

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 851**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2011 E 11743950 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2591802**

54 Título: **Composiciones vacunales a base de sticholisina encapsuladas en liposomas**

30 Prioridad:

06.07.2010 WO PCT/CU2010/000144

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

11.07.2016

73 Titular/es:

**CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
(100.0%)
Calle 216 Esq. 15 Atabey, Playa
La Habana 12100, CU**

72 Inventor/es:

**FERNANDEZ MOLINA, LUIS ENRIQUE;
LANIO RUIZ, MARIA ELIANA;
LABORDE QUINTANA, RADY JUDITH;
CRUZ LEAL, YOELYS;
LUZARDO LORENZO, MARIA DEL CARMEN;
MESA PARDILLO, CIRCE;
ALVAREZ VALCARCEL, CARLOS MANUEL;
PAZOS SANTOS, ISABEL FABIOLA;
TEJUCA MARTINEZ, MAYRA;
VALLE GARAY, AISEL;
ALONSO BIOSCA, MARIA EUGENIA y
CANET SANTOS, LIEM**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 576 851 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

Composiciones vacunales a base de sticholisina encapsuladas en liposomas

Campo técnico:

5 La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología aplicada a la salud humana. De modo particular, la presente invención se refiere a un vehículo vacunal para uso tanto subcutáneo como intramuscular a base de liposomas, que contienen sticholisina y que mejoran las respuestas inmunes celulares, específicas a antígenos, lo cual es útil en inmunoterapia del cáncer y en el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos intracelulares.

Técnica anterior

Desde hace tiempo se conoce la capacidad inmunoadyuvante de las vesículas liposomales.

10 La racionalidad que existe en el uso de liposomas en inmunizaciones y en el diseño de vacunas se basa en su capacidad para liberar la molécula antigénica en las células que presentan antígeno (APC) y para estimular una respuesta inmune. Las ventajas más importantes de los liposomas como inmunoadyuvantes se resumen en: (i) la capacidad de imitar patógenos que transportan grandes cantidades de antígeno a las APC, (ii) la posibilidad de co-encapsular antígenos con moléculas inmuno-estimuladoras, (iii) la flexibilidad de modificar sus propiedades físico-químicas para el propósito de una mayor efectividad, y (iv) el hecho de ser biodegradables y no tóxicas (Leserman en *Journal of Liposome Research*, 2004, 14 (3 & 4); 175-189).

20 Un reto en el campo de la vacunología es el aumento de respuesta inmune celular, mediada por linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL), específicos de antígeno, con relevancia para la prevención y el tratamiento de enfermedades inducidas por patógenos intracelulares y células tumorales. Las vesículas liposomales pueden potenciar una respuesta de CTL pero no siempre de manera efectiva.

25 Han sido diseñadas diferentes estrategias con base en vesículas liposomales con la intención de modernizar esta función; los ejemplos son liposomas ácidos, sensibles al pH, liposomas catiónicos, la inclusión de inmuno-moduladores tales como CpG y toxinas formadoras de poros de origen bacteriano. A pesar de la diversidad de publicaciones, algunas de estas estrategias han tenido éxito limitado en la inducción de respuestas inmunes celulares efectivas o son desventajosas y, por lo tanto, requieren un mejor diseño antes de implementación.

30 La integración de proteínas de membrana viral en la membrana liposomal a fin de promover la fusión de membrana en condiciones de pH ácido o de tratamiento proteolítico, ha sido otra alternativa para el desarrollo de vehículos vacunales. Estas vesículas conocidas como virosomas han sido usadas no solamente como vacunas del virus parental, sino que también han sido explotadas como vehículos para antígenos vacunales, enlazados o encapsulados al virosoma (Zurbriggen en *Vaccine*, 2003 14; 21(9-10):921-4). Las partículas virosomales, conocidas por las siglas IRIV (immunopotentiating reconstituted influenza virosomes o virosomas de influenza reconstituidas por inmunopotenciación), que contienen proteínas y lípidos de la envoltura del virus de influenza, son el mejor ejemplo de esta estrategia y forman la base de la patente de la vacuna contra la hepatitis A (patente de los Estados Unidos de América No. 5565203). Sin embargo, este preparado vacunal se diseñó para potenciar la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra la hepatitis A. La inmovilización del virus de hepatitis A desactivado y altamente puro en la membrana del virosoma favoreció el tratamiento y la presentación de péptidos derivados por la ruta clásica MHCII, como resultado del procedimiento de fusión de las membranas de virosoma y de endosoma en las APCs (Glück y Wälti en *Dev Biol (Basilea)*, 2000, 103,189-97). La evidencia descrita sugiere que la asociación física de antígeno-virosomas es importante en el inmuno-adyuvante (Zurbriggen et al., *Progr., en Lipid Res.*, 2000, 39(1), 3-18; Amacker et al., in *Int Immunol.*, 2005, 17(6), 695-704).

40 Schumacher et al., en *Vaccine* 22:714-723, 2004, informaron que los IRIVs son capaces de potenciar respuestas inmunes mediadas por células. En particular, Schumacher et al. demostraron su actividad adyuvante en la inducción de CTL in vitro. Esta capacidad dependió principalmente de la estimulación de la reactividad de las células T CD4 + de manera específica para las proteínas virales.

45 Sin embargo, aunque el uso de virosomas como adyuvantes tiene muchas ventajas tales como baja toxicidad y alta inmunogenicidad, uno de los problemas en la tecnología virosomal actual es la ausencia de procedimientos para el encapsulamiento eficiente de solutos, tales como proteínas, que se requieren para la inducción de una respuesta CTL. Una concentración de lípido a la cual se producen virosomas (1 mM de lípido, aproximadamente), y considerando su diámetro (aproximadamente 200 nm), de menos de 1% de la fase acuosa, se encapsula dentro de los virosomas (Schoen et al., en *J. Liposome Res.*, 3: 767-792, 1993). Estas características reducen significativamente la eficiencia de virosomas para liberar antígenos o genes hacia las células.

50 Una estrategia para superar esta limitación y para producir un preparado inmunogénico para células T CD8 +, recientemente publicada en la solicitud de patente estadounidense número 20100015214, se basa en una combinación de virosomas vacíos con vehículos, preferiblemente liposomas, que encapsulan antígenos. U.S. 20100015214 divulga un

efecto trans-adyuvante de virosomas, aunque estas partículas y los liposomas no exhiben una interacción física entre ellos.

En el artículo de Lanio. et al., publicado en *J Liposome Res.*, 2008, 18(1), 1-19, se describe para el rhEGF una eficiencia superior de encapsulamiento-retención de liposoma que se obtiene mediante el procedimiento de deshidratación-rehidratación (DRVs) y comprende fosfatidilcolina (PC) saturada (dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y colesterol (Cho) en una proporción molar de 1:1 en comparación con aquellos que contienen PC insaturada y Cho. En realidad, el procedimiento para obtener DRVs produce vesículas de bi-capas múltiples con una alta eficiencia de encapsulamiento/retención para una amplia variedad de solutos solubles. Lanio et al. demostraron las propiedades inmuno-adyuvantes de estas vesículas para potenciar una respuesta de anticuerpo, de manera cuantitativa y cualitativa superior contra rhEGF.

La reseña publicada por Alvarez et al, en *Toxicon*, 2009, 54(8):1135-47, recopila las características estructurales y funcionales de dos proteínas producidas por un invertebrado marino, La anémona del mar Caribe *Stichodactyla helianthus*, que los autores llamaron *Sticholisinas* (Sts) I y II (StI/II). Estas proteínas son toxinas formadoras de poros (PFTs) que pertenecen a la familia de proteínas Actinoporins, clase única de PFTs de origen eucariota encontrada exclusivamente en anémonas marinas. Similares a otros miembros de esta familia, las Sts son proteínas básicas con un punto isoeléctrico alto (>9.5), con una masa molecular de aproximadamente 20 kDa, carentes de residuos de cisteína en su secuencia de aminoácidos y que exhibe una preferencia por membranas que contienen esfingomielina (SM). Las Sts se producen en forma soluble pero pueden asociarse fácilmente con diferentes sistemas de membranas celulares y de modelo, y forman poros con un diámetro de 2 nm, probablemente debido a la interacción de las hélices α del N-terminal proveniente de cuatro monómeros. Ambos eventos, la asociación y la formación de poro, dependen de las propiedades físico-químicas de las membranas.

En el artículo publicado en *Toxicon*, 2007, 49: 68-81, Martínez et al. informan sobre la relevancia de la presencia de SM y Cho para la asociación y formación de poros en las membranas por parte de StII. El estado de fase de la membrana influye la asociación de StII con estas estructuras. Según lo informado por Martínez et al., en la revista *Biology*, 2002, 16, 2: 85-93, esta toxina se asocia de modo reversible con membranas de DPPC y SM, con una capacidad muy baja de permeabilización.

Aunque se han informado ampliamente las propiedades inmuno-moduladoras de las toxinas formadoras de poros que provienen de bacterias para la inducción de una respuesta CTL específica de antígeno, usando diferentes estrategias que incluyen su encapsulamiento en liposomas, tal como se recopila en las reseñas de Dietrich et al. y Morón et al., en *TRENDS in Microbiology*, 2001, Vol.9 No.1, 23-28 y *TRENDS in Immunology*, 2004, Vol.25 No.2, 92-97, respectivamente, no se ha hecho ninguna referencia a las toxinas funcionalmente homólogas provenientes de organismos eucariotas marinos. Desde el punto de vista de sus aplicaciones en la inmuno-terapia de enfermedades tumorales, es deseable tener nuevas formulaciones vacunales capaces de inducir una respuesta inmune celular específica para antígenos y menos agresivas que aquellas composiciones que contienen toxinas bacterianas.

Breve descripción de la invención

De manera sorprendente, los autores de la presente invención han encontrado que cuando se administra un antígeno por vía subcutánea (sc) o intramuscular (im), encapsulado en la formulación vacunal Liposoma-St, con cualquiera de las variantes de toxinas descritas que incluyen aquellas que no presentan actividad formadora de poros o de lisis, se inducen porcentajes de lisis de las células diana muy superiores a las que se observan en el grupo de control positivo que usa ácido polinosinoico:policitidílico (poli I:C, PIC) el cual se considera en la técnica anterior el potenciador fundamental de la respuesta CTL, respuesta no modificada de los niveles de anticuerpo y mixta de Th1/Th2, inducida por el antígeno liposomal. Esto indica el potencial del sistema liposoma-St para generar una respuesta tanto celular como humoral contra un antígeno proteico lo cual es relevante para el uso de esta formulación para propósitos de vacunación.

El objeto de esta invención es un vehículo vacunal, tal como se describe en la reivindicación 1. Las preparaciones liposomales de DPPC y Cho en las cuales están los mutantes encapsulados de toxinas conocidas como Sts (por ejemplo, StIW111C y StIW111Cirrev) conjuntamente con el antígeno proteico, también son objeto de la presente invención.

En otro aspecto, las composiciones vacunales con base en este vehículo vacunal que contiene las toxinas conjuntamente con un antígeno administrado por vía sc o im para inducción de una fuerte respuesta de CTL específica de antígeno también son objeto de la presente invención.

Además, en la presente se describe el uso de las composiciones vacunales descritas con base en este vehículo vacunal que contiene las toxinas conjuntamente con un antígeno y se administra por vía sc o im para fortalecer la respuesta inmune de un paciente que sufre de una enfermedad seleccionada del grupo consistente en cáncer y enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares.

En la presente también se describe un método para tratar pacientes que requieren un refuerzo de su respuesta inmune, en cuyo caso el paciente sufre de una enfermedad seleccionada del grupo consistente en cáncer y enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares y el método comprende administrar por vía sc o im las composiciones

vacunales con base en este vehículo vacunal que contiene las toxinas Sts o sus mutantes, conjuntamente con un antígeno relevante para la enfermedad.

5 En la presente también se describe la protección suministrada por composiciones vacunales de este tipo ante el reto con células tumorales que expresan el antígeno, por lo que se reduce el porcentaje de tumores y se incrementa la supervivencia de sujetos con tumores. Por lo tanto, en la presente también se describe un método profiláctico ante el inicio de enfermedad relacionada con el antígeno.

Descripción detallada de la invención

10 El vehículo vacunal de la invención se basa en dispersiones acuosas de liposomas DRV de DPPC:Cho en una proporción molar de 1:1 que encapsulan St conjuntamente con el antígeno y eventualmente pueden contener otros co-solventes miscibles con agua, no tóxicos, no irritantes y que no causan desestabilización de las vesículas, tales como aquellos usados comúnmente en composiciones farmacéuticas inyectables, por ejemplo azúcar, polietilenglicol, etcétera.

15 Los preparados liposomales de la presente invención se obtienen mediante un procedimiento de deshidratación-rehidratación y están compuestos por DPPC y Cho en una proporción molar de 1:1 y co-encapsulan un antígeno con algunas de las variantes de Sts o sus mutantes reversiblemente inactivos, en cuyo caso dichas composiciones vacunales son capaces de promover una respuesta inmune CTL específica de antígeno y protectora contra el reto con células tumorales.

20 En una modalidad de la invención, la composición vacunal contiene como antígeno la proteína OVA, pero en tal caso el antígeno puede ser cualquier proteína o polipéptido, asociados con una enfermedad para la cual, desde un punto de vista terapéutico, es relevante inducir una respuesta inmune CTL específica contra este antígeno proteico. Por ejemplo, el antígeno puede ser una proteína o polipéptido asociados con cáncer, una proteína o polipéptido asociados con SIDA o una proteína o polipéptido asociados con tuberculosis.

25 Los liposomas descritos en la presente se obtienen mediante tecnología de deshidratación-rehidratación informada por Kirby y Gregoriadis en *Biotechnology*, 1984, 2, 979-984; estos son vesículas con una fase acuosa interna rodeada por varias bi-capas lipídicas, caracterizadas por alta eficiencia de encapsulamiento y retención de moléculas lábiles tales como proteínas de antígeno e inmunomoduladoras. Las soluciones en cloroformo de DPPC y Cho en una proporción molar de 1:1 se evaporaron y se mantuvieron al vacío durante 30 minutos. Los lípidos se hidrataron con agua desionizada a una temperatura por encima de la temperatura de transición de fase (T_c) de DPPC ($T > 45^\circ\text{C}$). Las suspensiones resultantes de vesículas multi-lamelares (MLVs) se transformaron en SUV o LUV (por Small Unilamellar Vesicles o vesículas uni-lamelares pequeñas y por Large Unilamellar Vesicles o vesículas uni-lamelares grandes, respectivamente) mediante ultrasonido y ciclos de reposo o extrusión a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 30 100 nm. Las vesículas obtenidas se mezclaron con soluciones proteicas, siguiendo una proporción lípido: proteína de 16 - 64 μmol de lípidos: 1.8 - 7 nmol de antígeno y 0.5 - 2 nmol de St, y se liofilizaron durante 20-24 horas. La rehidratación se efectuó con agua desionizada y agitado durante 30 minutos a una temperatura de menos de 45°C . El material desencapsulado en liposomas se retiró mediante lavado con solución salina de fosfato con pH regulado (PBS) pH 7.4 (NaCl de 136 mmol/L, KH_2PO_4 de 1.47 mmol/L, Na_2HPO_4 de 9.55 mmol/L, KCl de 2.68 mmol/L) seguido de centrifugación a 35 1000 g durante 15 minutos. Tales preparados alcanzan una eficiencia de encapsulamiento para las diferentes variantes de Sts que se encuentra en un intervalo alrededor de 50% con retención de 70% después de un mes de almacenamiento a 4°C suspendidos en PBS.

40 Las toxinas de StI y StII se aíslan y se purifican a partir de la anémona marina *Stichodactyla helianthus*, usando el procedimiento descrito por Lanio et al. en *Toxicon*. 2001, 39, 187-94. La Sticholisina I (rStI) recombinante y rStI mutante, StI W111C, se obtienen de acuerdo con los procedimientos descritos por Pazos et al. en *Toxicon*, 2006, 48, 1083-1094 y Pentón et al. en *Protein Eng Des Sel*. 2011, 24, 485-493, respectivamente.

45 La concentración de Sts utilizada en el vehículo vacunal de la presente invención se encuentra en el intervalo de 0.25 a 1 μM co-encapsulada con antígeno en un intervalo de concentración de 1 - 3.5 μM en una suspensión liposomal con un intervalo de concentración total de lípidos de 16 a 64 mM.

Preferiblemente, el vehículo vacunal de la presente invención contiene una cantidad de Sts de 0.3 a 0.4 nmol co-encapsulada con 1 a 2 nmol de antígeno en una suspensión liposomal de 20 μm) de lípidos totales en un volumen de 200 μL .

50 El intervalo de dosis utilizado para las vacunas referidas en la presente invención, por vía sc o im, es de 1 - 2 nmol (50-100 mg) de antígeno.

Una característica clave de las composiciones vacunales de la invención es que carecen de adyuvantes inmunológicos distintos de aquellos descritos.

Como ya se ha explicado antes, del estado de la técnica se conoce que las toxinas bacterianas formadoras de poros, encapsuladas en vesículas liposomales, son capaces de potenciar una respuesta de CTL, pero se sabe que el uso de

composiciones vacunales a base de toxinas bacterianas tienen efectos adversos en los humanos; sin embargo, los autores de la presente invención han encontrado de manera inesperada que las toxinas no bacterianas son capaces de tener el mismo efecto inmuno-estimulante. Más aún, los autores de esta invención han logrado desacoplar la actividad formadora de poros de las toxinas de sus efectos estimulantes de la respuesta de CTL, lo cual ofrece grandes ventajas para uso clínico en humanos de este vehículo vacunal. Los resultados obtenidos usando las entidades moleculares StIW111C_{irrev} o StII desactivada por calor, co-encapsuladas con antígeno en liposomas, en el vehículo vacunal de la presente invención demuestra que no existe una dependencia absoluta entre el potenciamiento de una respuesta inmune de CTL específica de antígeno por las formulaciones de liposomas-St y la capacidad de estas proteínas de formar poros en membranas. La prueba de maduración de células dendríticas (DCs) aisladas de médula ósea de ratones C57BL/6 y expuestas a StII in vitro, muestra la capacidad de esta proteína no sólo en su variante activa, sino también en la desactivada por calor, de inducir la activación de CDs, de manera similar a la observada con LPS (control positivo) en condiciones similares.

La capacidad de Sts para formar poros en membranas fue evaluada ensayando la actividad hemolítica y permeabilidad de LUVs cargados de carboxifluoresceína (CF) tal como se describe por Martínez et al. en *Toxicon*, 2001, 39,1547-1560. Se ha mostrado que Sts no exhibe actividad permeabilizante cuando se analiza la permeabilización de vesículas liposomales de DPPC:Cho (1:1) que encapsulan CF, en comparación con lo observado en vesículas compuestas por yema de huevo y SM (1:1) (control positivo).

Se verificó que StIW111C mutante forma un dímero inactivo estabilizado por un enlace de disulfuro mediante un ensayo de actividad hemolítica y SDS-PAGE en presencia y en ausencia de 2-mercaptoetanol (2-ME) en calidad de agente reductor, tal como está descrito por Pentón et al. en *Protein Eng Des Sel*. 2011, 24, 485-493. La incapacidad de la estructura dimérica para formar poros en eritrocitos, como células modelo, fue resultado de su no asociación con membrana.

Se estableció un procedimiento para obtener una especie dimérica irreversible de StIW111C (StIW111C_{irrev}) con base en la reducción de StIW111C mediante incubación con 2-ME (0.1 mol/L), eliminación de agente reductor por filtración en una columna PD-10, e incubación inmediata de StIW111C_{monómero} con el reactivo homo-bifuncional bis (maleimida) hexano (BMH) en una proporción molar de StIW111C_{monómero}:BMH de 1:1 o 2:1 por 2 horas a 4 ° C. StIW111C_{irrev} se purificó mediante cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 75 HR 10/300 en presencia de un agente reductor. La obtención del dímero irreversible y su grado de pureza se verificaron mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción. El dímero reversible fue obtenido con 94% de pureza y solamente 6% contaminante del dímero reversible. La ausencia de actividad funcional se verificó mediante ensayos de actividad hemolítica.

La desactivación irreversible de StII se realizó mediante tratamiento térmico de acuerdo con el procedimiento descrito por Martínez et al. en *Toxicon*, 2001, 39,1547-1560 y la pérdida total de la capacidad para formar poros en la membrana fue verificado mediante ensayo de actividad hemolítica.

Las propiedades inmuno-moduladoras de las diferentes especies moleculares Sts en el sistema liposoma-St relacionadas con su capacidad de potenciar una respuesta inmune citotóxica específica de antígeno in vivo y una inmunidad antitumoral en un escenario preventivo, pueden medirse en el modelo experimental de la cepa de ratones C57BL/6 utilizando el antígeno OVA y la línea celular tumoral E.G7, un subclon de timoma EL-4 de murino (Kusmartsev y Gabrilovich, en *J Leukoc Biol.*, 2003, 74: 186-96), transfectedo con ADN complementario de OVA pAc-neo-OVA (Moore, et al. in *Cell*, 1988, 54: 777-85) y obtenidos de la "American Type Cultures Collection" (ATCC, VA).

Los autores de la presente invención también han encontrado que la inoculación preventiva con el vehículo vacunal liposomas-St que contiene antígeno induce protección antitumoral superior a la generada por liposomas que no contienen StII.

Estos resultados demuestran que el sistema liposoma-St es efectivo para inducir una respuesta antitumoral funcionalmente robusta y protectora cuando se usa un antígeno proteico sin la necesidad de otros adyuvantes. A su vez, el uso de este preparado en terapias combinadas puede potenciar aún más su efecto antitumoral.

En los siguientes ejemplos se incluyen detalles experimentales comparativos que permiten verificar la eficacia inmunológica de inducir una respuesta inmune citotóxica, específica de antígeno, in vivo, e inmunidad antitumoral en un escenario preventivo de las composiciones vacunales que son objeto de la invención con respecto a las otras formulaciones no liposomales y no contienen Sts.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Evaluación de citotoxicidad y respuesta CTL del vehículo vacunal usando StI o StII nativas y OVA como antígeno proteico.

El vehículo vacunal con base en liposomas fue preparado tal como se ha descrito previamente.

En vesículas DRVs compuestas por DPPC y Cho (proporción molar 1:1), OVA como antígeno modelo y Sts (StI o StII) se co-encapsuló en 10 μ mol de lípidos totales: 1.1 nmol de OVA y 0.3 nmol de St proporción molar en solución salina reguladora de pH de fosfato (PBS) pH 7.4. Después de este procedimiento se obtuvieron dos composiciones vacunales:

5 Composición vacunal A: liposomas DRVs de DPPC: Cho (60 μ mol de lípidos totales) que encapsulan 6.6 nmol (50 μ g) of OVA.

Composición vacunal B: liposomas DRVs de DPPC: Cho (60 μ mol de lípidos totales) que co-encapsulan 6.6 nmol (50 μ g) de OVA y 1.88 nmol de StI o StII.

Quince ratones hembras C57BL/6 con un peso corporal en el intervalo de 18-20 g fueron seleccionados y separados en grupos experimentales de tres animales cada uno.

10 El grupo 1 (control negativo) fue inoculado por vía sc los días 0, 12, 13 y 14, con 0.2 mL de solución salina con pH regulado con fosfato (PBS).

El grupo 2 (control positivo) fue inoculado por vía sc, el día 12, con 22.2 nmol (1 mg) de OVA y se mezcló con 100 μ g de ácido poliinosinoico- policitídílico (PIC), un ligando sintético TLR3 y un inductor clásico de respuesta CTL (Hamilton-Williams et al. in J. Immunol., 2005, 174: 1159-63), los días 13 y 14 los animales recibieron nuevamente 100 μ g de PIC.

15 El grupo 3 fue inoculado por vía sc los días 0 y 12, con 0.2 mL de composición vacunal A (equivalente a 1.1 nmol o 50 μ g de OVA).

El grupo 4 fue inoculado por vía subcutánea los días 0 y 12, con 0.2 mL de composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol o 50 mg of OVA y 0.3 nmol o 6.25 mg de StI).

20 El grupo 5 fue inoculado por vía sc los días 0 y 12, con 0.2 mL edición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol o 50 μ g de OVA y 0.3 nmol o 6,25 μ g de StII). El día 20 del experimento, se incubaron células de bazo de ratones C57BU6 sin inmunizar. Con dos concentraciones de diacetato carboxi-fluoresceína éster de succinimidilo (CFSE) (0.33 y 5 mmol/L, respectivamente); las células etiquetadas con la más alta intensidad de fluorescencia también se incubaron con 1 μ mol/L del péptido de OVA (257-SIINFEKL-264) inmunodominante en el contexto del haplootipo MHC I para la cepa de ratones C57BL/6. Después, ambas poblaciones de células etiquetadas se mezclaron 1:1 y los grupos experimentales 1-5 fueron inoculados por la vena de la cola con 30 $\times 10^6$ células de la mezcla en un volumen total de 0.2 mL. Los ratones fueron sacrificados después de 16 horas y se determinó la lisis (%) de las células diana en el ganglio inguinal linfático más cercano al sitio de inmunización mediante citometría de flujo (FACS).

25 La figura 1 muestra la citotoxicidad producida in vivo mediante inmunización de ratones con liposomas que co-encapsulan OVA y Sts. Los animales inmunizados con liposomas que co-encapsulan Sts (StI o StII) mostraron una respuesta citotóxica de linfocitos T CD8+ (CTL) específica a OVA estadísticamente más alta que el grupo de control positivo. Adicionalmente, los liposomas que solo contenían OVA también indujeron una respuesta CTL estadísticamente similar al control positivo clásico para este ensayo (PIC).

30 Ejemplo 2: Inducción de protección antitumoral del vehículo vacunal en el modelo de proteína OVA.

35 Se estudió la capacidad de las vacunas a base de liposomas para inducir protección antitumoral. Para este propósito se seleccionaron 60 ratones hembras C57BL/6 con un peso corporal en un intervalo entre 18-20 g y se separaron en 3 grupos de ensayo de 20 animales cada uno.

El grupo 1 (control negativo) fue inoculado por vía im, los días 0 y 12, con 0.2 mL de solución salina de fosfato reguladora de pH (PBS).

40 El grupo 2 fue inoculado por vía im, los días 0 y 12, con 0.2 mL de la composición vacunal A descrita en el ejemplo 1 (equivalente a 1.1 nmol o 50 μ g de OVA).

El grupo 3 fue inoculado por vía im, los días 0 y 12, con 0.2 mL de la composición vacunal B, descrita en el ejemplo 1 (equivalente a 1.1 nmol o 50 μ g de OVA y 0.3 nmol o 6.25 μ g de StII).

Todos los grupos 1 a 3 fueron retados el día 19 con 3 $\times 10^5$ células de la línea tumoral E.G7 por vía subcutánea (0.2 mL).

45 Los animales fueron individualizados desde el día 0 y se determinaron los siguientes parámetros tres veces por semana: volumen del tumor, tiempo a la progresión y supervivencia.

Los resultados obtenidos se describen a continuación:

Tiempo a la progresión

El tiempo a la progresión es un parámetro que caracteriza el tiempo transcurrido para cada animal desde el momento que se inocula el tumor hasta su aparición. Para los ratones que no habían desarrollado un tumor al final del experimento, se consideró que el tiempo a la progresión fue de 60 días. El impacto en la extensión del tiempo a la progresión es un parámetro altamente deseable para una vacuna contra el cáncer. Como puede observarse en la figura 2A, los animales del grupo 3, vacunados con la composición vacunal B de formulación descrita en el ejemplo 1 y objeto de la invención, mostraron los resultados más sobresalientes.

Supervivencia

Este parámetro evalúa la capacidad de la vacunación para incrementar el tiempo que los animales inmunizados viven después de haber sido retados con las células tumorales que expresan OVA (E.G7). Este parámetro se mide en días y tiene un carácter relativo puesto que se compara con la supervivencia de animales no tratados. A fin de demostrar el significado estadístico de las diferencias encontradas en resultados de supervivencia entre grupos, se utilizó el ensayo de Log-Rank.

La figura 2B muestra claramente que los animales del grupo 3, vacunados con la composición vacunal B descrita en el ejemplo 1 y objeto de la presente invención son aquellos que sobreviven más tiempo después de la inoculación del tumor.

Ejemplo 3: Actividad hemolítica de mutantes Sts.

La formación de poros en la membrana del eritrocito produce un choque coloide-osmótico que provoca la lisis de las células. La capacidad de formar poros de las llamadas porinas puede seguirse por su actividad hemolítica (HA) la cual puede determinarse experimentalmente midiendo la pérdida de absorbancia aparente ($\lambda = 600 \text{ nm}$) de una suspensión de eritrocitos debido a la lisis celular.

En el ensayo, la HA del dímero inactivo irreversiblemente de StIW111C (StI W111C_{irrev}) fue comparada con la del dímero reversible de StIW111C, en condiciones reductoras (2-ME 0.1 mol/l) y no reductoras, a una concentración de proteína relativamente alta en el ensayo (0.15 mmol/l), si se compara con la HA de StI/StII reportada por Álvarez et al. en Toxicon, 2009, 54(8):1135-47. Las cinéticas de hemólisis mostradas en la figura 3 indican que StIW111C_{irrev} estaba inactiva en condiciones no reductoras. En condiciones reductoras, StIW111C_{irrev} presentó menos actividad que StIW111C completamente reducido o no reducido.

Ejemplo 4: Evaluación de la capacidad formadora de poros de StII desactivada.

La pérdida de la capacidad para formar poros en membranas por StII irreversiblemente desactivada por calentamiento a 80 °C durante dos horas fue registrada usando el ensayo de actividad hemolítica. La figura 4 muestra la falta de actividad hemolítica para StII térmicamente desactivada al comparar con la proteína activa.

Ejemplo 5. Efecto del vehículo vacunal en la maduración de DCs.

La maduración de DCs inducida por StII fue evaluada en células obtenidas de la médula ósea de ratones C57BL/6 expuestos a StII activa (0.1 nmol o 2 μg) o desactivada mediante tratamiento térmico (4 μg) en presencia o no de 20 μg de polimixina B (pmxB, un agente neutralizante de actividad biológica de endotoxina mediante enlazamiento a la fracción de lípido A de LPS), durante 24 horas a 37 ° C en una cámara de CO₂ al 5%.

Como control positivo se usó LPS (2 μg) y el control negativo fue medio de RPMI más 30 pmxB. Las células extraídas de la médula ósea de los ratones se cultivó en un cantidad de 600 000 precursores de DCs en RPMI por pocillo usando placas de 6 pocillos. Se adicionó suero fetal bovino (BFS) al 10%, 400 μl de GMCSF y RPMI para completar 3mL por pocillo. La figura 5 muestra el incremento (%) en los marcadores moleculares (CD80, CD86 y CD40) indicadores de la activación de DCs como un resultado de la exposición de estas células in vitro a StII, tanto en su variante activa como desactivada térmicamente, y los resultados son comparables a aquellos obtenidos con el control positivo.

Ejemplo 6. Evaluación de citotoxicidad y respuesta CTL del vehículo vacunal usando mutantes de St y OVA como proteínas de antígeno.

Las variantes dimérica de StI de baja actividad reversible (StIW111C) o irreversible (StIW111C_{irrev}) para formar poros y la variante de StII térmicamente desactivada fueron co-encapsuladas con OVA en liposomas de DPPC: Cho (1:1), en una proporción de 10 μmol lípido total: OVA de 1.1 nmol: 0.3 nmol de StIW111C, StIW111C_{irrev} o StII desactivada térmicamente, en PBS de pH 7.4 y fue evaluada la capacidad de estos preparados vacunales para inducir una actividad citotóxica, específica de OVA. En estos ensayos, se utilizaron esencialmente las mismas composiciones vacunales que aquellas descritas en el ejemplo 1; en el caso de la composición B, fueron empleadas las diferentes variantes de St.

La composición vacunal A: liposomas de DRVs de DPPC:Cho (60 μmol de lípidos totales) que encapsulan 6.6 nmol de OVA.

La composición vacunal B: liposomas de DRVs de DPPC:Cho (60 μ mol de lípidos totales) que co-encapsulan 6.6 nmol de OVA y 1.875 nmol de St (StIW111C, StIW111C_{irrev}, St II nativa o StII desactivada térmicamente)

En un primer ensayo se seleccionaron 12 ratones hembras C57BL/6 con un peso corporal entre 18-20 g y se separaron en 4 grupos experimentales de tres animales cada uno.

5 El grupo 1 (control negativo) fue inoculado por vía subcutánea los días 0 y 12, con 0.2 mL de PBS.

El grupo 2 (control positivo) fue inoculado por vía subcutánea los días 0 y 12, con 0.2 mL de la composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol o 50 μ g de OVA y 0.3 nmol o 6.25 μ g de StII nativa).

El grupo 3 fue inoculado por vía subcutánea, los días 0 y 12 con 0.2 mL de la composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol o 50 μ g de OVA y 0.3 nmol o 6.25 μ g de StIW111C).

10 El grupo 4 fue inoculado por vía subcutánea los días 0 y 12 con 0.2 mL de la composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol o 50 μ g de OVA y 0.3 nmol o 6.25 μ g de StIW111C_{irrev}).

La figura 6A muestra que los animales inmunizados con liposomas, que contienen variantes de St de baja actividad formadora de poros (LP/OVA+StIW111C o LP/OVA+StIW111C_{irrev}) exhiben una respuesta citotóxica estadísticamente similar a la obtenida con StII cuando está co-encapsulada con OVA en liposomas (LP/OVA+StII).

15 En otro ensayo, se seleccionaron nueve ratones hembras C57BL/6 con un peso corporal entre 18-20 g y se separaron en 3 grupos de 3 animales cada uno.

El grupo 1 (control negativo) fue inoculado por vía subcutánea los días 0 y 12 con 0.2 mL de regulador de pH de solución salina de fosfato (PBS).

20 El grupo 2 fue inoculado por vía subcutánea los días 0 y 12 con 0.2 mL de composición vacunal A (equivalente a 1.1 nmol o 50 μ g de OVA).

El grupo 3 fue inoculado por vía subcutánea los días 0 y 12 con 0.2 mL de composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol o 50 μ g de OVA y 0.3 nmol o 6.25 μ g de StII inactiva).

25 La figura 6B evidencia que la inmunización con liposomas que co-encapsulan OVA y la variante de StII desactivada térmicamente de manera completa generó una actividad citotóxica específica de OVA significativamente más alta que la inducida por liposomas que contenían solamente el antígeno y similar a la observada con la formulación liposomal que contenía StI/StII nativa.

30 Los resultados experimentales demostraron que la vacuna liposomal, objeto de esta invención, que co-encapsula un antígeno con cualquier variante de sticholisina, incluso con aquellas que no presentan actividad formadora de poros, indujo una respuesta CTL específica de antígeno, potente, robusta y funcional, incluso mayor que la obtenida mediante el control positivo clásico (PIC) usado en un ensayo de CTL in vivo. La formulación liposomal-St en un escenario preventivo incrementó significativamente la cinética de implantación tumoral e incrementó significativamente la supervivencia de los grupos evaluados en relación con aquellos que recibieron solamente PBS. En resumen, la vacunación con liposomas-St exhibió mejores resultados que aquellos observados con vesículas liposomales que contenían solamente el antígeno.

Descripción breve de las figuras

35 La figura 1 representa una gráfica que muestra el porcentaje de lisis de las células diana cargadas con el péptido inmunodominante de OVA (SIINFEKL) y etiquetadas con CFSE en animales experimentales sometidos a diferentes tratamientos vacunales en un ensayo de citotoxicidad in vivo y la línea al valor medio de al menos dos experimentos independientes. Las diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre grupos inmunizados de acuerdo con el ensayo de Dunnett T3 ($p < 0.05$).

40 La figura 2A representa el porcentaje de animales libres de tumor en tres grupos de animales experimentales sometidos a diferentes tratamientos vacunales y retados con células tumorales que expresan OVA.

La figura 2B: representa una gráfica que permite visualizar el parámetro de supervivencia en los tres grupos mencionados después de inocular células tumorales que expresan OVA. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con el ensayo de Log-Rank ($p < 0.05$).

45 La figura 3 muestra variación en turbidez de una suspensión de eritrocitos debido a la acción de variantes diméricas de StI (StIW111C o StIW111C_{irrev}) en condiciones de reducción (en presencia de 2-ME) y no reducción.

La figura 4 representa pérdida de turbidez de una suspensión de eritrocitos debido a la actividad de StII nativa (proteína activa) o desactivada por tratamiento térmico.

La figura 5 muestra cambios en la expresión de marcadores moleculares de células dendríticas (DCs) debido a su exposición in vitro a StII tanto en su variante activa como en su variante desactivada térmicamente en presencia o ausencia de un agente de neutralización de endotoxina (pmxB).

Gráfica A: Porcentaje de CD80

5 Gráfica B: Porcentaje de CD86

Gráfica C: Porcentaje de CD40

10 La figura 6 representa dos gráficas que muestran porcentajes de lisis de las células diana cargadas con péptido inmuno dominante de OVA (SIINFEKL) y etiquetadas con CFSE en animales experimentales sometidos a diferentes tratamientos vacunales en un ensayo de citotoxicidad in vivo. Cada punto corresponde a datos de un animal individual y la línea corresponde al valor medio. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos inmunizados de acuerdo con el ensayo de Tukey ($p < 0.05$).

Gráfica A: Respuesta obtenida después de inmunizar con liposomas que co-encapsulan OVA, StII nativa o variantes diméricas de StI inactiva reversiblemente (StIW111C) o irreversiblemente (StIW111Cirrev).

15 Gráfica B: Respuesta obtenida después de inmunizar con liposomas que co-encapsulan OVA y StII desactivada mediante tratamiento térmico.

Reivindicaciones

1. Un vehículo vacunal que comprende un co-encapsulamiento en vesículas liposomales de proteínas obtenidas de la anémona *Stichodactyla helianthus* conjuntamente con un antígeno, en cuyo caso las proteínas son Sticholisinas, y el vehículo vacunal induce una respuesta inmune celular.
- 5 2. El vehículo vacunal de acuerdo con la reivindicación 1, en cuyo caso el vehículo liposomal contiene dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y Cho en una proporción equimolar.
3. El vehículo vacunal de acuerdo con la reivindicación 1, en cuyo caso las proteínas de la anémona *Stichodactyla helianthus* se seleccionan del grupo que comprende Sticholisina II (StII), Sticholisina I (StI), Sticholisina I mutante W111C (StIW111C), StIW111C dímero inactivo irreversiblemente (StIW111C_{irrev}) o StII desactivada térmicamente.
- 10 4. El vehículo vacunal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el cual el antígeno es una proteína o un polipéptido, asociados con una patología seleccionada del grupo que comprende cáncer y enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares.
5. El vehículo vacunal de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual el antígeno es una proteína o polipéptido, asociados con cáncer.
- 15 6. El vehículo vacunal de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual el antígeno es una proteína o un polipéptido, asociados con SIDA.
7. El vehículo vacunal de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual el antígeno es una proteína o un polipéptido, asociados con tuberculosis.
- 20 8. Una composición vacunal que comprende el vehículo vacunal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y dicha composición carece de otros adyuvantes inmunológicos.
9. El vehículo vacunal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para usar en la inducción de una respuesta inmune celular.
- 25 10. La composición vacunal de acuerdo con la reivindicación 8, para usar en el potenciamiento de la respuesta inmune de un paciente que sufre de una enfermedad seleccionada del grupo que comprende cáncer y enfermedades infecciosas, causadas por patógenos intracelulares.

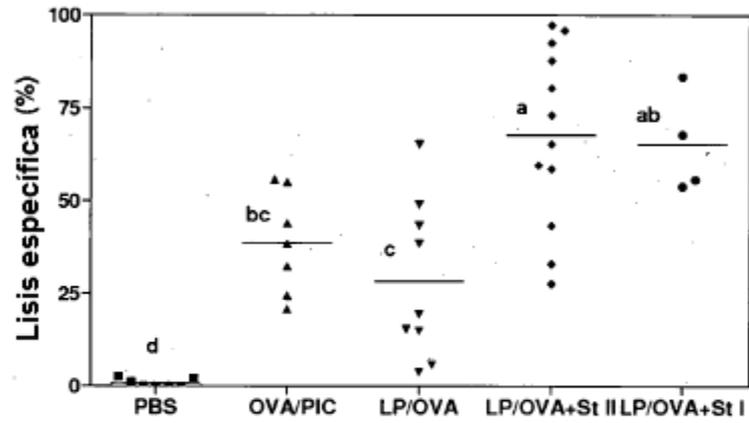


Figura 1

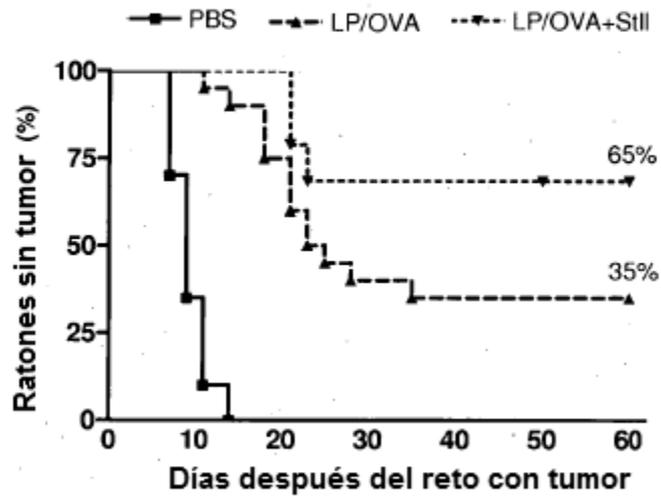


Figura 2A

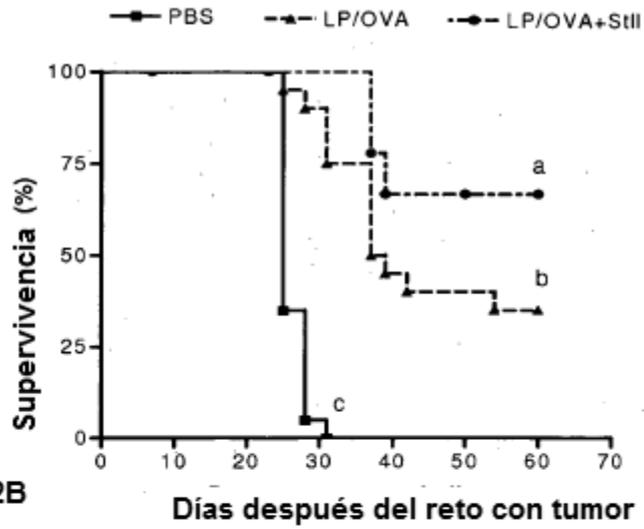


Figura 2B

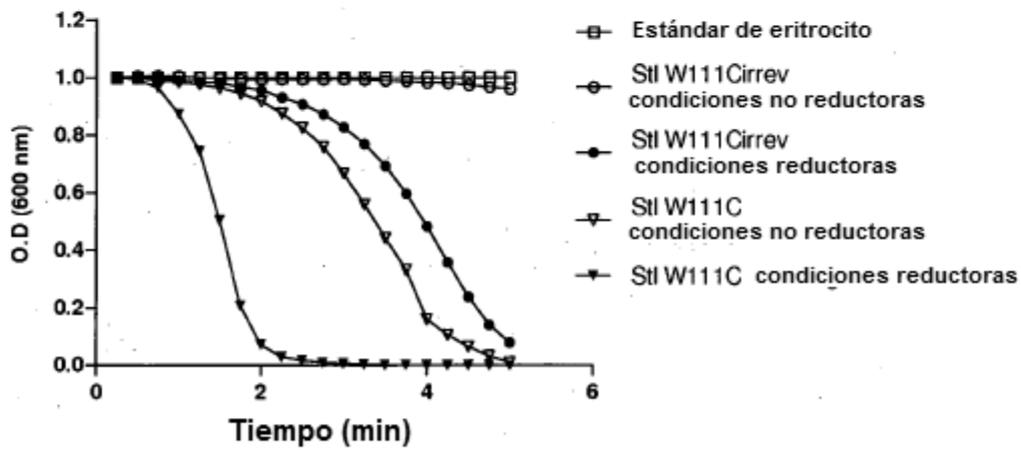


Figura 3

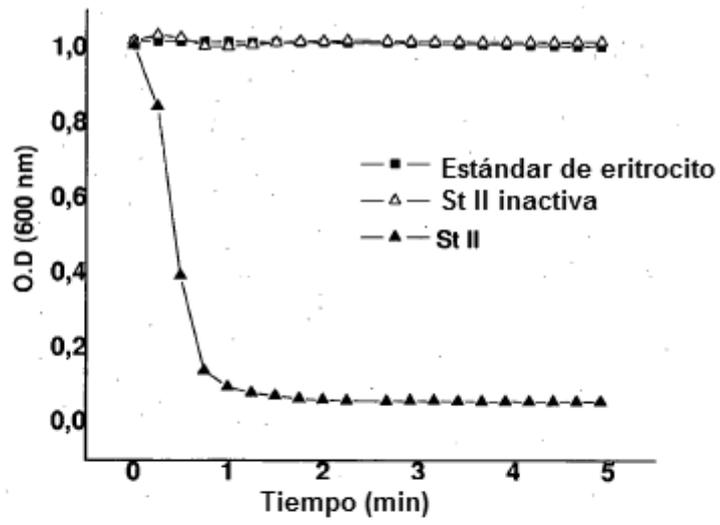


Figura 4

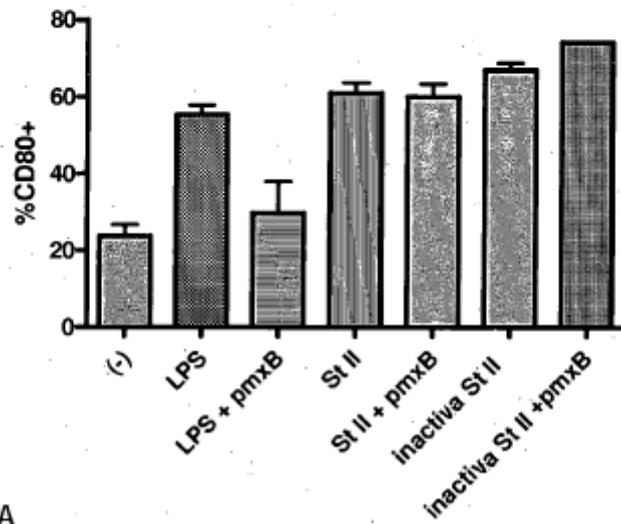


Figura 5A

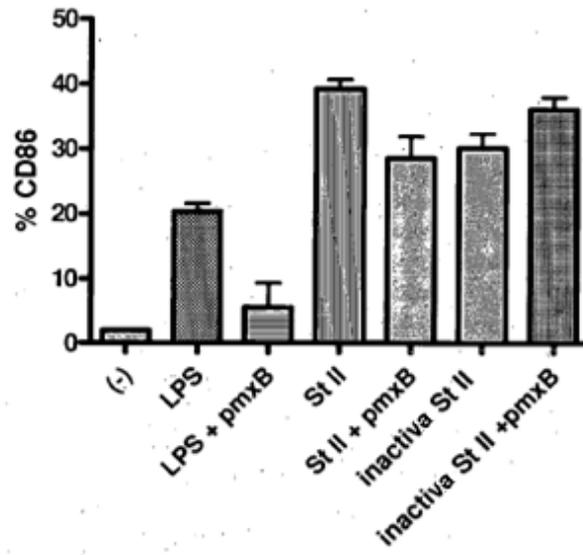


Figura 5B

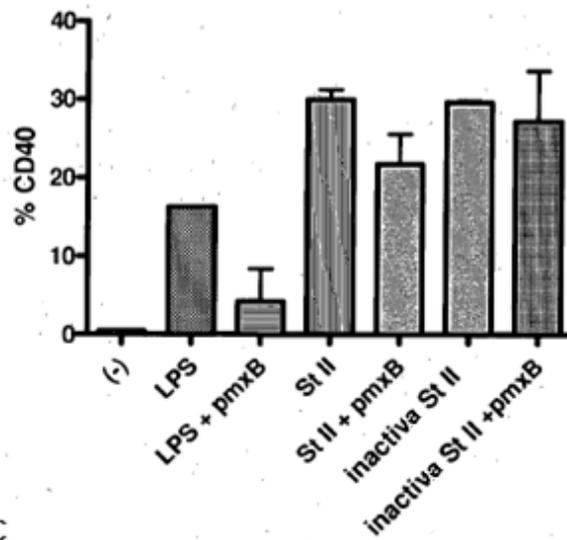


Figura 5C

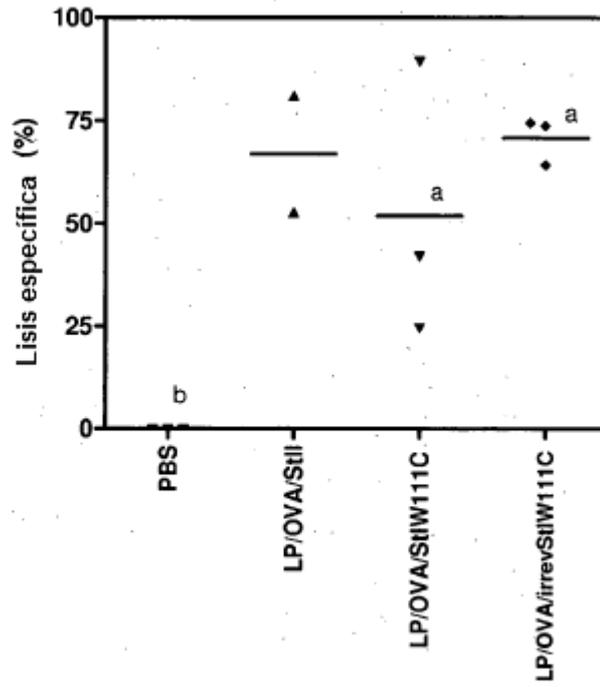


Figura 6A

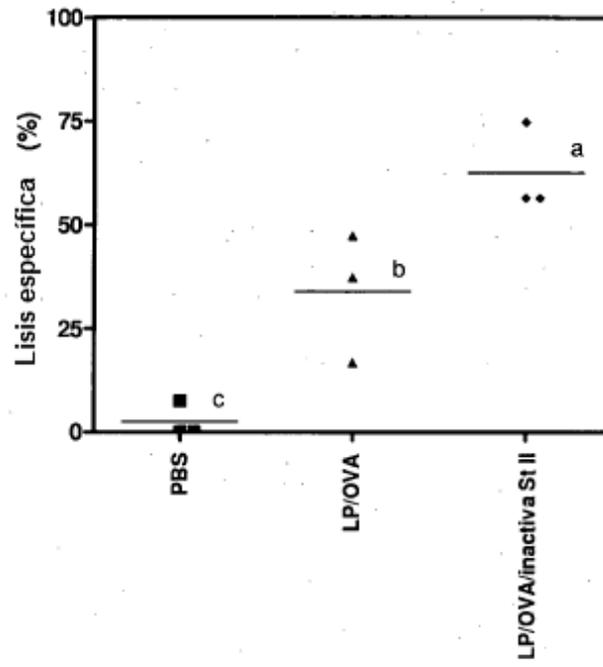


Figura 6B