una perla o esfera o cualquier otra forma adecuada.

La expresión “partículas del tamaño de virus” (VSP) se usa en este documento para describir ciertas realizaciones de la composición inmunogénica analizada en la presente memoria. Debería entenderse que el término VSP sólo se ha adoptado por comodidad y que también se contemplan partículas del mismo tamaño que virus desconocidos.

Preferentemente, la micropartícula tiene un núcleo sólido que proporciona estabilidad a los antígenos asociados o conjugados, a diferencia de las microesferas de la técnica anterior, que son huecas o encapsulan moléculas. Por comodidad, estas se denominan en la presente memoria partículas sólidas del tamaño de virus (VSSP) en las que el antígeno está presente en el exterior de la partícula. Las partículas usadas para generar VSSP están disponibles del fabricante y son sustancialmente de un tamaño uniforme (es decir, dentro de $\pm 10\%$ del tamaño indicado).

La expresión “núcleo sólido” significa sustancialmente sólido (es decir, las partículas no están huecas). La micropartícula puede estar compuesta por cualquier material adecuado seleccionado de látex, moléculas ferrosas, oro (tal como micropartículas de oro), vidrio, fosfato cálcico, poliestireno o polímeros biodegradables y biocompatibles tales como PLG (Polilactida g). Preferentemente, las micropartículas están compuestas por poliestireno, PLG u oro. Más preferentemente, las micropartículas están hechas de poliestireno.

La micropartícula está en el mismo intervalo de tamaño que virus conocidos. Esto significa que la micropartícula es de un tamaño tal que está adaptada para generar una respuesta inmune. En particular está adaptada para ser captada por células presentadoras de antígeno dentro de un sujeto humano o un animal. Por lo tanto, las micropartículas están entre 0,03 y 0,10 μm . Preferentemente, las micropartículas son de 0,03 a 0,05 μm , más preferentemente las micropartículas son de entre 0,03 μm y 0,049 μm , aún más preferentemente las micropartículas son de entre 0,03 y 0,04 μm o 0,04 y 0,049 μm .

En una realización preferida, una población de micropartículas a usar de acuerdo con la Invención, por ejemplo, en una dosis de vacunación, es de un tamaño uniforme. Esto significa que la mayoría de las partículas en una población dada son del tamaño indicado.

Preferentemente, la composición de micropartícula/antígeno está particularmente adaptada para generar una respuesta inmune celular y/o humoral. La respuesta celular se selecciona preferentemente del grupo que consiste en la activación, maduración o proliferación de células T_H , en particular células T productoras de IFN e IL4, CTL, particularmente CTL CD8 y células B. Preferentemente, la composición de micropartícula/antígeno genera mecanismos para la presentación de antígenos al MHC clase I que son captados por un mecanismo desconocido hasta ahora que implica

ES 2 363 735 T3

caveolas y/o vesículas de clatrina para un procesamiento adicional por procesos independientes de Rab 4 y dependientes de TAP, como se explica en los Ejemplos 4 y 7 de la presente memoria. La respuesta humoral se selecciona preferentemente del grupo que consiste en IgA, IgD, IgG, IgM y subclases de las mismas.

5 Las células que contribuyen a montar o amplificar una respuesta inmune también pueden estimularse por la composición. Estas incluyen, pero sin limitación, APC tales como DC de origen tanto mielóide como linfóide, y macrófagos. Se contempla la maduración, activación o proliferación de dichas células, al igual que los ligandos coestimuladores o moléculas en dichas células que interactúan con células T, por ejemplo, CD40, CD80 y CD86.

10 La composición inmunogénica de la invención puede ser para usarse en el tratamiento, profilaxis o prevención de la enfermedad o afección causada por, o asociada con el contacto con el antígeno. Por ejemplo, la composición puede ser para usarse en el tratamiento o la profilaxis de ciertos cánceres.

15 En otra realización, la composición inmunogénica de la invención como se ha descrito anteriormente en la presente memoria es una vacuna.

La composición de la invención es particularmente útil y ventajosa ya que es una vacuna de dosis única eficaz, pero también puede usarse en regímenes de dosis múltiple.

20 Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona una composición de vacuna de dosis única que comprende micropartículas asociadas con al menos un antígeno, en la que las micropartículas son como se han descrito anteriormente en la presente memoria.

25 Por “dosis única” se entiende que se estimula o aumenta una respuesta inmune humoral y/o celular hasta niveles máximos (“máximo” significa que los niveles no son capaces de aumentarse adicionalmente mediante una vacunación repetida), o proporciona protección al destinatario de la composición, después de una administración de la composición o vacuna. La administración puede ser por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por inyección i.m., i.p., i.v., por vía oral, por inhalación o por administración a través de una superficie o sitio de la mucosa.

30 Preferentemente, el antígeno está conjugado con la superficie de las micropartículas. El tamaño de las micropartículas está entre 0,03 y 0,10 μm y, preferentemente, de 0,03 a 0,05 μm de diámetro, aún más preferentemente de 0,03 a 0,049 μm . Aún más preferentemente, de 0,03 a 0,04 μm o de 0,04 a 0,049 μm . Las micropartículas son como se han descrito anteriormente en la presente memoria y, más preferentemente, están hechas de poliestireno, PLG, vidrio, fosfato cálcico u oro. En una realización preferida, cada antígeno para usar de acuerdo con la invención se conjuga con micropartículas de un tamaño uniforme.

35 En una realización adicional, la invención proporciona una composición de vacuna de dosis única que es capaz de montar una respuesta inmune humoral y celular, comprendiendo la composición micropartículas asociadas con al menos un antígeno, en la que las micropartículas son como se han descrito anteriormente en la presente memoria.

40 La respuesta celular se selecciona preferentemente del grupo que consiste en la estimulación, maduración o proliferación de células T_H , CTL y células B. La respuesta humoral se selecciona preferentemente del grupo que consiste en IgA, IgG, IgM y subclases de las mismas. Preferentemente, se estimulan respuestas de IgG, IgA y/o IgM.

45 Las células que contribuyen a montar o amplificar una respuesta inmune también pueden estimularse por la composición. Estas incluyen, pero sin limitación, APC, tales como DC de origen tanto mielóide como linfóide, y macrófagos. Se contempla la maduración, activación o proliferación de dichas células.

La expresión “que comprende” tiene el mismo significado proporcionado anteriormente.

50 El término “micropartícula” tiene el significado proporcionado anteriormente. Preferentemente, la micropartícula está adaptada para ser captada por células presentadoras de antígeno en un animal. Las micropartículas están entre 0,03 y 0,10 μm , más preferentemente las micropartículas están entre 0,03 μm y 0,05 μm . Aún más preferentemente, las micropartículas son de 0,03 a 0,049 o de 0,04 a 0,049 μm .

55 Los términos “antígeno” y “asociado con” tienen los significados proporcionados anteriormente. Puede usarse cualquier antígeno adecuado dependiendo de la afección/enfermedad contra la que se pretende vacunar.

60 La cantidad de composición de vacuna de la invención administrada a un paciente no es crítica ni limitante. Una cantidad eficaz de la composición de vacuna es la que estimule una respuesta inmune contra el componente antigénico, preferentemente después de una sola dosis o administración y, de forma deseable, dé como resultado respuestas humorales y celulares fuertes. La cantidad de composiciones administradas puede variar de acuerdo con el estado inmune del paciente (dependiendo de si el paciente está inmunosuprimido o inmunoestimulado), del juicio del médico adjunto o veterinario, de si la composición se usa como vacuna para prevenir o tratar una patología, o como una vacuna para prevenir la formación de tumores, o de si la vacuna se usa en el tratamiento de un tumor existente. A modo de ejemplo, los pacientes pueden recibir de 1 μg a 10.000 μg de la composición de la invención, más preferentemente de 50 μg a 5.000 μg , aún más preferentemente de 100 μg a 1.000 μg y, aún más preferentemente, de 100 μg a 500 μg de la composición de la invención. Generalmente no son necesarios adyuvantes.

ES 2 363 735 T3

No obstante, pueden usarse adyuvantes para la inmunización. Los adyuvantes adecuados incluyen alumbre, así como cualquier otro adyuvante o adyuvantes bien conocidos en la técnica de vacunas para su administración a seres humanos.

5 La vacuna de la invención puede administrarse por inyección, por administración por la vía oral, por inhalación o por administración a través de una superficie o sitio de la mucosa. En una realización, la vacuna se administra por medio de una pistola de genes. Si se usan de acuerdo con la invención, las micropartículas ferrosas y micropartículas de oro son especialmente adecuadas para su administración mediante pistola de genes, sin embargo, pueden administrarse de esta forma otros tipos de micropartículas con antígenos. Por ejemplo, se ha demostrado que los antígenos derivados de bibliotecas, ADN o plásmidos de malaria se administran eficazmente mediante pistola de genes de acuerdo con 10 el procedimiento descrito en Smooker PM *et al.* "Expression library immunisation protects mice against a challenge with virulent malaria". Vaccine, 18(22): 2533-2540, 2000.

15 La vacunación puede ser por administración de una sola o múltiples dosis o mediante sensibilización-refuerzo.

En una realización adicional, la invención proporciona el uso de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que comprende micropartículas compuestas por un material seleccionado de látex, moléculas ferrosas, oro, vidrio, fosfato cálcico, poliestireno, polilisina G y polímeros biodegradables y biocompatibles con las que se asocia al menos un antígeno por acoplamiento covalente, en la que dichas micropartículas tienen un diámetro de 0,03 20 μm a 0,1 μm , en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune en un sujeto.

El sujeto puede ser cualquier ser humano o animal en el que se desee generar una respuesta inmune. Esto incluye animales domésticos, animales de granja (tales como ganado bovino, ovejas, caballos, vacas, cerdos, cabras, llamas, aves de corral, avestruces y emús) y animales nativos y exóticos, animales salvajes y animales silvestres.

25 La expresión "que comprende" tiene el mismo significado que se ha proporcionado anteriormente.

Una cantidad inmunológicamente eficaz se refiere a una cantidad suficiente para generar una respuesta inmune en el sujeto, preferentemente después de una sola administración. Esto variará dependiendo de varios factores, incluyendo 30 los analizados anteriormente, y puede depender de si el sujeto es un ser humano o animal, de su edad, peso y etc.

Los términos "antígeno" y "asociado con" tienen los mismos significados que se han proporcionado anteriormente.

35 La expresión "respuesta inmune" se refiere a las respuestas celulares y humorales que se han descrito anteriormente, y también a la respuesta por células que contribuyen a montar o amplificar la respuesta inmune que se ha descrito anteriormente. En particular, la respuesta inmune puede proporcionarse por proliferación y/o expansión de células dendríticas, particularmente células DEC205+, CD40+ y CD86+.

40 El término micropartícula tiene el mismo significado que se ha proporcionado anteriormente.

La micropartícula está entre 0,03 y 0,1 μm . Preferentemente, la micropartícula está entre 0,03 μm y 0,05 μm , aún más preferentemente entre 0,03 y 0,04 o entre 0,04 y 0,049 μm . Aún más preferentemente, la composición de antígeno/micropartícula está adaptada particularmente para generar una fuerte respuesta inmune celular y/o humo- 45 ral.

En una realización preferida de la invención, las composiciones y usos descritos anteriormente son para generar una respuesta inmune en un sujeto, en la que la respuesta inmune comprende la estimulación y/o proliferación de células dendríticas. Preferentemente, las micropartículas son de 40 nm a 50 nm, más preferentemente de 40 a 49 nm de tamaño.

50 También se describe un medicamento para generar una respuesta inmune protectora contra un antígeno mediante una sola dosis por administración, una sola vez a un sujeto, de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición, que comprende al menos un antígeno asociado con micropartículas, en el que las micropartículas están en el mismo intervalo de tamaño que los virus y la respuesta inmune comprende la estimulación y/o proliferación de células dendríticas. Preferentemente, las micropartículas son de 40 nm a 50 nm, más preferentemente de 40 a 49 nm de tamaño.

60 También se describe la administración *in vivo* de un antígeno a células dendríticas para generar una respuesta inmune por administración a un sujeto de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que comprende al menos un antígeno asociado con micropartículas, en la que las micropartículas están en el mismo intervalo de tamaño que los virus y la respuesta inmune comprende la estimulación y/o proliferación de células dendríticas. Preferentemente, las micropartículas son de 40 nm a 50 nm, más preferentemente de 40 a 49 nm de tamaño.

65 También se contempla un método de producción de una composición inmunogénica de micropartícula/antígeno, que comprende poner en contacto micropartículas que están en el mismo intervalo de tamaño que los virus con uno o más antígenos de modo que las micropartículas y los antígenos se asocien. Los expertos en la materia estarán familiarizados con las técnicas usadas para producir dicha composición.

Descripción detallada de la invención

La invención se describirá ahora con referencia a los ejemplos y figuras siguientes. Sólo los ejemplos y figuras que se incluyen en las reivindicaciones son parte de la invención.

5

Figura 1 Panel A - *Captación diferencial de partículas de diferentes tamaños por macrófagos en comparación con células dendríticas*. Se incubaron 1000 perlas fluorescentes de un tamaño de 0,02, 0,1 ó 1 micrómetro por célula durante una noche con macrófagos de exudado peritoneal cultivado o células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/B6 y el porcentaje de células fluorescentes se evaluó mediante FACScan. Se muestra uno de tres experimentos similares. Se obtuvieron diferencias similares en la captación de diferentes tamaños de perla usando concentraciones de perlas 10 veces mayores, una estimulación de 3 horas con perlas o células presentadoras de antígeno derivadas de Balb/c. Panel B - *Las partículas del tamaño de virus se encuentran preferentemente en células de ganglios linfáticos *in vivo**. Izquierda Se inocularon ratones C57BL/B6 por vía intradérmica en la almohadilla plantar con 50 μ l de una solución a 0,1% de perlas fluorescentes de diferentes tamaños (0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2 micrómetros) y los ganglios linfáticos poplíteos de drenaje se extirparon 10 días después para evaluar el porcentaje de células que habían captado las perlas mediante FACScan. Los datos se muestran como la media del porcentaje de células fluorescentes \pm error típico (ET) de muestras por triplicado. Los tamaños de partícula de 0,04 y 0,1 micrómetros tenían una captación significativamente mayor que cualquier otro tamaño de partícula ($p > 0,001$). En experimentos similares usando comparativamente sólo perlas de 0,1 ó 1 micrómetro, la captación de perlas de 0,1 micrómetros era significativamente mayor que la de 1 micrómetro en ganglios linfáticos extirpados también a los días 3, 6 ó 9 después de la inoculación; Paneles C y D - *Las partículas del tamaño de virus son captadas preferentemente por células de ganglio linfático NLDC145+ (también denominadas DEC205+) (panel C) y F4/80+ (panel D)*. Se evaluaron células de ganglio linfático que habían captado partículas fluorescentes mediante análisis de FACScan para determinar la co-expresión del marcador de células dendríticas NLDC145/DEC205 o el marcador de macrófagos/monocitos F4/80. Los datos muestran el porcentaje de células NLDC145+ o F4/80+ que se habían vuelto fluorescentes debido a la captación de perlas.

Figura 2: Panel A - *Inducción de células T CD8 y CD4 productoras de IFN por inmunización con OVA conjugada con perlas de diferentes tamaños*. Se inmunizaron ratones C57BL/B6 por vía intradérmica dos veces (intervalo de 10 días) con 100 μ g de OVA conjugada con perlas de un tamaño de 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1 ó 2 micrómetros y se evaluó la actividad de células T esplénicas 10 días después de la inmunización de refuerzo mediante ELISPOT de IFN. Se midieron las respuestas contra el epítipo de células T CD8 restringido por H-2Kb SIINF EKL o contra OVA completa. En el caso de evaluar la reactividad contra OVA, se redujo el número de células T CD8 de las células de bazo antes del ensayo con perlas magnéticas (Dynabeads) para cuantificar las células T CD4 reactivas a OVA. Se usó SIINF EKL a 2,5 μ m/ml y OVA a 25 μ m/ml. Se muestra uno de tres experimentos similares. Se inmunizaron dos ratones por grupo para cada tamaño de perla. Se realizaron cultivos ELISPOT por duplicado y se muestran los valores promedio de unidades formadoras de manchas (SFU) por millón de células ensayadas. La desviación típica (DT) era siempre inferior a 20% de la media. Panel B - *Correlación entre células T con actividad citotóxica y células T secretoras de IFN mediante ELISPOT en respuesta a SIINF EKL*. Se inmunizaron ratones C57BL/B6 con perlas-OVA de diferentes tamaños y se evaluó la reactividad contra SIINF EKL mediante ELISPOT de IFN, como se ha descrito anteriormente. Además, se determinó el número de células T específicas de SIINF EKL con actividad citotóxica en paralelo mediante un análisis de dilución limitante. Se usaron como diana células EL4 cargadas con cromo en solitario o previamente estimuladas con 2,5 μ g/ml de SIINF EKL. Los datos mostrados ilustran la fuerte correlación ($R^2 = 0,9254$) encontrada entre los dos ensayos. Se muestra uno de dos experimentos similares. Panel C - *Producción de anticuerpo inducida por inmunización con OVA conjugada con perlas de diferentes tamaños*. Se recogió suero de los ratones descritos en el Panel A y se ensayaron diluciones de suero para reactividad de IgG específica de OVA por ELISA. Se representaron ratones individuales que recibieron inmunización con OVA-perlas de un tamaño de 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1 ó 2 micrómetros. Se muestra uno de dos experimentos similares.

Figura 3: *Conjugación covalente de antígeno con perlas necesaria para inducir respuestas de células T óptimas*. Panel A - La OVA conjugada con perlas solamente supone respuestas de células T restringidas por MHC clase I. Se inmunizaron ratones C57BL/B6 con OVA conjugada covalentemente con perlas de 0,04 micrómetros sin diálisis previa (Control) o después de diálisis contra PBS a través de una membrana de exclusión molecular de 300 Kd (Dializado). La inducción de células T CD8 esplénicas específicas de SIINF EKL productoras de IFN se evaluó 10 días después de una inmunización intradérmica mediante ELISPOT. Se muestra la media \pm ET para 4 ratones por grupo evaluada por ELISPOT en pocillos por duplicado. Panel B - La coadministración de perlas y OVA soluble no es suficiente para inducir respuestas de células T restringidas por MHC clase I óptimas. Se inmunizaron ratones C57BL/B6 con OVA conjugada covalentemente con perlas de 0,1 micrómetros (OVA conjugada con perlas) o mezcladas con OVA antes de la inyección (Perlas/OVA mezcladas). La inducción de células T CD8 esplénicas específicas de SIINF EKL productoras de IFN se evaluó 10 días después de una inmunización intradérmica mediante ELISPOT. Se muestra la frecuencia media de precursores de células T para 2 ratones por grupo evaluada mediante ELISPOT en pocillos por duplicado.

Figura 4: *Una sola inmunización con peñas del tamaño de virus-OVA es suficiente para inducir altos niveles duraderos de células T restringidas por MHC clase I*. Panel A - Se inmunizaron ratones C57BL/B6 por vía intradérmica una, dos o tres veces con perlas-Ova (0,1 micrómetros), con una separación de 14 días entre cada vez, y su respuesta de IFN contra SIINF EKL se examinó en cada caso 10 días después de la última inmunización mediante ELISPOT. Se inmunizaron tres ratones por grupo y los datos muestran la media de ensayos por duplicado en cada ratón. Se muestra

uno de dos experimentos similares. Panel B - Se inmunizaron ratones una vez con perlas-OVA (0,1 micrómetros) y las respuestas de IFN contra SIINFEKL u OVA se ensayaron mediante ELISPOT 12 u 82 días después. Los niveles de anticuerpo contra OVA medidos como en la Figura 2 se mantuvieron a día 82.

5 Figura 5: Evaluación de la expresión de CD40 por células que han captado perlas en el ganglio linfático (LN) de drenaje después de una inmunización intradérmica. Se disecaron células de LN poplíteo de ratones C57BL/6 sin tratamiento (izquierda) o ratones inmunizados con fluo-perlas de 0,04 μm fluorescentes por vía intradérmica en la almohadilla plantar (derecha) 48 horas después de la inyección, y se analizaron para determinar la expresión de CD40 por tinción con anticuerpos conjugados con PE específicos para estos marcadores. FL-1 = células positivas a FITC (perla+) y FL-2= células positivas a PE (marcador+). La tinción de fondo era insignificante (<1%). El panel izquierdo representa células de LN poplíteo de animales no inmunizados, el panel derecho representa el mismo tipo de células de ratones inmunizados con VSP-OVA.

15 Figura 6: Inducción de la proliferación de DC murinas maduras e inmaduras en respuesta a OVA-perlas de 0,1 μm . Se cultivaron DC de células de médula ósea extraídas de la tibia y del fémur de las patas traseras de ratones C57BL/6 con la adición de GM-CSF e IL-4. Después de 5 días en cultivo, las células se separaron en las condiciones experimentales a $1,25 \times 10^6$ células/1,25 ml y se estimularon con perlas conjugadas con OVA (0,1 μm) a 1000 perlas/célula. Después de 4 horas de estimulación, se añadió LPS y TNFa a cultivos apropiados. Las células continuaron incubándose durante una noche y al día siguiente se puso en marcha un ensayo de timidina de proliferación y se incubó durante una noche. Cada valor representa promedios por triplicado \pm DT (*p < 0,00001 entre DC no estimuladas y grupos experimentales, prueba t para muestras independientes).

25 Figura 7: Caracterización fenotípica de la captación por APC de partículas de 0,04 en comparación con 1 μm *in vivo*. Se inyectaron ratones C57/B6 en la almohadilla plantar con 50 μl de fluoperlas-OVA de 0,04 ó 1 μm . Se analizaron LN poplíteos de drenaje 48 horas después para determinar la cotinción de células positivas a perlas con marcadores celulares de activación y de linaje de células presentadoras de antígeno, se muestra la media +/- ET para 3-14 ratones/marcador. Las células fluoperla+ de 0,04 y 1 μm tenían una expresión significativamente diferente de DEC205, F4/80, CD40, CD80 y CD86 (p < 0,05).

30 Figura 8A: Mecanismo de captación de partículas del tamaño de virus por DC. Se incubaron DC cultivadas derivadas de médula ósea con acetato de forbol miristato (PMA) a 0 (negro), 5 (blanco), 10 μM (gris); amilorida (AML) a 0 (negro), 1 (blanco), 3 mM (gris) (blanco) o citochalasin D (CDD) a 0 (negro), 0,25 (blanco) o 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (gris) durante 30 min y se añadieron partículas fluorescentes-OVA de 0,04 μm durante 3 horas más. Se ha descrito la inhibición selectiva de la formación de caveolas, vesículas revestidas de clatrina o fagocitosis para PMA 10 μM , amilorida 3 mM y CCD 0,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente 14, 15. Cuando se usaron juntos el PMA se mantuvo constante a J 10 μM y la AML se añadió a 1 (blanco) o 3 mM (gris). El número de células fluorescentes se evaluó mediante FACScan. Los datos se presentan como la media +/- DT de cultivos por triplicado.

35 Figura 8B: Confirmación del mecanismo de captación. Se incubaron DC con nada, CDD 1 $\mu\text{g/ml}$, filipina (FIL) a 1 $\mu\text{g/ml}$ o cloruro de amonio (AC) a 40 mM durante 30 min y se añadieron perlas fluorescentes de 0,04 μm o 1 μm durante 3 horas más. Se ha descrito la inhibición selectiva de la formación de caveolas o vesículas revestidas de clatrina para filipina 1 $\mu\text{g/ml}$ y cloruro de amonio 40 mM, respectivamente 14-17, 29. El número de células fluorescentes se evaluó mediante FACScan. Los datos se presentan como la media +/- DT de cultivos por triplicado.

45 Figura 9: OVA soluble y perlas-OVA de 1 μm no inducen una protección comparable a perlas con OVA de 0,05 μm . Se inmunizaron ratones C57/B6 ID con OVA conjugada con perlas de 0,05 μm o 1 μm , OVA soluble o se dejaron sin tratar y después se expusieron como anteriormente. Los datos se presentan como los tamaños tumorales individuales a día 10 para 8 animales en cada grupo. Se muestra uno de dos experimentos similares. La diferencia en la frecuencia de tumores entre el grupo de perlas con OVA de 0,05 μm y cada uno de los otros grupos era significativa: P = 0,0001 frente a sin tratamiento; p = 0,0007 frente a soluble y p = 0,0035 frente a perlas-OVA de 1 μm .

50 Figura 10: Las partículas del tamaño de virus no se colocalizan con endosomas tempranos (Izquierda). Se incubaron DC derivadas de médula ósea durante una noche con perlas-OVA de 0,1 μm (500 perlas/célula), se lavaron suavemente para eliminar las perlas libres y se prepararon para microscopía confocal por centrifugación sobre portaobjetos de vidrio. Después, las células se fijaron en paraformaldehído, se permeabilizaron con tritón y se tiñó la presencia del marcador endosomal temprano Rab4 usando un anticuerpo monoclonal conjugado con biotina seguido de estreptavidina-Alexa. Se observaron resultados similares con perlas de 0,04 y 0,1 micrómetros no conjugadas y se muestra uno de tres experimentos. De forma similar, las perlas de 0,1 micrómetros fluorescentes no se colocalizaron con la tinción de Rab4 usando DC incubadas con perlas durante 30 minutos o durante 3 horas (Derecha). Se inyectó a ratones por vía intradérmica en la almohadilla plantar trasera perlas-OVA de 0,1 micrómetros y los ganglios linfáticos poplíteos de drenaje se disecaron 48 horas después para análisis confocal como se ha descrito anteriormente. No se observó colocalización para el marcador Rab4 y perlas de 0,1 micrómetros o 0,04 micrómetros conjugadas o no conjugadas con OVA. Se muestra uno de tres experimentos. Por el contrario, se confirmó la colocalización para los ratones de control positivo inmunizados con perlas fluorescentes de un tamaño de 1 micrómetro.

65 Figura 11: Protección frente a tumores. Panel A. Ratones C57/B6 inmunizados por vía intradérmica (ID) una vez con OVA-VSSP (inmunizados) o que se dejaron sin tratar (sin tratamiento) se expusieron 30 días después por vía subcutánea a 5×10^6 EG7 (células tumorales). Los tumores se midieron usando calibradores. Se muestran curvas de

ES 2 363 735 T3

crecimiento tumoral individuales para 10 animales por grupo. Panel B. Se indujeron tumores como anteriormente y el día 8 del crecimiento del tumor (día 0 de la Inmunización) 6 animales se dejaron sin tratar (sin tratamiento) y 6 se inmunizaron ID con OVA-VSSP (Inmunizados). Se muestran las curvas de crecimiento individuales los días 3-13 después de la inmunización.

5

Figura 12: Supervivencia de ratones a una exposición letal a malaria después de la inmunización con VSSP. Ratones C57/B6 inmunizados por vía intradérmica una vez con 100 μg de VSSP-OVA, VSSP-lisado o lisado solamente se expusieron a 500.000 eritrocitos de C57/BL6 infectados letalmente con *Plasmodium yoelii* 17XL. Se controló la supervivencia diariamente. Se expusieron 5 animales por grupo y se muestra uno de seis experimentos representativos. En experimentos similares, los ratones sin tratamiento tenían una supervivencia de 40% después de 2 semanas (8/20 ratones). El lisado se generó por congelación-descongelación repetida de eritrocitos infectados con *P. yoelii* 17XL y ultracentrifugación, y se conjugó con VSP usando el protocolo convencional.

10

Figura 13: El antígeno nm23 se conjugó con perlas de 0,05 μm (VSP) como se ha descrito anteriormente para el antígeno OVA, se inyectó por vía intradérmica en ratones a 100 μg /ratón y 10 días después se evaluó la reactividad de IFN gamma en los bazo de los animales inmunizados mediante ELISPOT. Los datos se presentan como la frecuencia de precursores de células que responden a nm23 por millón de esplenocitos como unidades formadoras de manchas (SFU/millón) \pm la desviación típica de la media (DT). Se muestran las respuestas individuales de tres ratones (m1-m3).

20

Figura 14: El antígeno de cáncer nm23 u OVA se conjugaron con VSP por un protocolo convencional y se inyectaron 100 μg /ratón por vía intradérmica. 10 días después se evaluó la inducción de células secretoras de IL4 mediante ELISPOT. Los datos se presentan como SFU/millón \pm DT para tres ratones individuales inmunizados con cada inmunógeno.

25

Figura 15A: Reactividad de anticuerpo contra OVA en los sueros de ratones inmunizados una vez por vía intradérmica con perlas de 0,05 μm conjugadas con OVA (VSP-OVA) y evaluadas 90 días después mediante ELISA (grupo B) en comparación con controles no inmunizados (grupo A).

30

Figura 15B: Los mismos sueros de ratones de la Figura 15A se ensayaron para determinar la presencia de anticuerpos IgE específicos de OVA mediante ELISA en dos ratones sin tratamiento (A2 y A3) y tres ratones con VSP-OVA (B2, 3 y 5).

35

Figura 16: Panel A. Inducción de respuestas de anticuerpos duraderas mediante una sola inmunización. Se inmunizaron ratones C57/B6 una vez con OVA conjugada con perlas de 0,04 μm y se recogieron sueros a diferentes puntos temporales. Se muestra la densidad óptica media a 405 nm \pm ET para cada grupo de cuatro animales en un ELISA de IgG específica de OVA. Los sueros sin tratamiento se muestran como control negativo. Se muestra uno de dos experimentos similares. Se obtuvieron resultados de ELISA similares para Ig total y no se detectó IgM ni IgA (no se muestra). La OVA solamente no induce respuestas de IgG por encima de los animales inmunizados con PBS y la OVA en adyuvante completo de Freund (CFA) induce respuestas de IgG un logaritmo superior que una sola dosis de perlas de 0,05 μm -OVA (no se muestra). Panel B. Inducción de altos niveles duraderos de células T productoras de IFN mediante una sola inmunización con perlas de 0,04 μm -OVA. Se inmunizaron ratones C57/B6 ID una vez con OVA conjugada con perlas de 0,04 μm (barra en negro o a cuadros), OVA soluble en PBS (barra blanca) o con OVA mezclada con perlas de 0,04 μm (barra gris). Se evaluó la frecuencia de precursores de células T esplénicas reactivas a SIINFEKL 10 días después (barras negra, blanca y gris) o 12 meses después (barra a cuadros) mediante ELISPOT de IFN. Se ensayaron cuatro ratones por grupo y se muestra uno de dos experimentos similares. Se muestran los valores promedio de las unidades formadoras de manchas (SFU) por millón de células \pm desviación típica (ET) para cada grupo. En experimentos similares usando 10 veces menos antígeno (10 μg de VSP-OVA) una sola inmunización induce 102 \pm 56 esplenocitos específicos de SIINFEKL por millón (n = 4). También se observaron respuestas de células T citotóxicas en ensayos de liberación de cromo convencionales 10 días después de una sola inmunización (>50% de lisis específica para 3/3 animales a una proporción de E:T de 20:1; no se muestra).

50

Figura 17: Sensibilización/refuerzo. Animales C57/B6 se dejaron sin tratar (Nada) o se sensibilizaron intradérmicamente con 100 μg de péptido cp13-32 de MUC1 conjugado con 700 μg de KLH en adyuvante completo de Freund (cp13), manano conjugado con proteína de fusión recombinante MUC1-GST (MFP) o VSP de 0,1 μm conjugadas con proteína de fusión MUC1-GST (VSP). 14 días después, los animales se reforzaron por vía intradérmica con un millón de virus vaccinia infecciosos que expresaban la proteína MUC1 y se evaluó la reactividad contra los epítomos en cp13-32 mediante ELISPOT de IFN γ 10 días después. Los datos mostrados son el número medio de células productoras de IFN γ \pm ET por millón de esplenocitos calculándose el promedio para 2-3 animales/grupo.

60

Figura 18: Comparación de partículas VSP-OVA de 0,05 μm de poliestireno y vidrio. Se conjugaron perlas de 0,05 μm de poliestireno con OVA como anteriormente (PS) y se compararon con perlas de vidrio conjugadas con OVA de la misma forma (G1). Además, se comparó un procedimiento químico diferente para las perlas de vidrio. En resumen, se pesaron perlas de vidrio y se suspendieron a 2,5% de sólidos en PBS y se lavaron dos veces. Se eliminó el PBS mediante una centrifugación de 5 minutos en una microfuga. Se resuspendió el sedimento de perlas en glutaraldehído a 8% en PBS pH 7,4 y se mezcló suavemente a temperatura ambiente durante una noche. Después, las perlas se lavaron 3x con PBS, se resuspendieron en PBS y se añadieron 500 μg de proteína por ml y se mezcló suavemente durante 5 horas. Después, las perlas se sedimentaron y la reacción se interrumpió por resuspensión del sedimento en etanolamina

65

ES 2 363 735 T3

0,5 M y mezcla durante 30 minutos. Las perlas se lavaron después en PBS y se usaron para la inmunización (G2). Se realizó una inmunización intradérmica a 100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ con VSP-OVA de poliestireno (PS) o vidrio (G1 o G2) y las células T secretoras de IFN γ específicas de SIINFEKL se cuantificaron 10 días después a partir de los bazos mediante ELISPOT. Los datos muestran la media individual \pm ET para tres animales por grupo.

5

Figura 19: Modo de conjugación de perlas e inmunogenicidad. Se mezcló ovoalbúmina a 2 mg/ml en tampón MES 50 mM (pH 6,0) con las perlas de 0,05 μm de poliestireno modificadas con carboxi (2% de sólidos) durante 15 minutos. Se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida a cada preparación a 4 mg/ml (pH 6,5) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. El patrón (glicina) se inactivó con 7 mg/ml de glicina o 20 μl de etanolamina 1 M (amina) pH 7,4, o 20 μl de aminoacetaldehído dimetil acetal 1 M (aldehído) pH 8,0, o 20 μl de etilendiamina 1 M (alcohol) pH 7,4. Las preparaciones se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas. Todas las preparaciones se dializaron durante una noche en PBS a 4°C. La preparación de aldehído se inactivó adicionalmente con 20 μl de HCl 1 M y se incubó durante 4 horas, y se dializó durante una noche en PBS a 4°C. Se inmunizaron 2-3 ratones C57/B6 con 100 μg por vía intradérmica de cada una de estas partículas VSSP-OVA y se evaluó la inmunogenicidad en bazos mediante ELISPOT de IFN γ contra el epítipo de células T CD8 SIINFEKL. Los resultados se muestran como media \pm ET de SFU/millón de esplenocitos para cada animal.

15

Ejemplo 1

20 *Materiales y métodos usados*

Ratones e inmunizaciones. Se adquirieron ratones C57BL/6 y BALB/c de 6 a 8 semanas de edad del Walter and Eliza Hall. Los ratones se inmunizaron con 100 μl de perlas conjugadas con antígeno por vía intradérmica (ID) en las almohadillas plantares traseras.

25

Reactivos: Todos los reactivos, incluyendo el antígeno ovoalbúmina (OVA, Calidad III) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) se adquirieron en Sigma a menos que se indique otra cosa. Los anticuerpos monoclonales para FACScan y estudios confocales se purificaron en el propio laboratorio a partir de líneas de hibridoma en una columna de Proteína G (Pharmacia) o se adquirieron en Pharmigen. El FITC conjugado y las fluoesferas carboxiladas de 0,02-2 μm se adquirieron en Molecular Probes y las microesferas carboxiladas no fluorescentes en Polysciences. Se usaron Ab contra los marcadores siguientes: MHC II, MHC I, CD11c, CD11b, F4/80, NLD-145, CD8 α , CD40, CD80 y CD86. El anticuerpo monoclonal anti-Rab4 usado en estudios confocales se obtuvo por cortesía del Dr. Russel (Peter McCallum Research Institute).

35

Células presentadoras de antígeno: Se prepararon células dendríticas a partir de monocitos de médula ósea con modificaciones minoritarias de métodos anteriormente publicados [5]. En resumen, se recogieron células de la tibia y de los huesos largos de los miembros posteriores extrayendo por lavado abundante las células de las cavidades óseas con medio, seguido de lisis de eritrocitos. Las células se sembraron a 1×10^6 células/ml en RPMI ((CSL, AUST) complementado con suero fetal de ternera inactivado térmicamente a 10% (FCS), L-glutamina 4 mM, penicilina 100 U/ml, sulfato de estreptomina 100 mg/ml y β -mercaptoetanol 100 μM , y se añadió GM-CSF a 1000 unidades/ml e IL-4 a 0,2 ng/ml. Los cultivos de 10 ml se cultivaron durante 5-6 días en placas de petri de un diámetro de 100 mm a 37°C en una incubadora de CO $_2$ húmeda. Se recuperaron los macrófagos de la cavidad intraperitoneal (IP) de ratones tres días después de la inyección IP de tioglicolato, y se cultivaron durante 3 días para enriquecer para fracciones de células adherentes como se ha descrito [6].

45

La conjugación de perta-antígeno se realizó siguiendo las instrucciones de los fabricantes. En resumen, se diluyó OVA a 2,0 mg/ml en tampón MES 0,05 M pH 6,0 mezclado en una proporción de volumen de 1:1 con perlas de 2% de sólidos/volumen. La mezcla se sometió a balanceo suave durante 15 minutos y después se añadió EDAC 4 mg/ml. El pH de la mezcla se ajustó a 6,5 con NaOH diluido y la mezcla se sometió a balanceo suave durante dos a tres horas. La reacción se interrumpió con glicina a una concentración final de 100 mM. Después de 30 minutos de mezcla la preparación se dializó durante una noche en refrigeración en PBS. La preparación se usó inmediatamente o se almacenó a 4°C con azida a 0,01% para un uso posterior.

50

Ensayos de citotoxicidad: Se realizaron como se ha descrito [3]. En resumen, se generaron células efectoras para ensayos de citotoxicidad cultivando esplenocitos durante 7 días a $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ en placas de pocillos de 2 ml a 37°C en una incubadora de CO $_2$ húmeda con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del antígeno peptídico en medio RPMI (CSL, AUST) complementado con suero fetal de ternera inactivado térmicamente a 10% (FCS), L-glutamina 4 mM, penicilina 100 U/ml, sulfato de estreptomina 100 mg/ml y β -mercaptoetanol 100 μM . Se añadió interleucina 2 (10 U/ml, IL2 humana recombinante, Lymphocult HT, Biotest, Reino Unido) el día 3. Las dianas eran células EL4 cargadas con ^{51}Cr , solas (fondo) o previamente estimuladas durante 1 h a 37°C con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del péptido SIINFEKL o EG7, una línea celular EL4 transformada con ovoalbúmina. A menos que se indique otra cosa, los ensayos se realizaron por duplicado a una proporción de efector:diana de 20:1. Se preparó la lisis espontánea (con medio solamente) y la lisis máxima (con tritón a 5%) para todas las dianas por cuadruplicado. Se recogieron los sobrenadantes después de 4 h. Se calculó el % de Lisis como $100 \times ((\text{Liberación experimental} - \text{Liberación espontánea})/(\text{Liberación máxima} - \text{Liberación espontánea}))$. El % de Lisis Específica (%SL) era el % de Lisis con péptido - % de Lisis sin péptido.

65

Ensayos de precursores de células T citotóxicas (CTLp): Se realizaron ensayos de CTLp como se ha descrito anteriormente [7]. Se determinaron las frecuencias de CTLp a partir de un mínimo de 32 repeticiones, para al menos

ES 2 363 735 T3

6 cantidades de células efectoras (1×10^3 - $1,28 \times 10^5$). Las células se cultivaron en bandejas de microtitulación de fondo en U con 5×10^5 esplenocitos singénicos tratados con mitomicina C en DMEM complementado con suero fetal J de ternera a 10%, $5 \mu\text{M}$ de SIINFEKL u OVA y rhIL-2 10 U/ml. Siete días después, cada microcultivo se ensayó para determinar la citotoxicidad sustituyendo 100 μl de medio de cultivo con 100 μl de suspensión de células diana que contenía 10^4 EL4 o EG7 marcadas con ^{51}Cr como dianas. Se consideró que estaba presente actividad citotóxica si en cada pocillo se encontraba liberación de ^{51}Cr tres desviaciones típicas por encima de la liberación media de isótopo a partir de 10^4 efectoras cultivadas con estimuladoras solamente o a partir de células estimuladoras con péptido solamente o rIL2 solamente. Existía una relación lineal ($0,987 \leq r_2 \leq 1$) entre el número de células de respuesta, representadas en una escala lineal, y la frecuencia de pocillos negativos en una escala logarítmica. Se determinaron las frecuencias de CTLp como la inversa de la dosis de células de respuesta necesaria para generar un 37% de pocillos negativos [8, 9]. Los ensayos de frecuencia de CTLp se realizaron tres veces y las frecuencias individuales no diferían en más de 20% del valor medio.

Ensayos de IFN por ELISPOT: Se realizaron como se ha descrito [3]. En resumen, se incubaron 100 μl de 5×10^6 /ml esplenocitos recién aislados con los estímulos indicados durante 18 horas en placas de acetato mixtas (MAHA Millipore) previamente recubiertas con un mAb anti-IFN murino (R4), (EACC). Se prepararon pocillos por duplicado para cada condición. Los medios usados eran RPMI 1640 (CSL) complementado como se ha descrito anteriormente. Después de una incubación de una noche las células se eliminaron por lavado y las placas se incubaron con un segundo mAb conjugado con biotina contra IFN murino (XMG.21-biotina, Pharmigen, CA, Estados Unidos), seguido de un conjugado de extravidina-fosfatasa alcalina (A-AP) a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma). Se detectaron manchas de actividad de fosfatasa alcalina usando un kit de detección colorimétrica de AP (Biorad, Hercules, CA, Estados Unidos) y se contaron utilizando un microscopio de disección. Los datos se presentan como unidades formadoras de manchas (sfu) por millón de células. El péptido SIINFEKL se utilizó a 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En el *análisis estadístico* en estudios de protección se comparó el número de ratones protegidos en cada grupo usando una t prueba de χ^2 en el programa Statcalc en el paquete Epilnfo Versión 5.0. En estudios de inmunogenicidad el ELISPOT y las respuestas de liberación de cromo se compararon entre grupos usando la prueba t de Student con el paquete de Microsoft Excel Versión 5.0a. Se usó un análisis de regresión lineal para evaluar la correlación entre la inmunogenicidad y la protección usando el paquete programas estadísticos SPSS para Windows.

Captación de perlas por células dendríticas y macrófagos. A cultivos de macrófagos de tres días de edad cultivados en portaobjetos de microscopio y cultivos de células dendríticas de cinco días de edad se les suministraron micropelras fluorescentes de diferente tamaño durante periodos de 5 minutos a 24 horas. Después, los cultivos se lavaron para eliminar las perlas libres y se prepararon para FACScan o análisis confocal.

Análisis de las células que captaban perlas in vivo: Se recogieron ganglios linfáticos de drenaje y bazos de ratones inmunizados con perlas a diversos intervalos de tiempo desde 12 h post-inmunización y hasta 12 días. Se recogieron las células y, después de la lisis de eritrocitos y del lavado, se prepararon para FACScan o análisis confocal.

Tinción con marcador de superficie celular y citometría de flujo: Para la tinción superficial, se incubaron 5×10^5 células con MoAb marcado con PE contra marcadores de superficie F4/80 y NLD-145, CD. En los casos en los que el anticuerpo no estaba directamente marcado, después de dos etapas de lavado las células se incubaron con un segundo anticuerpo marcado con PE específico para el primer anticuerpo. Se usó suero sin tratamiento previo de la especie en la que se generó el segundo anticuerpo en una etapa de bloqueo antes de la incubación con el segundo anticuerpo. Después de dos lavados, las células se lavaron con PBS/paraformaldehído a 0,2% y se analizaron con un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson) y el programa informático CellQuest. Se ajustaron las puertas de dispersión de luz para excluir las células muertas y las células no linfoides. Las células de los inmunizados con perlas no teñidas para ningún marcador de superficie y las células de ratones sin tratamiento teñidas con un anticuerpo marcado con PE contra un marcador de superficie se usaron para determinar la compensación para la superposición entre los espectros de emisión de FITC y PE.

Microscopía confocal de perlas marcadas con FITC fagocitadas: Se usó un microscopio confocal de barrido Olympus con una fuente láser de kriptón-argón equipado con fluorescencia doble y detección de transmisión para determinar si las perlas tratadas con fluoresceína de diferentes tamaños eran fagocitadas por macrófagos o células dendríticas. Se adquirieron secciones en serie a través de las muestras a tamaños de etapa de entre 0,5-1,0 micrómetros para determinar la fagocitosis, y se analizaron en un analizador Optiscan. Las células se excitaron a 488 nm y 568 nm para fluoresceína y Alexa 594, respectivamente, y se detectaron a través de filtros de paso de banda de 530 nm y 610 nm, respectivamente. Durante toda la adquisición, la energía del láser se mantuvo por debajo de los niveles de saturación y los parámetros de ganancia y compensación se mantuvieron dentro de experimentos individuales.

Ensayos de ELISA: Se midieron respuestas de anticuerpos contra OVA usando ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación de cloruro de polivinilo con OVA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón NaHCO_3 0,2 M, pH 9,6) durante una noche a 4°C . Las placas se lavaron 4x con PBS/Tween 20 a 0,05% y 4x con PBS y después se bloquearon para la unión inespecífica con albúmina de suero bovino a 2% durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar como anteriormente, se añadieron diluciones seriadas de los sueros de ratón y se incubaron durante 1 h adicional a temperatura ambiente. Se usó suero de ratón no inmune como control negativo. Las placas se lavaron y el anticuerpo unido se detectó usando anticuerpo de oveja anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Selinus, AUS) y el sustrato cromogénico sulfonato de 2,2'-azino-di(3-etilbenziazolina) (Amersham, Reino Unido). La absorción a 405 nm se registró usando un lector de microplacas EL 312e.

Ejemplo 2

Captación preferente de VSSP por células presentadoras de antígeno in vitro e in vivo

5 Varios estudios usando células del linaje de macrófagos/monocitos han demostrado una fagocitosis dependiente del tamaño de partícula, con una captación óptima a un diámetro de 1 micrómetro [10, 11]. La captación se ha observado en células dendríticas, sin embargo, no se ha ensayado un intervalo exhaustivo de tamaños de partícula. El inventor estaba específicamente interesado en establecer si partículas recubiertas con proteína del tamaño de virus (0,03-0,1 μm) serían captadas eficazmente por células dendríticas o macrófagos. La Figura 1a muestra que los macrófagos de exudado peritoneal generado por tioglicolato internalizaban partículas marcadas con fluoresceína tanto de 1 μm como de 0,1 μm (fluo-perlas). Por el contrario, se descubrió que las células dendríticas derivadas de médula ósea inmaduras recogían preferentemente fluo-perlas de un tamaño de 0,1 μm . Se usó microscopía confocal para confirmar que las partículas estaban en el interior de las células (no se muestra). Estos datos *in vitro* sugerían que las partículas sólidas del tamaño de virus (VSSP) también podían captarse preferentemente por células presentadoras de antígeno *in vivo*. Se inyectaron por vía intradérmica (ID) partículas de poliestireno conjugadas con proteína fluorescente en un intervalo de tamaños (0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2 μm) en la almohadilla plantar de ratones C57BL/B6 y se recogieron las células de los ganglios linfáticos poplíteos de drenaje 10 días después para análisis de FACScan. Las partículas del tamaño de 0,04-0,1 μm se captaron preferentemente por células de ganglio linfático (Figura 1b). Se obtuvieron resultados similares analizando células de ganglio linfático los días 1, 3, 6 y 10 después de la inyección de partículas, y con partículas no conjugadas. Las VSSP eran captadas eficazmente por células presentadoras de antígeno que expresaban marcadores de superficie celular tanto de macrófagos como de células dendríticas (Figura 1b). Las células dendríticas derivadas de médula ósea también captaron VSSP *in vitro*. Como se esperaba, estas células eran de un fenotipo predominantemente mieloide [12].

Ejemplo 3

Las VSSP sensibilizan para altas frecuencias de precursores de células T citotóxicas y secretoras de IFN, así como anticuerpos

30 La captación eficaz de VSSP por células dendríticas *in vivo* sugería su uso para la administración dirigida de antígenos y su potencial como nuevas vacunas. Se inmunizaron ratones C57/BL con partículas recubiertas con ovoalbúmina (OVA) de 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5, 1 ó 2 μm , se reforzaron después de 15 días y se recogió suero o esplenocitos 10 días después. La Figura 2a muestra una inducción óptima de la inducción de células T CD8 secretoras de IFN contra el epítipo SIINFEKL restringido por MHC clase I conseguida usando partículas de un tamaño de 0,04 μm . Se encontraron células T CD4 que respondían a OVA a frecuencias de precursores similares con partículas conjugadas con OVA que variaban de 0,04-1 micrómetro. También se indujeron células T citotóxicas contra SIINFEKL con VSSP y se correlacionaron con la frecuencia de precursores de células T secretoras de IFN ($R^2 = 0,92$) (Figura 2b). Sorprendentemente, también se encontró IgG específica de OVA a las mayores frecuencias de precursores en ratones inmunizados con partículas de 0,04 μm , seguidos de los inmunizados con partículas de 1 μm (Figura 2c). Se encontraron resultados de inmunogenicidad similares usando VSSP sin fluoresceína. Por lo tanto, al contrario que muchos inmunógenos y adyuvantes que promueven preferentemente una respuesta celular o humoral, las VSSP eran capaces de inducir altos niveles de ambas.

45 Los resultados mostrados en la Figura 2 se basan en inyectar la misma cantidad total de antígeno después de la conjugación sin eliminar el antígeno soluble residual. La Figura 3a muestra que se obtuvieron respuestas de células T similares con VSSP de 0,04 micrómetros después de que el antígeno soluble se eliminase por diálisis o ultracentrifugación. Por lo tanto, no había una contribución significativa del antígeno soluble a las respuestas de células T observadas. Esto se confirmó adicionalmente por la comparación de mezclas de OVA y VSSP conjugadas y no conjugadas. La Figura 3b muestra que sólo las VSSP conjugadas covalentemente inducían altos niveles de células T específicas de SIINFEKL. Por lo tanto, era necesaria la unión covalente a las VSSP para dirigir a la OVA hacia la ruta de presentación de clase I e inducir células T restringidas por clase I *in vivo*. Podría argumentarse que una mayor cantidad de proteína conjugada en partículas pequeñas en comparación con partículas de mayor tamaño podría dar como resultado de por sí una mayor inmunogenicidad de VSSP. Sin embargo, esto no era así puesto que: 1) la inmunogenicidad maximizada a perlas de un tamaño de 0,04 μm y 0,02 μm inducía escasa reactividad (Figura 2), 2) las VSSP de 0,04-0,1 micrómetros eran sistemáticamente más inmunogénicas que partículas de 1 μm independientemente del nivel de conjugación con antígeno, (3) el aumento de la concentración inmunizante de partículas de 1 μm hasta 100 veces (hasta 1 mg/ratón) por encima de la usada para VSSP no aumentaba la inmunogenicidad hasta los niveles observados con un intervalo de concentraciones de antígeno conjugado con VSSP, 4) la inmunización con cantidades equivalentes de proteína unida en perlas de diferentes tamaños, o con el mismo número de perlas de diferente tamaño demostraba sistemáticamente que las VSSP eran más inmunogénicas que partículas de mayor tamaño a través de un intervalo de concentraciones (0,5-1000 μg de OVA total, 0,5-50 μg de OVA conjugada y 10^3 - 10^8 perlas por animal).

Ejemplo 4

65 *Una nueva ruta para la captación y procesamiento de partículas*

Se ha sugerido que péptidos derivados de la digestión de antígeno exógeno a través de la ruta de procesamiento de MHC clase II pueden regurgitarse y posteriormente unirse a moléculas de MHC clase I vacías en la superficie celular

ES 2 363 735 T3

[1, 10]. Este mecanismo alternativo de presentación de clase I depende del transporte hacia el retículo endoplásmico (ER) mediado por TAP (transportador asociado con el procesamiento de antígenos). Las VLP de proteína de superficie de Hepatitis B se procesan para presentación de clase I en macrófagos por un mecanismo independiente de TAP [2]. El inventor inmunizó ratones C57/BL *knock out* para TAP con VSSP conjugadas con OVA. No podían detectarse respuestas de células T por encima de los niveles de fondo contra SIINFEKL u OVA en animales TAP-KO, sugiriendo que el procesamiento de VSSP para presentación de clase I era, por el contrario, dependiente de TAP. Se ha descrito un mecanismo de presentación de clase I dependiente de TAP de antígeno exógeno para proteínas adsorbidas sobre partículas de 1 μm basado en la “permeabilidad” de vesículas endocíticas y en la liberación accidental de antígeno hacia el citoplasma [1, 10]. El procesamiento de dichas partículas grandes captadas por fagocitosis implica una etapa de conjugación temprana con lisosomas que expresen la proteína adaptadora Rab4 [13]. El inventor usó microscopía confocal para determinar si las VSSP seguirían por esta ruta. La Figura 4 muestra que vesículas que contienen fluo-perlas de VSSP y Rab4 no se colocalizaban en células dendríticas derivadas de médula ósea en cultivo, ni en células de ganglios linfáticos *in vivo* 24 horas después de la administración intradérmica de VSSP. Por lo tanto, las VSSP pueden usar una ruta de procesamiento que difiera de la usada tanto por VLP como por partículas de mayor tamaño, en el sentido de que son independientes de Rab4 y dependientes de TAP. El mecanismo se investigó adicionalmente en el Ejemplo 7.

Ejemplo 5

20 *Las VSSP inducen la expansión de células presentadoras de antígeno in vivo e in vitro*

Ratones C57BL/6 se dejaron sin tratar (sin tratamiento) o se inmunizaron con fluo-perlas fluorescentes de 0,1 μm por vía intradérmica en la almohadilla plantar. Se disecaron los ganglios linfáticos poplíteos (LN) 48 horas después de la inyección y se analizaron para determinar la expresión de CD40 por tinción con anticuerpos conjugados con PE específicos para este marcador.

Los resultados (Figura 5) muestran que las perlas de poliestireno de 0,04, 0,05 y 0,1 μm solas o conjugadas con OVA eran capaces de aumentar hasta 4 veces el número total de células recuperadas a partir del ganglio linfático, poplíteo de drenaje después de la inmunización intradérmica. Además, causaban un aumento de 1,5 veces en la proporción de NLDC145+ (marcador de células dendríticas) pero no F4/80+ (marcador de monocitos/macrófagos). También aumentaban >1,5 veces la proporción de células de ganglio linfático que expresaban las moléculas de activación CD40 y CD86. La Figura 5 muestra un ejemplo del aumento en células CD40+ después de la inmunización observado por FACScan (del 33% al 63%). También muestra que muchas de estas células habían captado las perlas de 0,04 μm , en este caso se usaron perlas de 0,04 μm con un núcleo verde fluorescente.

Las perlas de poliestireno de 0,04, 0,05 μm y 0,1 solas o conjugadas con OVA eran capaces de inducir la proliferación *in vitro* de células dendríticas purificadas a partir de médula ósea de ratón. Las células dendríticas inmaduras, pero no las maduras (después de la activación con LPS y TNF-alfa), eran susceptibles a este efecto activante de VSSP (Figura 6).

Estos datos sugieren en conjunto que las partículas de 0,04-0,1 μm de tamaño (VSSP) tienen la insospechada y previamente desconocida capacidad de estimular células presentadoras de antígeno, incluyendo células dendríticas, y en concreto células que expresan moléculas coestimuladoras potentes como CD40 y CD86 para proliferar y expandirse. Esto podría explicar además por qué son tan potentes. Además, sugiere un mecanismo por el que las VSSP pueden tener un efecto adyuvante (véase el Ejemplo 14, a continuación) incluso para respuestas a antígeno cuando no está químicamente conjugado con las mismas.

Ejemplo 6

50 *Fenotipo extendido de células que captan VSSP rápidamente después de la inyección*

Para evaluar adicionalmente qué células captan VSSP rápidamente después de la inyección intradérmica en la almohadilla plantar (y, por lo tanto, pueden ser responsables de la activación posterior de la inmunidad), se disecó el ganglio linfático de drenaje poplíteo. El fenotipo de células que habían captado VSSP de 0,04 μm -OVA con un núcleo fluorescente se analizó después mediante FACScan y se comparó con partículas idénticas pero que eran de un tamaño de 1 μm . La Figura 7 muestra la proporción de células perla de 0,04 μm + o perla de 1 μm + que expresan cada marcador fenotípico. Las células que captaban perlas de 0,04 μm eran en su mayor parte NLDC145+, CD40+ y CD86+. Además, más células CD11c+, CD4+ y CD8+ eran positivas a perlas de 0,04 que a perlas de 1 μm . Este fenotipo de DC altamente activadas de células que habían captado perlas de 0,04 μm puede explicar adicionalmente por qué las respuestas inmunes que se observaron eran tan potentes, particularmente las respuestas de células T CD8.

Ejemplo 7

65 *Captación y procesamiento de micropartículas*

Para abordar el mecanismo de captación de perlas de 0,04 μm -OVA por células dendríticas (DC), se incubaron DC derivadas de médula ósea con inhibidores de la fagocitosis (citochalasina D, CDD); internalización mediada por

vesículas de clatrina (amilorida, AML) o caveolas (acetato de forbol miristato, PMA) [14, 15], Las DC se cultivaron por triplicado con PMA, AML, CDD, filipina (FIL) o cloruro de amonio (AM) (todos de Sigma) a las concentraciones indicadas durante 30 min. Se añadieron perlas de 0,04 μm fluorescentes con OVA durante 3 horas adicionales y se cuantificó la captación mediante FACScan.

Tanto el PMA como la AML disminuían la captación de perlas de 0,04 μm -OVA por DC, mientras que la CCD no causaba ninguna inhibición (Figura 8a). La inhibición por PMA y AML era aditiva (Figura 8a). Esto sugería que tanto las vesículas de clatrina como las caveolas podían estar implicadas en la captación de VSSP.

La amilorida actúa inhibiendo el intercambio de $\text{Na}^+\text{-H}^+$ necesario para la endocitosis mediada por receptor [14]. El inventor ensayó adicionalmente cloruro de amonio, que inhibe el ensamblaje de vesículas de clatrina por interferencia con la acidificación del citosol [14]. El cloruro de amonio inhibía la captación de perlas de un tamaño de 0,04 pero no de 1 μm (Figura 8b), confirmando un papel para las vesículas de clatrina en la captación de VSSP. Se ha sugerido que las caveolas median un nuevo mecanismo para la captación de partículas virales en DC [15]. Los resultados del inventor usando PMA sugieren que las caveolas estaban implicadas en la captación de VSSP en DC (Figura 8a). Para confirmar esto, el inventor usó otro inhibidor de las caveolas, la filipina. La filipina actúa a través del secuestro de colesterol, mientras que el PMA afecta a los acontecimientos de fosforilación que regulan la internalización de caveolas [14, 15, 16, 17]. De forma similar al PMA, la filipina bloqueaba la captación de perlas de 0,04 μm pero no de 1 μm , confirmando la hipótesis del inventor (Figura 8b).

Las caveolas y las vesículas de clatrina pueden transportar moléculas a compartimentos endosomales y lisosomales [14, 16], Como alternativa, las caveolas pueden administrar antígeno directamente al citosol [17], conduciendo al procesamiento citoplasmático y al transporte dependiente de TAP hacia el retículo endoplásmico para la presentación con MHC clase I [1, 18].

Estos resultados, junto con los mostrados en el Ejemplo 4, indican una nueva ruta para el procesamiento de antígenos presentados de acuerdo con la presente invención. La composición inmunogénica de la invención parece haberse captado por células presentadoras de antígeno a través de caveolas y/o vesículas de clatrina, después de lo cual los antígenos se procesan por rutas independientes de Rab4 y dependientes de TAP para la presentación a MHC clase I. Esta observación es novedosa en el sentido de que la capacidad de las caveolas para inducir la ruta de procesamiento de antígenos dependiente de TAP y células CD8 no se había descrito anteriormente.

Ejemplo 8

Comparación de la eficacia protectora

Se compararon directamente partículas conjugadas con OVA (VSSP) de 50 nm (es decir, 0,05 μm) con OVA solamente o partículas conjugadas con OVA de 1000 nm (es decir, 1 μm), para determinar la capacidad para proteger a los ratones frente a una exposición subcutánea posterior con 100.000 células tumorales (EL4) que expresaban OVA. Todos los ratones se inmunizaron con 100 μg de cualquiera de las anteriores (o sin nada = sin tratamiento) por vía intradérmica una vez y después se expusieron a tumor 30 días después. La Figura 9a muestra que las VSSP-OVA impedían completamente el crecimiento de tumores que expresaban OVA, mientras que la OVA solamente o con perlas de 1000 nm tenía un efecto no significativo sobre la protección.

Ejemplo 9

Una sola inmunización con VSSP induce altos niveles de inmunidad y protege frente a la exposición a tumores

La inmunización intradérmica con VSSP conjugadas con OVA inducía células T productoras de IFN y citotóxicas específicas de SIINFEKL (Figura 10a y 1a y b). Inmunizaciones adicionales no aumentaron adicionalmente la reactividad (Figura 10b y 10c). Las células T podían mantenerse a altas frecuencias de precursores 82 días después de la inmunización (Figura 10d). Las respuestas de anticuerpos se mantuvieron de forma similar (Figura 16). Los niveles de frecuencia de precursores de células T CD8 conseguidos mediante una sola inmunización con VSSP eran superiores que los observados para una sola o incluso múltiples dosis de partículas VLP y sólo son comparables con los regímenes de sensibilización/refuerzo heterólogos altamente eficaces [1, 2, 3, 19, 20]. Altas frecuencias de precursores de células T productoras de IFN y citotóxicas se asocian con protección frente a muchos patógenos intracelulares y cáncer [21, 22, 23]. El inventor inmunizó ratones C57/BL con una sola dosis intradérmica de VSSP conjugadas con OVA y después los expuso a la línea celular tumoral EG7, que expresa OVA citoplasmática y es una diana para células T citotóxicas específicas de SIINFEKL *in vitro*. Los resultados muestran que los ratones inmunizados con VSSP estaban completamente protegidos frente a la exposición a tumores, mientras que todos los controles sin tratamiento desarrollaron tumores. Además, los niveles de anticuerpo también se aumentaban después de una sola administración de VSSP conjugadas con antígeno, de forma similar a los observados en la Figura 2c.

Trabajo adicional sobre vacunas de VSSP

Los Ejemplos 10 a 13 descritos a continuación demuestran formalmente que las VSSP pueden usarse con una diversidad de antígenos e inducen una amplia inmunidad que comprende células T productoras tanto de IFN como de

ES 2 363 735 T3

IL4. También se inducen altos niveles de IgG, pero no los anticuerpos IgE potencialmente alergénicos, después de una sola dosis.

5 La eficacia de VSSP para terapia se muestra en dos modelos adicionales. 1) Eliminación del 100% de los tumores establecidos (véase el Ejemplo 10) y 2) protección frente a malaria letal después de una sola administración de la vacuna (véase el Ejemplo 11). Esto confirma adicionalmente a las VSSP como un protocolo de vacunación flexible y extraordinariamente potente para desarrollar vacunas de una sola dosis contra una diversidad de enfermedades. Además, basándose en estos descubrimientos, el inventor cree que las VSSP pueden usarse para terapia, así como para la prevención del cáncer.

10 Ejemplo 10

Eliminación de tumores establecidos

15 El inventor ha observado que una sola inmunización con perlas-OVA protege completamente frente a la exposición posterior a tumores que expresan OVA.

20 Los ratones C57/B6 se inmunizaron una vez con 100 μg de perla (0,05 μm)-OVA (ID) o se dejaron sin tratar (sin tratamiento). Después de 30 días, los ratones se expusieron a 5×10^6 líneas celulares tumorales EG7. El tamaño del tumor se midió usando calibradores los días 3-13 después de la inmunización. Para los estudios de regresión, se administró a los ratones las células EG7 y ocho días después se dividieron en grupos de distribución de tamaño tumoral similar. Un grupo se dejó sin tratar y el otro se inmunizó con perlas-OVA después de 3 días (es decir, el día 11 después de la administración de la línea celular tumoral).

25 El inventor demuestra ahora que los tumores ya establecidos pueden curarse mediante una sola inmunización en un ratón que lleva un tumor. Los tumores se eliminaron de los ratones inmunizados en las dos semanas siguientes a una sola inyección. Esta capacidad terapéutica es altamente extraordinaria para cualquier vacuna contra el cáncer y hace que este vehículo de vacunación sea altamente prometedor para el desarrollo de una vacuna terapéutica (Figura 11B).

30 Mucina-1 o Muc1 es un antígeno asociado a cáncer de mama. La inmunización una vez con VSSP-proteína Muc1 también inhibía la formación de tumores en ratones expuestos a líneas celulares tumorales que expresan el antígeno de cáncer de mama (véase la Figura 11 A).

35 Ejemplo 11

Protección frente a malaria

40 El inventor demuestra que pueden usarse perlas de poliestireno de 0,05 μm de diámetro como vehículo para inducir protección frente a malaria en ratones. Se conjugó con perlas un lisado de eritrocitos infectados con *Plasmodium yoelii* y se usaron para inmunizar ratones que después se expusieron a una dosis letal de los parásitos.

45 Se recogió sangre de ratones C57BL/6 infectados con *P. yoelii* 17XL a una parasitemia del 50%. Los eritrocitos (RBC) recuperados después de una centrifugación a 800 g durante 15 min se congelaron/descongelaron tres veces y se sonicaron (lisaron). El lisado se conjugó con partículas de 0,05 μm como se ha descrito anteriormente. Se inyectó ID perlas-lisado, perlas-OVA o lisado solamente. Los ratones C57BL/6 inmunizados o sin tratamiento se expusieron dos semanas después por vía intraperitoneal a 1.000.000 de RBC infectados con *P. yoelii* 17XL.

50 Todos los animales sobrevivieron a la exposición, mientras que el 60% de los animales inmunizados con el lisado solamente (sin conjugación con perlas) no controlaron la infección y murieron (Figura 12). Esta es la primera demostración de que una vacuna de una sola dosis sea capaz de conferir protección frente a la malaria en fase sanguínea. Una vacuna de una sola dosis es particularmente atractiva para la malaria y otras enfermedades presentes ampliamente en el Tercer Mundo puesto que simplifica la administración y la distribución de la vacuna, asegurando, una amplia cobertura de la población.

55 Ejemplo 12

Inmunidad celular

60 1) Perlas de poliestireno de 0,05 μm de diámetro conjugadas con antígenos distintos de OVA, tales como el antígeno de cáncer nm23, también inducen una fuerte inmunidad celular como se pone de manifiesto por la inducción de altos niveles de células T secretoras de IFN gamma (Figura 13).

65 2) Además de inducir inmunidad celular, las perlas-OVA o perlas-nm23 inducían altos niveles de IL4 (Figura 14). Esta linfocina promueve la producción de anticuerpos, lo que puede explicar por qué se observa una buena inducción de anticuerpos además de observarse inmunidad celular (que requiere IFN gamma).

Ejemplo 13

Inmunidad de anticuerpos

5 1) Perlas de poliestireno de 0,05 μm de diámetro conjugadas con OVA inducían, después de una sola inyección intradérmica (ID) altos títulos de anticuerpo IgG (Figura 15A).

10 2) A pesar de los altos niveles de IgG, no hay niveles de IgE detectables. Por lo tanto, se demuestra formalmente que esta vacuna no presenta riesgo de inducir respuestas de IgE potencialmente dañinas (ya que están implicadas en la alergia) (Figura 15B).

Ejemplo 14

Administración por diferentes vías e inducción de anticuerpos IgG e IgA

15 Con vistas a identificar rutas de administración útiles de la vacuna en seres humanos, además de la vía intradérmica descrita anteriormente, se administraron VSSP conjugadas con OVA (100 μg /ratón) a ratones por vía intraperitoneal, subcutánea, intranasal e intrarrectal. Se ensayaron 3-4 ratones por grupo 30 días después de una sola inmunización. De forma similar a la vía intradérmica, todas las vías inducían células T que secretaban IFN γ contra SIINFEKL o contra OVA mediante ensayo ELISPOT (1/50.000 a 1/2.000 esplenocitos). Sorprendentemente, al contrario que las observaciones iniciales usando una inyección intradérmica que inducía altos niveles de IgG pero escasa o nada IgA, las VSSP-OVA por estas otras vías inducían respuestas de IgA en suero, y las vías intrarrectal e intranasal no inducían IgG detectable (título <1/100) (Tabla 1). Por lo tanto, las VSSP por las vías intrarrectal, intraperitoneal, intranasal y subcutánea también podían usarse para inducir una inmunidad protectora contra enfermedades en las que la IgA desempeña un papel protector, tales como infecciones de la mucosa (por ejemplo, en pulmón, cuello uterino o intestino).

TABLA 1

Vía	Título de IgG en suero	Título de IgA en suero
Intrarrectal	<1/100, <1/100, <1/100	1/1280, 1/640, 1/1280
Intraperitoneal	1/1640, 1/100, 1/400	>1/5120, >1/5120, >1,5120
Intranasal	<1/100, <1/100, <1/100, <1/100	1/160, 1/320, 1/320, 1/640
Subcutánea	1/800, 1/200, 1/6560	>1/5120, >1/5120, >1/5120

Respuestas de IgG extraordinariamente elevadas después de dos dosis

55 La inmunización dos veces con VSSP-OVA (100 μg /ratón separados por 14 días) condujo a la generación de títulos de anticuerpos IgG e Ig en suero sorprendentemente elevados de >1/500.000 según se evaluó por ELISA. Se obtuvieron resultados similares para anticuerpos IgG específicos después de dos inmunizaciones con el antígeno de cáncer de mama nm23 y el antígeno de malaria MSP4/5, cuando se conjugaron con VSSP.

Ejemplo 15

60 *Respuestas duraderas*

65 Las respuestas contra VSSP-OVA eran sorprendentemente duraderas. La Figura 16 muestra que estaban presentes fuertes respuestas de anticuerpos IgG específicos de OVA por ELISA (Panel A) y de células T CD8 contra SIINFEKL por ELISPOT de IFN γ (Panel B) un año después de una sola inmunización intradérmica (100 μg /ratón). El panel B muestra además que el antígeno tiene que estar covalentemente conjugado con la partícula sólida para una inmunogenicidad óptima.

Ejemplo 16

Sensibilización-refuerzo heterólogo

5 Se usó vaccinia-MUC1 para reforzar las respuestas de animales sensibilizados con nada, péptido cp13-32 (cp13) de MUC1 en adyuvante completo de Freund (CFA), MUC1 conjugado con manano (proteína de fusión recombinante MUC1-GST) (M-FP) o VSSP de 0,1 μm -MUC1 (proteína de fusión recombinante MUC1-GST) (VSSP). La Figura 17 muestra que se aumentaban las respuestas contra la región de péptido 13-32 de MUC1 en el grupo sensibilizado con VSSP-MUC1, reforzado con vaccinia-MUC1 en comparación con los animales que recibieron vaccinia MUC1
10 solamente (Nada/V en comparación con VSSP-IV). Por lo tanto, el antígeno VSSP sería adecuado para su uso en protocolos de sensibilización-refuerzo heterólogos.

Ejemplo 17

15 *Composición de material del núcleo sólido para VSSP*

La hipótesis del inventor de que el tamaño de 0,04-0,05 μm de núcleo sólido es el determinante principal de la inmunogenicidad de VSSP predice que las partículas hechas de un material distinto de poliestireno serían altamente inmunogénicas dentro de este intervalo de tamaño. Por lo tanto, se comparó la inmunogenicidad en ratones después de una sola inmunización por vía intradérmica con partículas de 0,05 μm hechas de poliestireno (PS) o de vidrio (G1 o G2) y conjugadas con OVA usando el mismo procedimiento químico (G1) o unión usando glutaraldehído (G2). La Figura 18 muestra que las VSSP hechas de poliestireno o vidrio eran de forma similar altamente inmunogénicas, induciendo una alta frecuencia de precursores de células T productoras de IFN γ contra SIINFEKL por ELISPOT. Por lo tanto, el núcleo sólido de VSSP para la conjugación con proteína puede proporcionarse mediante vidrio, así como
25 poliestireno, y se prevé que también serán funcionales otros materiales para el núcleo sólido, por ejemplo, PLG.

Ejemplo 18

30 *Conjugación de antígeno con VSSP*

Los resultados muestran que la mezcla de antígeno con partículas de 0,05 μm lo hace más inmunogénico que el antígeno solamente, pero ese enlace covalente es necesario para una inmunogenicidad óptima. El procedimiento químico usado para conjugar antígeno con VSSP podía ser por lo tanto teóricamente determinante de la inmunogenicidad. En concreto, la carga global de la partícula podría promover la interacción con suero específico u otras proteínas endógenas. Esto a su vez podría teóricamente promover la captación por células dendríticas y causar una alta inmunogenicidad. Para ensayar esto, se inmunizaron ratones con partículas de 50 nm (es decir, 0,05 μm) que tenían cargas diferentes en la superficie. Las OVA-VSSP tenían una carga negativa global debido al uso de nanopartículas modificadas con carboxilato y la inactivación de los grupos ácido carboxílico activados después de la conjugación de OVA con glicina (Glicina, Figura 19). Por inactivación de la reacción con etanolamina, las cargas pueden neutralizarse excepto por la carga neta de la OVA después de la conjugación (Alcohol, Figura 19). Por inactivación con etilendiamina se introduce una carga positiva (Amina, Figura 19). Por inactivación con aminoacetaldehído dimetil acetal (Aldehído, Figura 19) pueden introducirse grupos aldehído potencialmente útiles. Las tres modificaciones del protocolo de conjugación dieron como resultado partículas altamente inmunogénicas, siendo las modificaciones con amina y alcohol comparables a la glicina, y siendo el aldehído ligeramente menos inmunogénico. Por lo tanto, es altamente improbable que la inmunogenicidad sea el resultado de una adsorción inespecífica de proteínas séricas ya que la introducción de cargas opuestas a la partícula da como resultado una inmunogenicidad similar. Además, pueden introducirse algunas modificaciones alternativas en el procedimiento de conjugación y cambios en las cargas sin disminución alguna de la inmunogenicidad.

50 *Discusión*

En vista de los resultados anteriores, la composición de la invención proporciona un modo de mejorar adicionalmente u optimizar vacunas o una estrategia de vacunación que podrían ser aplicables a una diversidad de infecciones, cáncer u otras enfermedades.

55 El tamaño óptimo de las VSSP coincide con el de la mayoría de virus conocidos (30-150 nm). Por lo tanto, es tentador especular que el uso de las VSSP sea biológicamente significativo. A partir de las observaciones anteriores, el inventor cree que el sistema inmune puede estar orientado a reaccionar completamente contra partículas del intervalo de tamaño de las VSSP. Antes de la presente invención, no se sabía ni entendía que la estimulación de una respuesta inmune pudiera depender en gran medida del tamaño de un inmunostimulante que se incluye dentro del intervalo de tamaño de virus, especialmente cuando los epítomos de otros patógenos, por ejemplo, bacterias y hongos, son considerablemente grandes. De hecho, los antígenos fijados como objetivo a través de esta ruta generaban respuestas sorprendentemente amplias (que comprenden las ramas tanto humoral como celular de la respuesta inmune) y fuertes (que inducen rápidamente altas frecuencias de precursores de células T efectoras duraderas), sugiriendo que el sistema inmune pueda estar orientado a reaccionar completamente contra partículas de tamaño viral. Estudios previos utilizando VLP (es decir, antígeno puro no unido a una partícula) compuestas por proteínas de superficie de HepB, o la proteína del retrotransposón de levadura (Ty) también han demostrado una inmunidad amplia y duradera inducida por una sola dosis inmunizante, aunque las respuestas eran todavía 10-100 veces inferiores a las de con VSSP [1, 2,

3, 19, 20]. Sin embargo, se ha asumido que características distintas del tamaño solamente, tales como su contenido en lípidos o manano, o las proteínas de unión a membrana, son responsables de la capacidad de las VLP para inducir respuestas de células T restringidas por clase I [1]. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el inventor considera que la combinación de un direccionamiento eficaz a células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas *in vivo* mediante VSSP, seguido de una liberación de antígeno lenta potencial por proteólisis de las VSSP, puede haber generado inmunógenos particularmente potentes.

El uso de VSSP como vacunas novedosas se demostró por la capacidad de una sola dosis inmunizante para proteger frente a la exposición posterior a células tumorales en el modelo de OVA. El inventor también ha observado una inmunogenicidad y protección amplias y fuertes contra un antígeno expresado en el cáncer de mama, mucina-1 (MUC-1). La vía intradérmica de administración utilizada en sus estudios animales puede aplicarse fácilmente en seres humanos. Por lo tanto, las VSSP pueden ofrecer una estrategia particularmente atractiva y simple para el desarrollo de vacunas humanas, en particular contra enfermedades en las que tanto la inmunidad humoral como la celular participan en la generación de protección, tales como malaria, cáncer y enfermedades víricas, particularmente SIDA y hepatitis [10, 12, 21, 25-28]. El direccionamiento de antígeno recombinante a la ruta de presentación de clase I también ofrece la posibilidad de inducir respuestas de células T contra múltiples epítomos y, por lo tanto, ampliaría el uso de dichas vacunas en una población humana diana de diverso MHC.

En la actualidad, la sensibilización de DC para una estimulación eficaz de CTL es por estimulación *ex vivo* de DC, pero esto es costoso y logísticamente difícil. La presente invención proporciona una alternativa para administrar eficazmente antígenos a DC *in vivo*, conduciendo a la posterior inducción de altas cantidades de células T CD8 específicas de antígeno y protección inmune. La capacidad de las VSSP dentro del estrecho intervalo de tamaño de 0,04-0,05 μm para inducir niveles extraordinariamente elevados de células T CD8 podría ser la consecuencia de una captación eficaz por APC o por un subconjunto potente, dirigiéndose a la ruta de procesamiento de MHC I y/o a la estimulación directa de la función de APC. Se descubrió que la captación de las VSSP estaba aumentando en el ganglio linfático en comparación con otros tamaños, y este aumento se atribuyó a frecuencias aumentadas de células DC205+ positivas a partículas, un marcador de DC. Las DC son APC potentes y la expresión de CD40 y CD86 caracteriza adicionalmente a un subconjunto capaz de una sensibilización de células T CD8 eficaz. Estos marcadores se encontraron en una alta proporción de células VSSP+. Por lo tanto, la captación y localización selectiva de VSSP en este subconjunto potente de DC *in vivo* podría explicar la inmunogenicidad de las micropartículas de acuerdo con la invención.

Otras ventajas de las VSSP de la invención incluyen la capacidad para inducir respuestas inmunes, incluyendo la producción de IgA después de la administración por varias vías y su idoneidad para la estrategia de vacunación de sensibilización-refuerzo.

Estudios adicionales implicarán el uso de las VSSP para determinar los mecanismos fisiológicos que hace que generen la respuesta inmune excepcional obtenida.

Referencias

1. Reimann J, Shirmbeck R. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol. Rev.* 1999; 172: 131-152.
2. Schirmbeck R, Melber K, Reimann J. Hepatitis B virus small surface antigen particles are processed in a novel endosomal pathway for major histocompatibility complex class I-restricted epitope presentation. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25:1063-1070.
3. Plebanski M, Gilbert S C, Schneider J, Hannan C M, Layton G, Blanchard T, Becker M, Smith G, Butcher G, Sinden R E, Hill A V. Protection from *Plasmodium berghei* infection by priming and boosting T cells to a single class I-restricted epitope with recombinant carriers suitable for human use. *Eur J Immunol* 1998; 28: 4345-55.
4. (P. Johansen, B. Gander, H P Merkle y D Sesardic, Ambiguities in the Preclinical Quality Assessment of Microparticulate Vaccines, *TIBTECH* 2000, 18:203).
5. Lu L, McCaslin D, Starzl T E, Thomson A W. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145+, MHC class II+, B7-1dim, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* 1995; 60: 1539-45.
6. Plebanski. Preparation of lymphocytes and identification of lymphocyte subpopulations in Lymphocytes: a practical approach 1999; Editado por Rowland-Jones, S L and McMichael, A J: 1-26.
7. Pietersz G A, Li W, Popovski V, Caruana J-A, Apostolopoulos V, McKenzie I F C. Parameters for using mannan-MUC1 fusión protein to induce cellular immunity. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 45: 321-326.
8. Fazekas de St. Groth S. The evaluation of limiting dilution assays. *J Immunol Methods* 1982; 49: R11.
9. Lefkovits I, Waldmann H. Limiting dilution analysis of the cells of the immune system. I. The clonal basis of the immune response. *Immunol Today* 1984; 5: 265.

ES 2 363 735 T3

10. **York I A, Rock K L.** Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 369-96.
11. **Falo L D, Jr., Kovacovics-Bankowski M, Thompson K, Rock K L.** Targeting antigen into the phagocytic pathway *in vivo* induces protective tumour immunity. *Nat Med* 1995; 1: 649-53.
12. **Robinson S P, Saraya K, Reid C D.** Developmental aspects of dendritic cells *in vitro* and *in vivo*. *Leuk Lymphoma* 1998; 29: 477-90.
13. **Mosleh I M, Hubers L A, Steinlein P, Pasquali C, Gunther D, Meyer T F.** *Neisseria gonorrhoeae* porin modulates phagosome maturation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 35332-35338.
14. **Larnaze, Ch. & Schmid, S. L.** The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 573-80 (1995).
15. **Werling, D. et al.** Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cell. *J. Leukoc Biol* 66, 50-8 (1999).
16. **Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E. y Allard, J.** Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127,1217-32 (1994).
17. **Anderson, R. G.** Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10909-13 (1993).
18. **Reimann, J. y Kaufmann, S. H.** Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity [véanse los comentarios]. *Curr Opin Immunol* 9, 462-9 (1997).
19. **Gilbert S C, Plebanski M, Harris S J, Allsopp C E, Thomas R, Layton G T, Hill A V.** A protein particle vaccine containing múltiple malaria epitopes. *Nat Biotechnol* 1997; 15:1280-4.
20. **Gilbert S C, Schneider J, Plebanski M, Hannan C M, Blanchard T J, Smith G L, Hill A V.** Ty virus-like particles, DNA vaccines and Modified Vaccinia Virus Ankara; comparisons and combinations. *Biol Chem* 1999; 380: 299-303.
21. **Plebanski M, Hill A V S.** The immunology of malaria infection. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12:437-441.
22. **Apostolopoulos V, McKenzie I F, Pietersz G A.** Breast cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunol Cell Biol* 1996; 74:457-64.
23. **Cook G, Campbell J D.** Immune regulation in multiple myeloma: the host-tumour conflict. *Blood Rev* 1999; 13: 151-62.
24. **Gupta R K, Singh M, OHagan D T.** Poly (lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; 32: 225-246.
25. **Chisari F V, Ferrari C.** Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13: 29-60.
26. **Pierson T, McArthur J, Siciliano R F.** Reservoirs for HIV: mechanisms for viral persistence in the presence of anti-viral immune responses and anti-retroviral therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18: 665-708.
27. **Harty J T, Tvinnereim A R, White D W.** CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18.
28. **Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C.** Cellular responses to interferongamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 749-95.
29. **Arnold-Schild, D. et al.** Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol* 162, 3757-60 (1999).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un sujeto, comprendiendo dicha composición micropartículas compuestas por un material seleccionado de látex, moléculas ferrosas, oro, vidrio, fosfato cálcico, poliestireno, polilisina G y polímeros biodegradables y biocompatibles, con las que se asocia al menos un antígeno por acoplamiento covalente, en la que dichas micropartículas tienen un diámetro de 0,03 μm a 0,1 μm .
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las micropartículas están en el mismo intervalo de tamaño que los virus, lo que permite su captación por células presentadoras de antígeno dentro de un sujeto humano o animal.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que las micropartículas están entre 0,03 μm y 0,05 μm de diámetro.
- 20 4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las micropartículas son de un tamaño sustancialmente uniforme y/o comprenden un núcleo sólido.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha composición es una vacuna.
- 30 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en un péptido, proteína, péptido o proteína recombinante, lípido, carbohidrato, ácido nucleico o cualquier combinación de los mismos.
- 35 7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el antígeno procede de un patógeno, tejido, célula, órgano o molécula y se selecciona del grupo que consiste en: polen, proteínas de núcleo, E1, E2 y NS2 del virus de la hepatitis C (VIH), antígenos de especies de Plasmodium seleccionadas del grupo que consiste en *P. vivax*, la proteína del circunsporozoíto (CS) de *P. falciparum*, TRAP, MSP-1, MSP-2, MSP-3, MSP-4, MSP-5, AMA-1, RESA, SALSA, STARP, LSA1 y LSA3 de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovalae* y *P. malariae* humano, glicoproteína de la envuelta gp120/160 del VIH, antígeno proteico de superficie de estreptococos, nucleoproteína de influenza, infección superficial por hemaglutinina-neuraminidasa, subunidad de pilina TcpA, proteína VP1, nucleoproteína del LMCV, glicoproteína de superficie principal de Leishmania (gp63) proteína de superficie de *Bordetella pertussis*, proteína G del virus de la rabia, proteína M de Streptococcus, proteínas estafilocócicas, proteínas de *Helicobacter pylori*, proteínas F o G del virus sincitial (RSV), gp340 o nucleoantígeno 3A de virus Epstein Barr (EBV), hemaglutinina, proteína de superficie externa (Osp) A de *Borrelia burgdorferi*, lipoproteína de 38 kD o proteína de 30 kD (Ag85), proteínas de 10 kD o 65 kD de *Mycobacterium tuberculosis*, proteína externa de clase 1 de *Neisseria meningitidis*, IE62 y gpl del virus de la varicela zóster, proteína de la cápside del virus de la rubéola, ag pre-S1 del virus de la Hepatitis B, glicoproteína G o gp D o CP27 del virus herpes simple tipo I, glicoproteína E del virus de la encefalitis del valle de Murray, VP1 del virus de la Hepatitis A, proteína de la cápside del virus de la polio, VP1, VP2 y VP3, proteína superficial de *Chlamydia trachomatis*, Ag pre-S2 de la envuelta del virus de la Hepatitis B, cápside de rinovirus humano (HRV), péptidos de los oncogenes E6 y E7 de papilomavirus, proteína de superficie de Listeria, proteína de la envuelta del virus de la varicela, proteína de la envuelta de virus vaccinia, proteína superficial de Brucella, VP-3, VP-4, VP-5, VP-7 y VP-8 de Rotavirus, una combinación de uno o más de los antígenos, una subunidad de aminoácidos del antígeno que comprende cinco o más aminoácidos de longitud o combinaciones de una o más de las subunidades.
- 45 8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el antígeno procede de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, pulmón, páncreas, colon y melanoma.
- 50 9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la respuesta inmune se selecciona del grupo que consiste en una respuesta celular de células T auxiliares y/o CD8 y una respuesta de anticuerpos en la que el anticuerpo es inmunoglobulina G, inmunoglobulina M o inmunoglobulina A.
- 55 10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la respuesta inmune comprende generar mecanismos para la presentación a MHC Clase I del antígeno, siendo dicho antígeno captado por caveolas y/o vesículas de clatrina para un procesamiento adicional mediante procesos independientes de Rab4 y dependientes de TAP.
- 60 11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la respuesta inmune es la estimulación de células presentadoras de antígeno.
- 65 12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica.
13. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el sujeto es un ser humano o animal.

ES 2 363 735 T3

14. El uso, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune en un sujeto, de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición que comprende micropartículas compuestas por un material seleccionado de látex, moléculas ferrosas, oro, vidrio, fosfato cálcico, poliestireno, polilisina G y polímeros biodegradables y biocompatibles, con las que se asocia al menos un antígeno por acoplamiento covalente, en el que dichas micropartículas tienen un diámetro de $0,03 \mu\text{m}$ a $0,1 \mu\text{m}$.

15. El uso de la reivindicación 14, en el que la composición es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

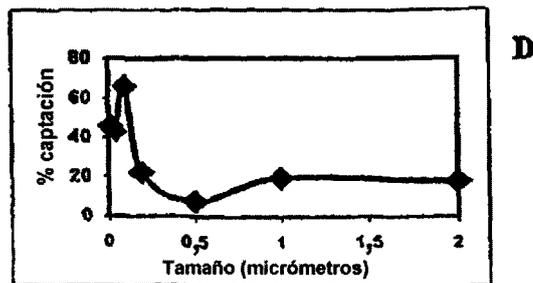
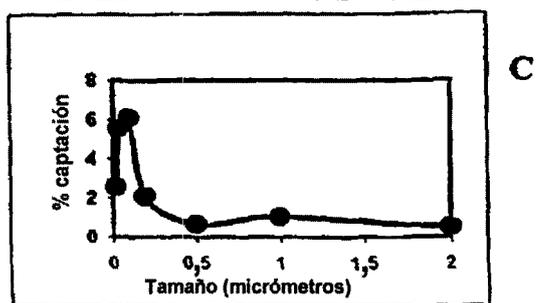
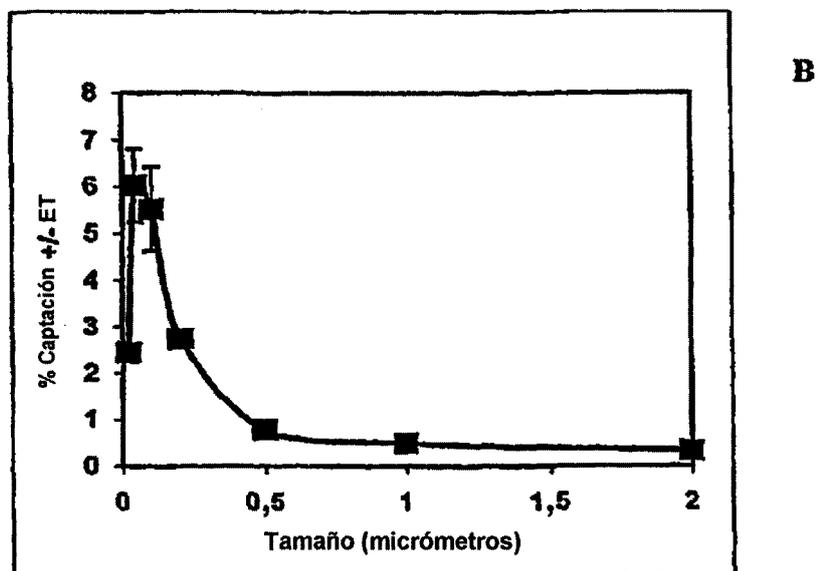
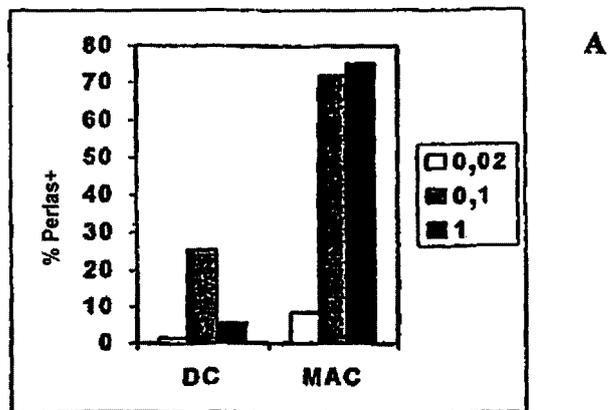


FIGURA 2

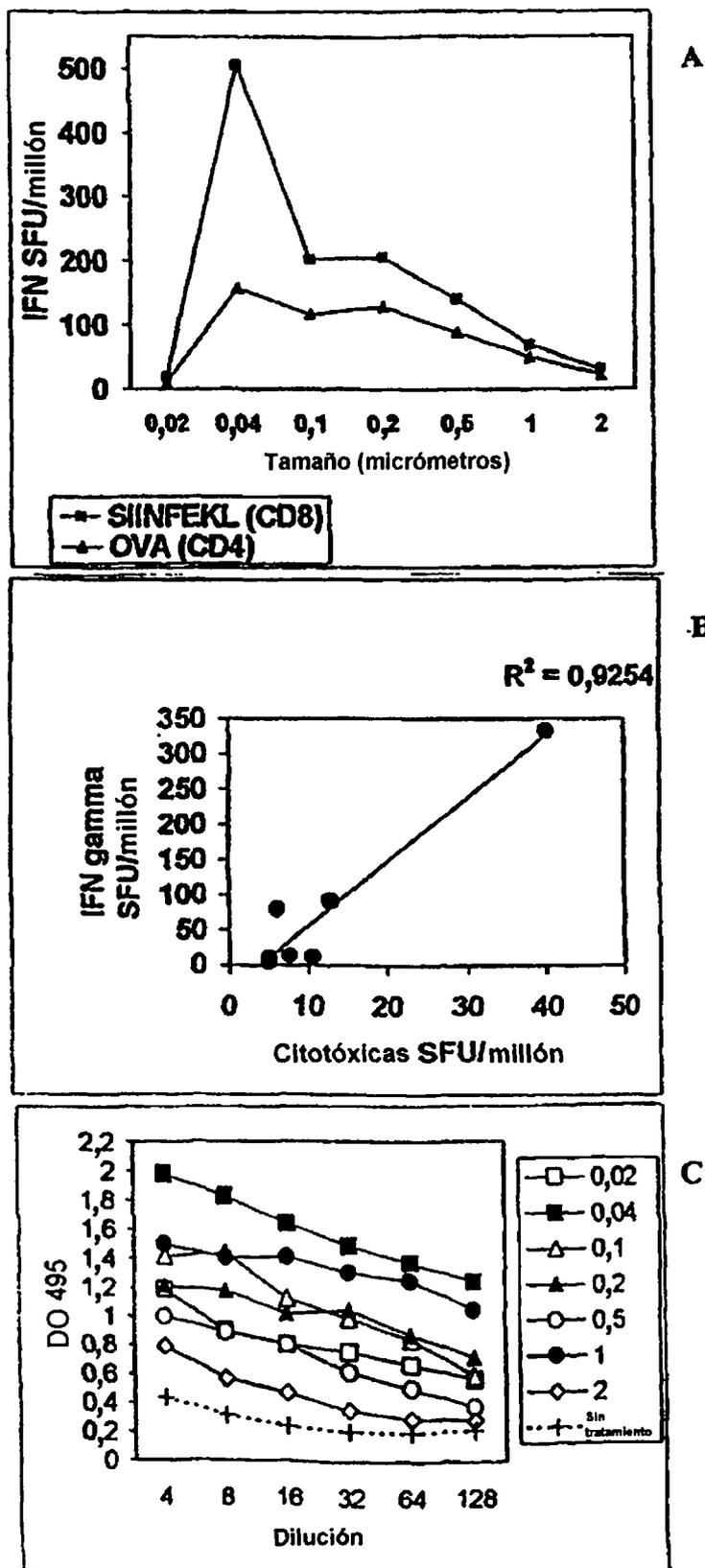


FIGURA 3

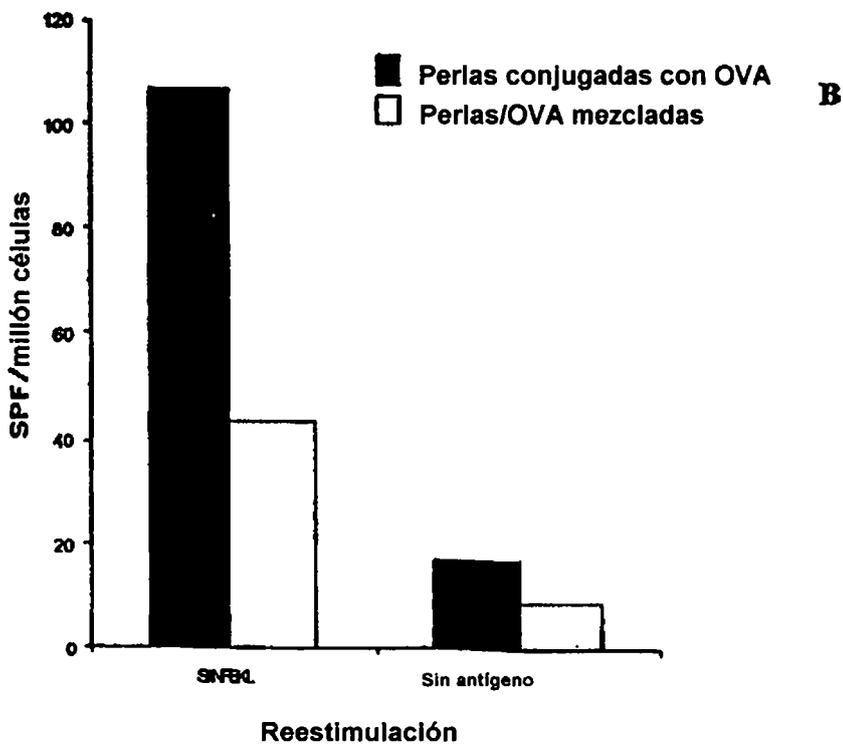
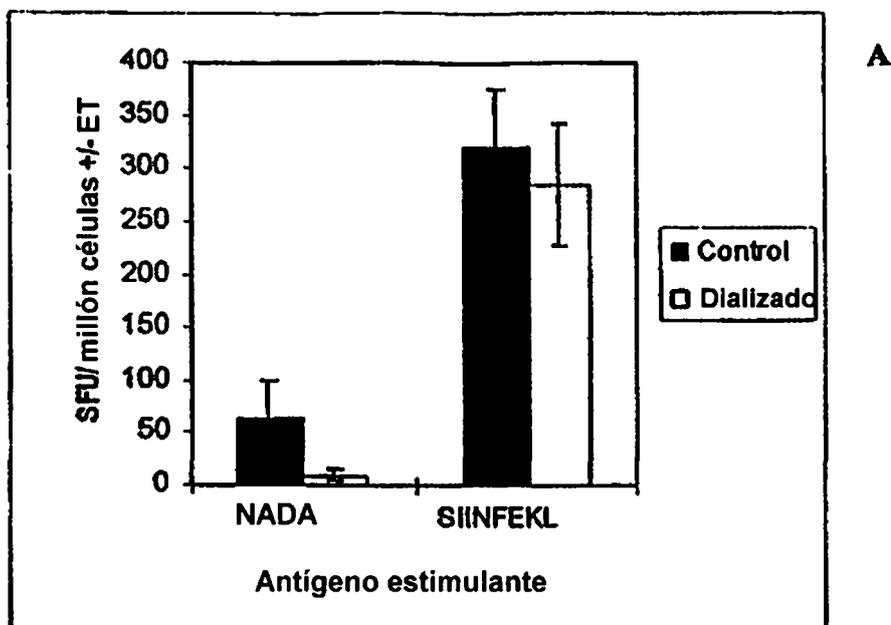


FIGURA 4

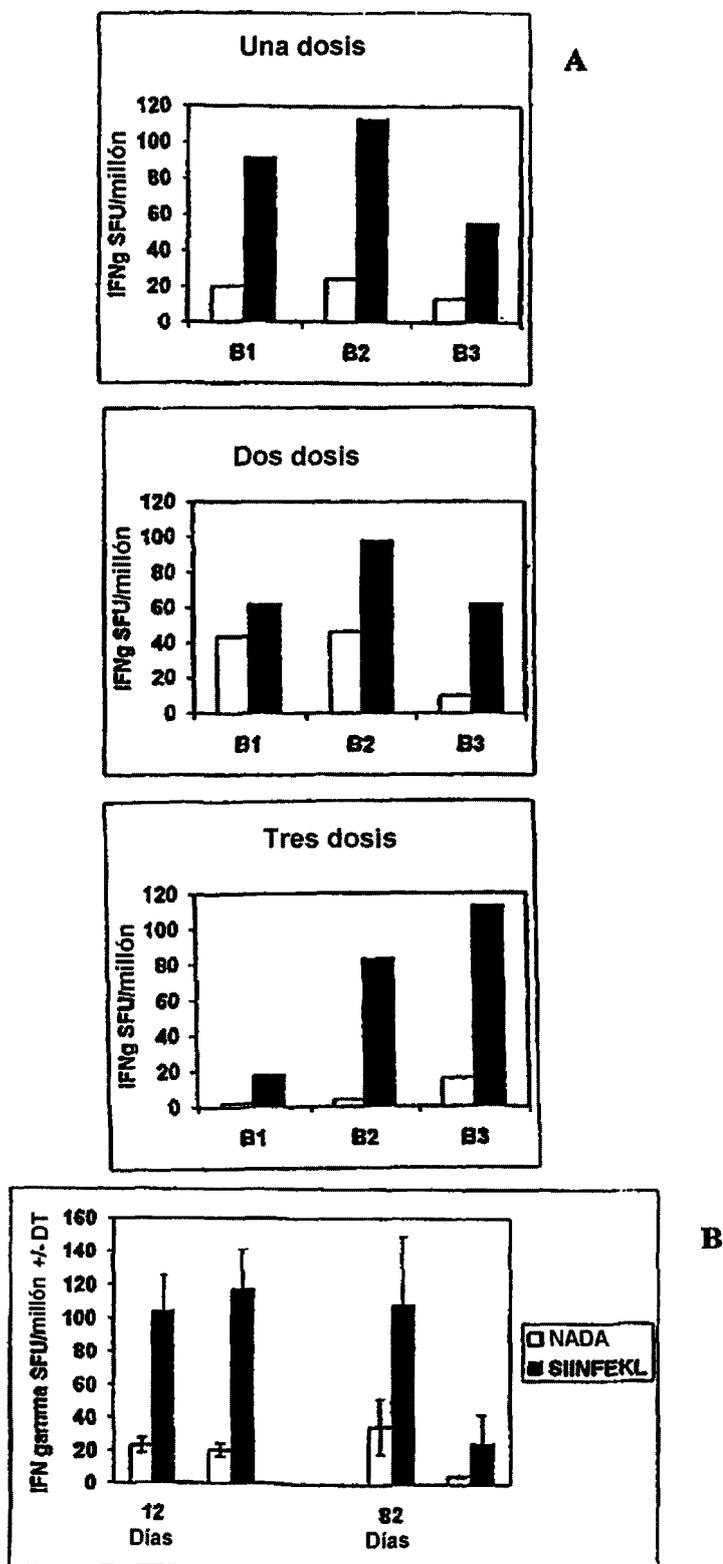


FIGURA 5

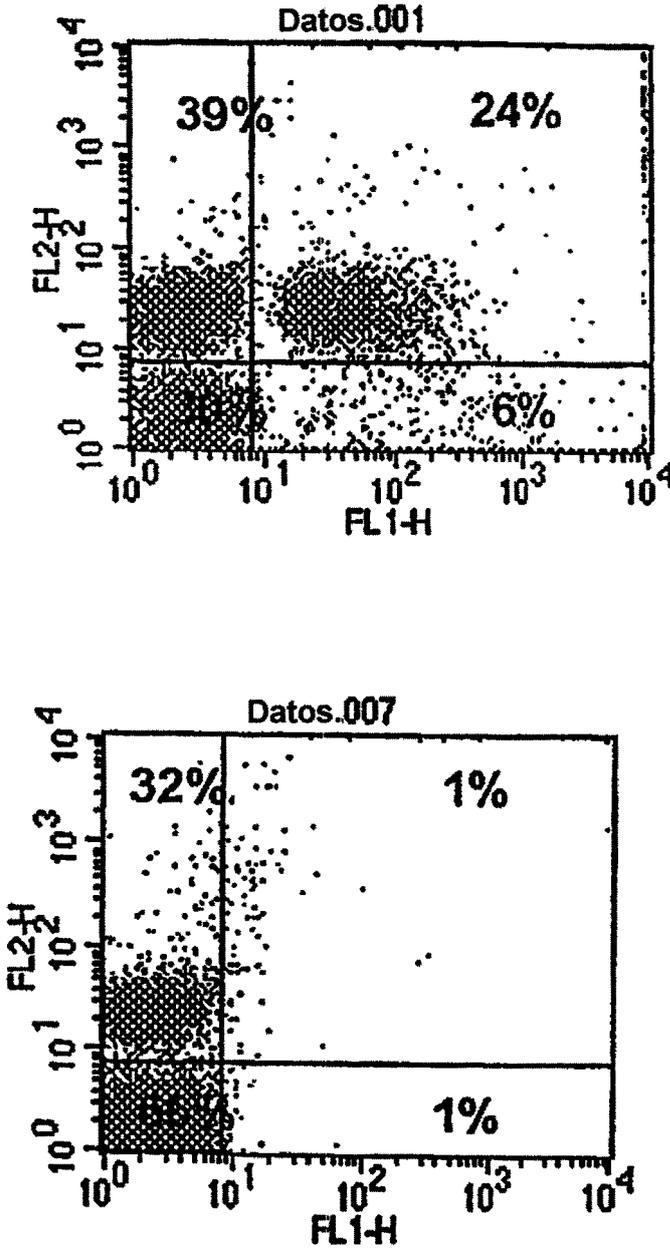


FIGURA 6

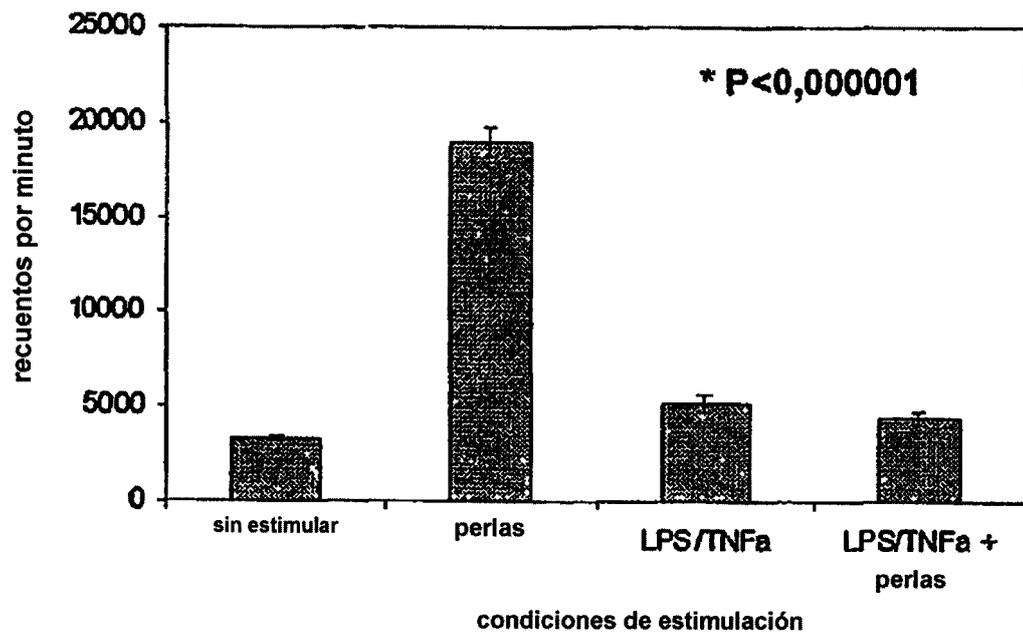


FIGURA 7

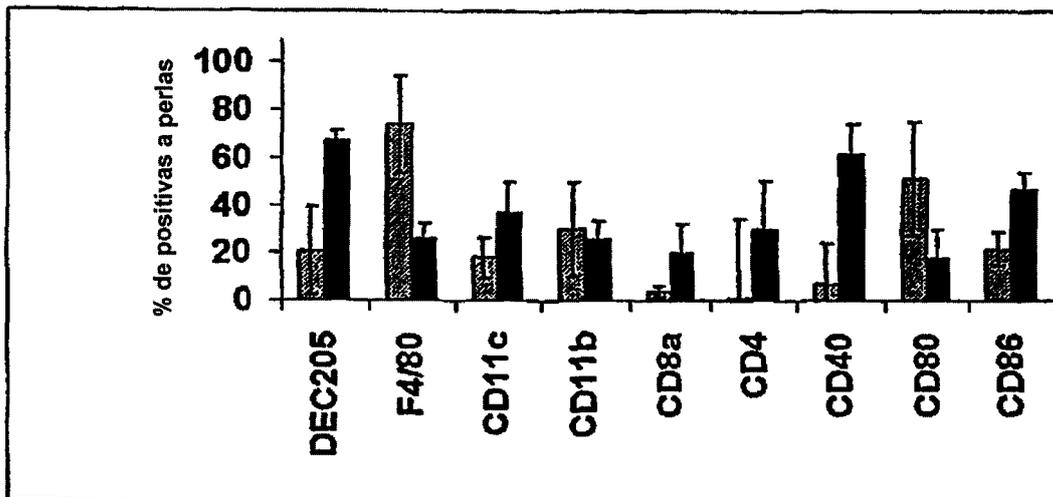


FIGURA 8A

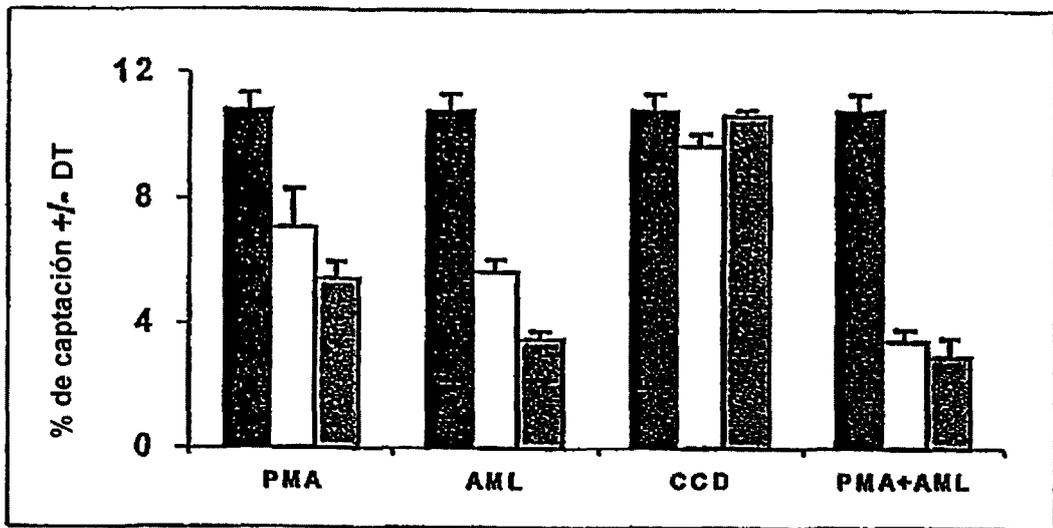


FIGURA 8B

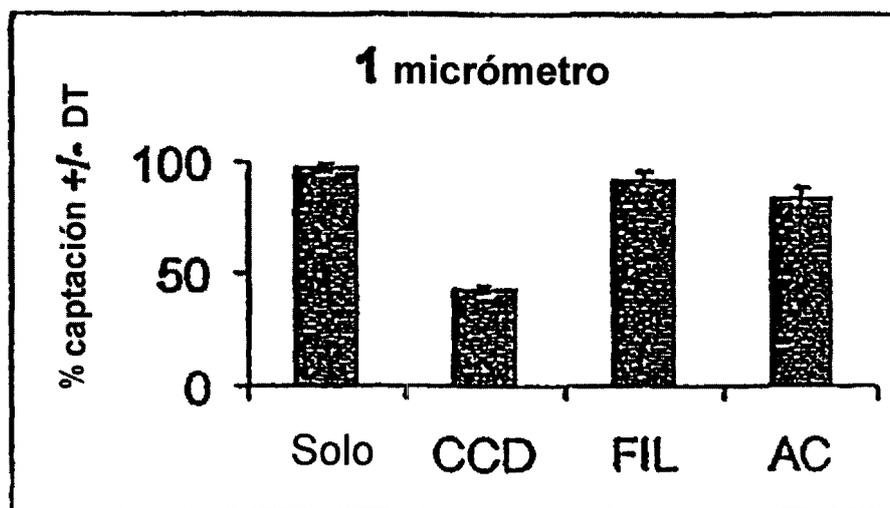
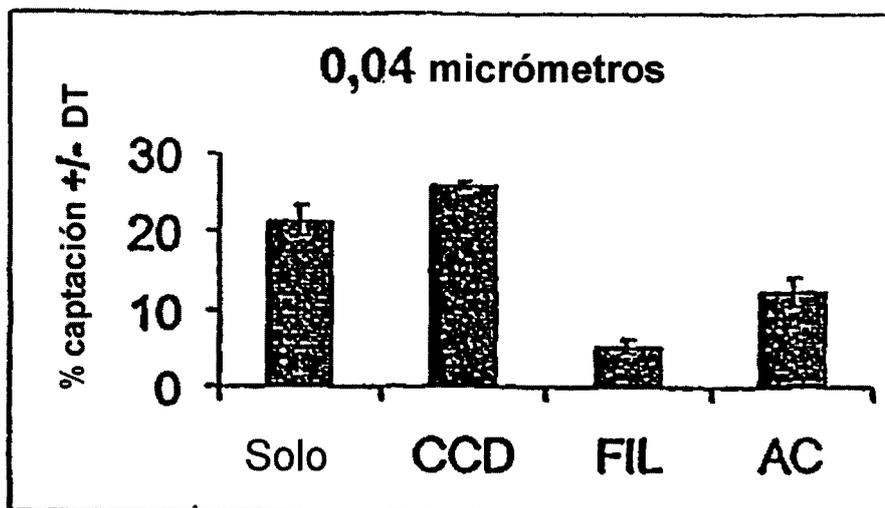


FIGURA 9

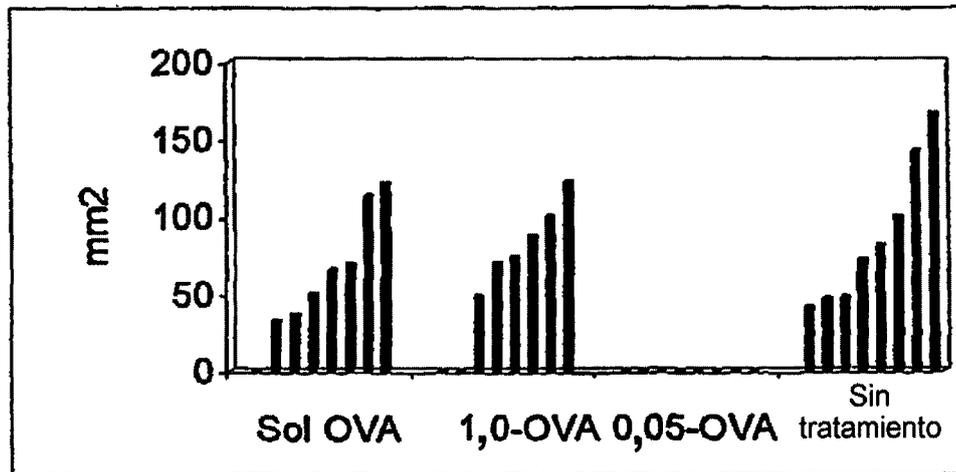


FIGURA 10

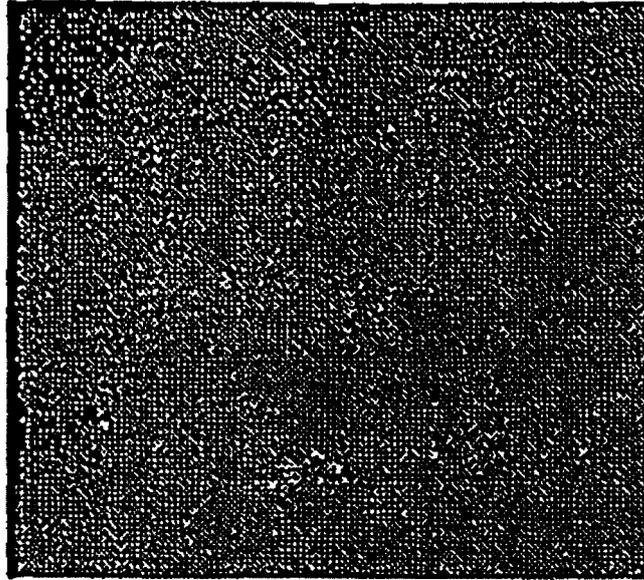


FIGURA 11

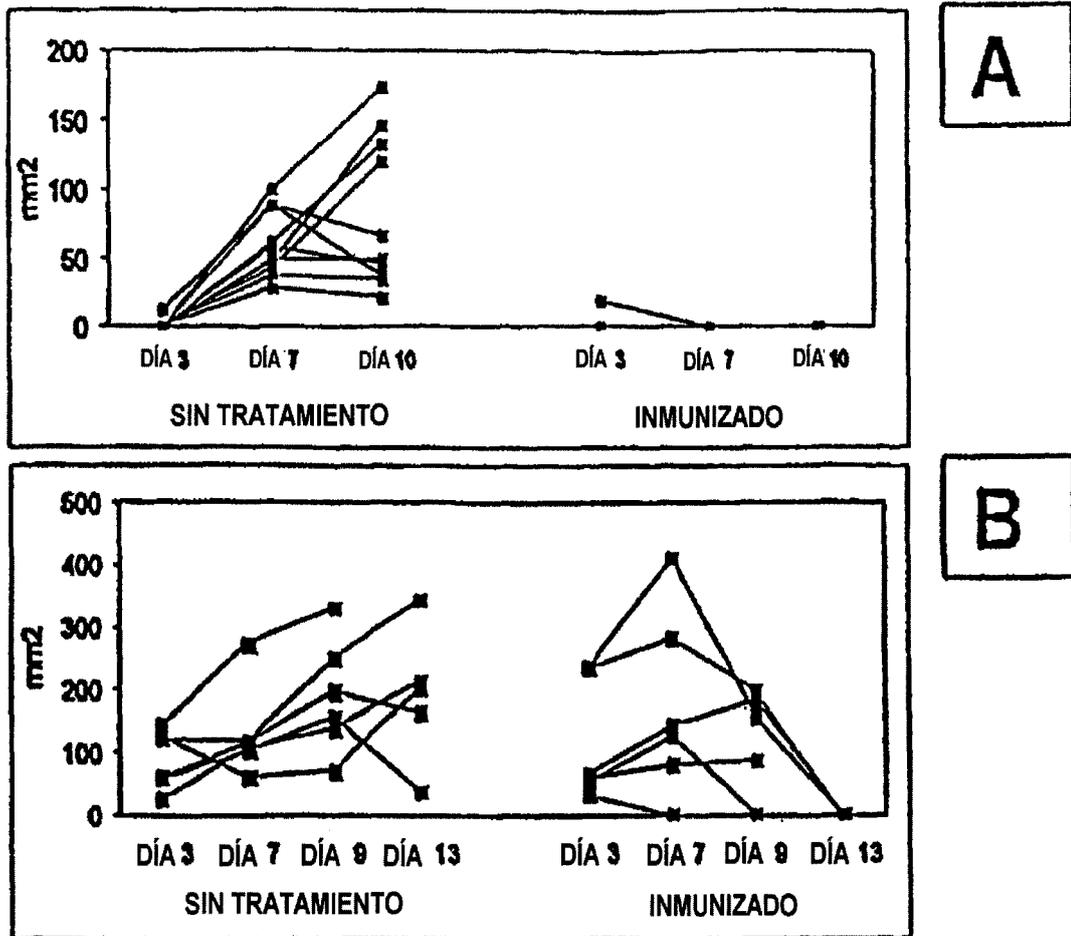


FIGURA 12

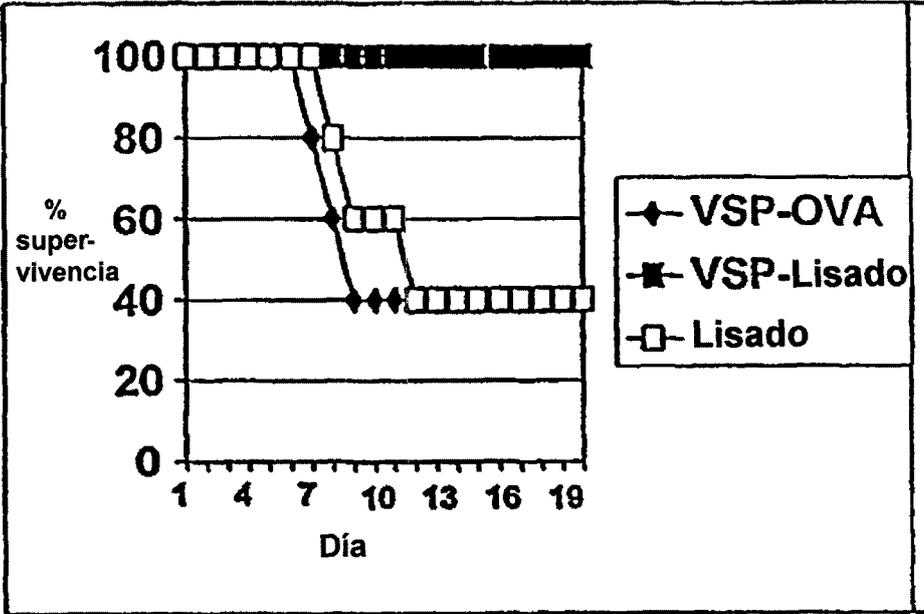


FIGURA 13

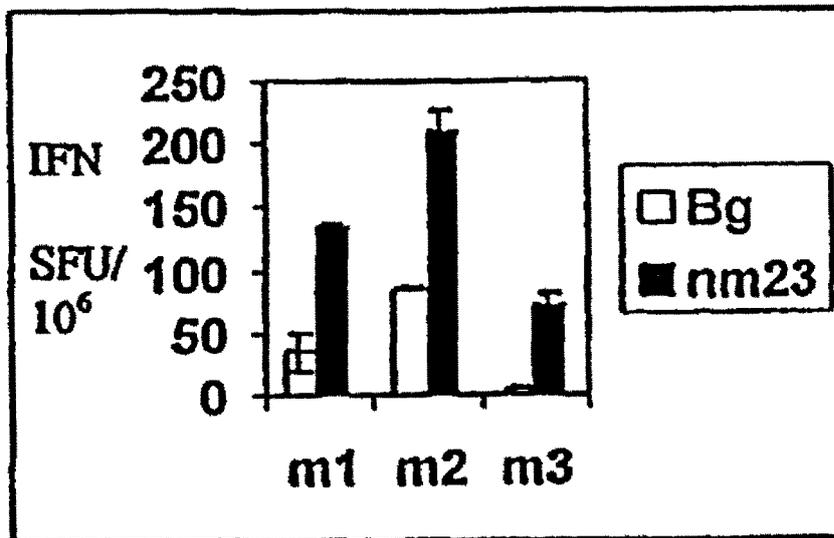


FIGURA 14

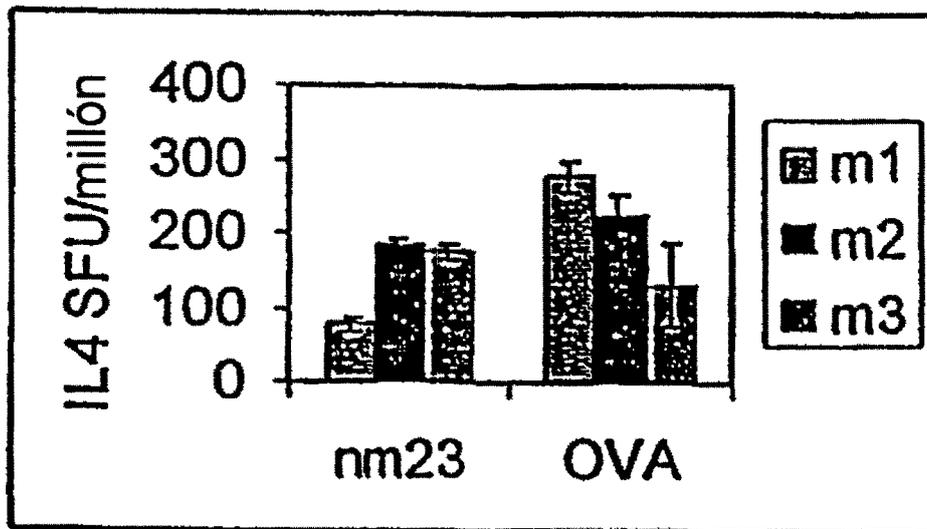


FIGURA 15A

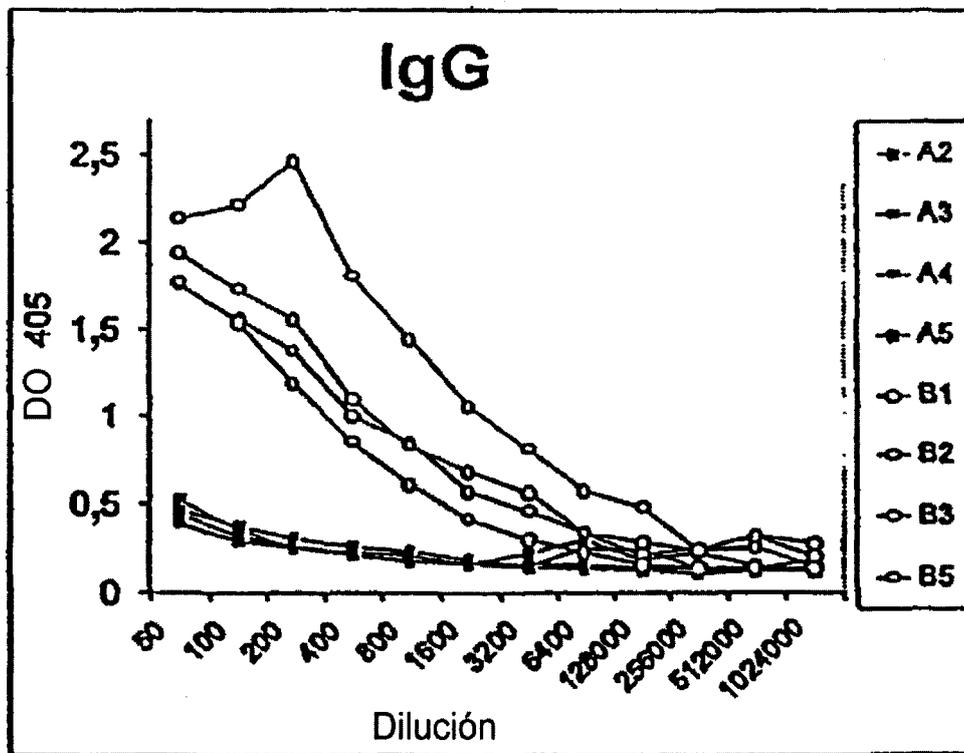


FIGURA 15B

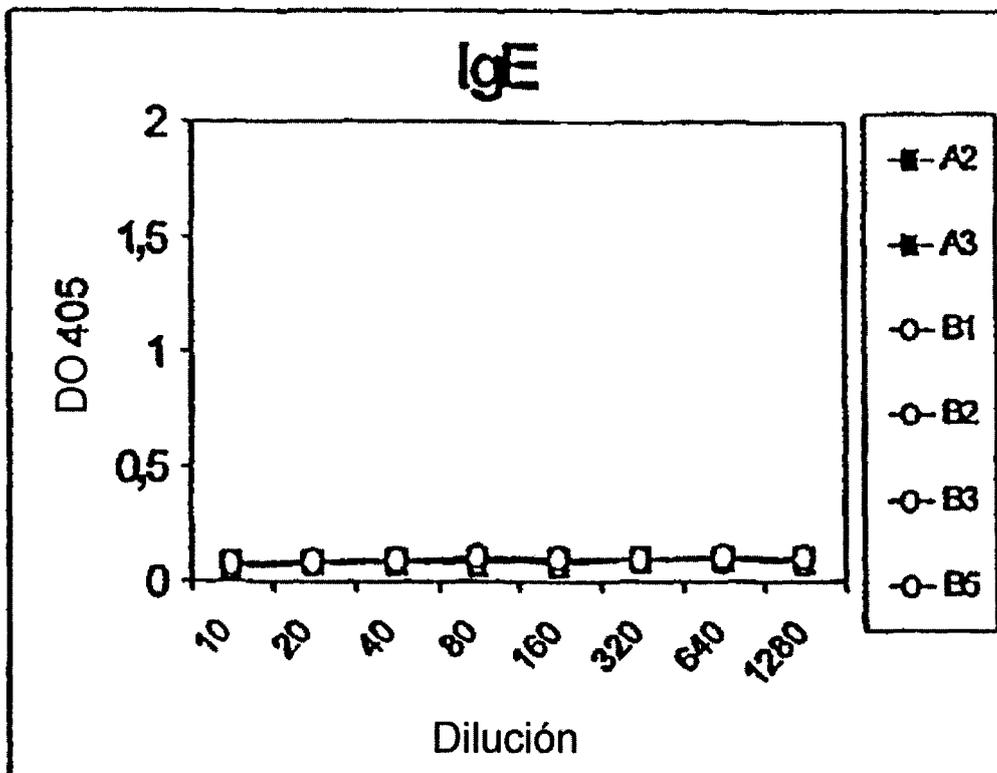


FIGURA 16

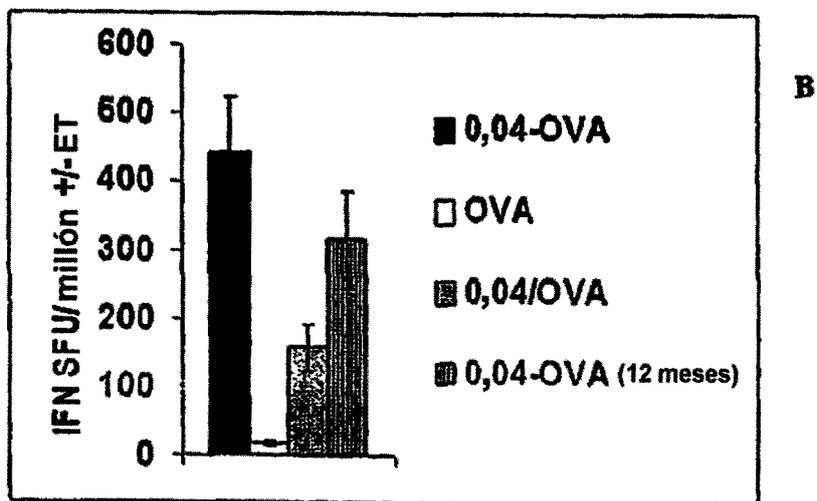
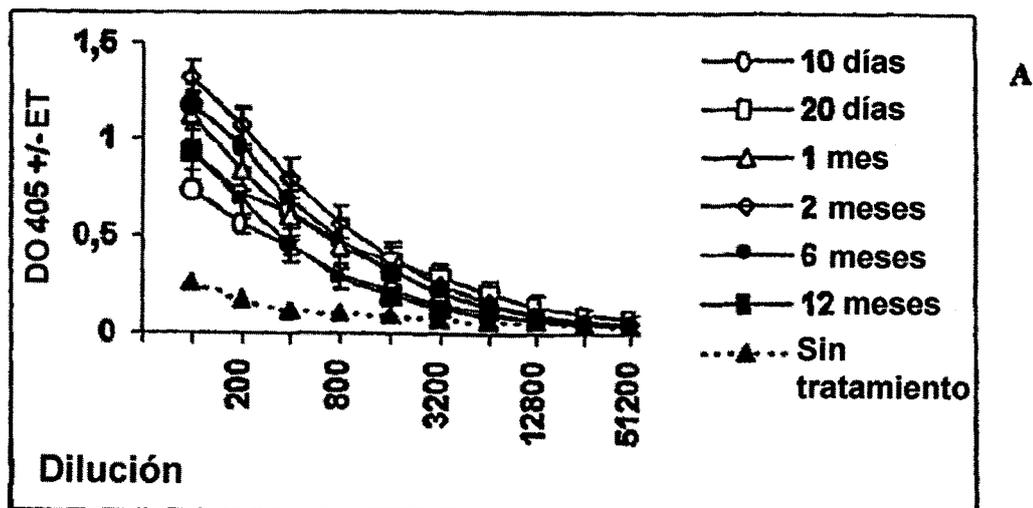


FIGURA 17

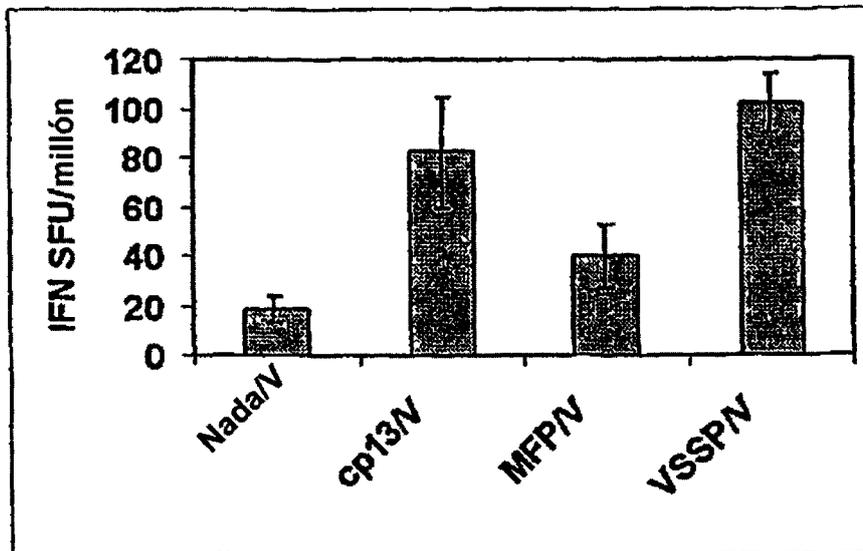


FIGURA 18

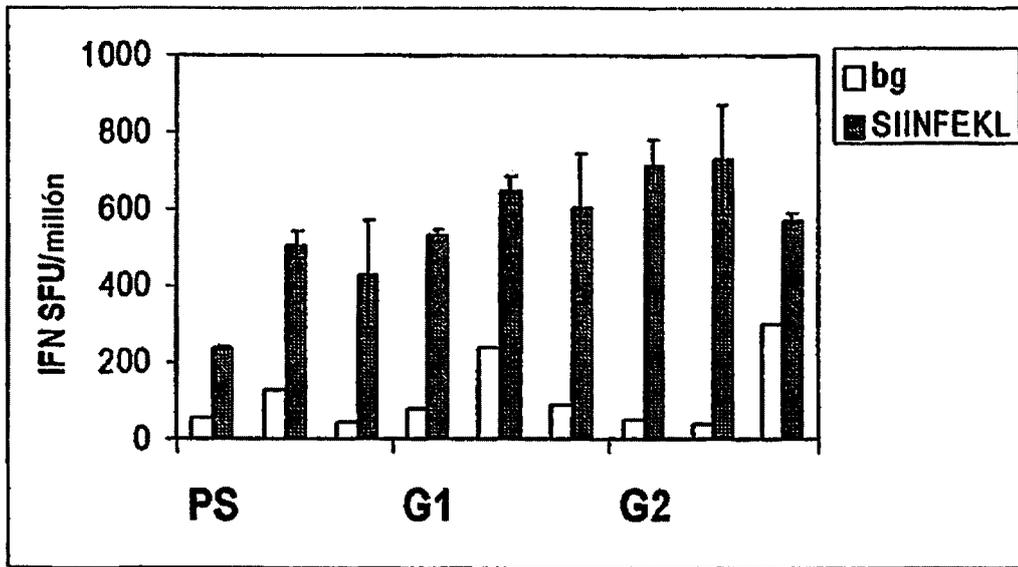


FIGURA 19

