(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 641 375**

(51) Int. CI.:

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2013 PCT/EP2013/072865**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068085**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2013 E 13789746 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2925297**

(54) Título: **Composición que comprende macroagregados de citoquinas**

(30) Prioridad:

02.11.2012 EP 12191044

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2017

(73) Titular/es:

CYTUVAX (100.0%)
Oxfordlaan 55
6229 EV Maastricht, NL

(72) Inventor/es:

FALKENBERG, FRANK, WALTER

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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 macroagregados de citoquinas

Campo de la invención

La presente invención proporciona métodos y composiciones para la estimulación de respuestas inmunes. En particular, la presente invención proporciona composiciones (por ejemplo, vacunas) y métodos de uso de las mismas para la inducción de respuestas inmunes (por ejemplo, respuestas inmunes innatas y adaptativas (por ejemplo, para generar la inmunidad del huésped contra el cáncer (por ejemplo, un tumor) o contra cualquier tipo de antígeno (por ejemplo, bacteriano, viral, derivado de parásitos)). Las composiciones y métodos de la presente invención encuentran uso, entre otras cosas, en aplicaciones clínicas (por ejemplo, medicina profiláctica, terapéutica y preventiva (por ejemplo, vacunación)) y de investigación.

Se refiere particularmente al área de inmunoterapia específica activa del cáncer ("vacunas contra el cáncer"), y proporciona procedimientos de preparación de vacunas terapéuticas que pueden eliminar células cancerosas. También se refiere al área de inmunización contra patógenos.

Estas vacunas están construidas de tal manera que imitan la liberación e intercambio de citoquinas y otras biomoléculas entre células a nivel celular local a medida que ocurren durante la inducción de respuestas inmunes naturales.

Antecedentes de la invención

La vacunación es un procedimiento extremadamente complejo, que imita los procedimientos moleculares y celulares que ocurren durante la inducción de respuestas inmunes naturales después de una lesión e infecciones microbiológicas y que implica dos reacciones estrictamente locales: una a nivel del sitio de inoculación y otra al nivel del(los) ganglio(s) linfático(s) drenante(s).

En tales respuestas inmunes naturales, las interacciones entre las células del sistema inmune están reguladas y dirigidas por el intercambio de citoquinas en la red de citoquinas. La mayor parte de nuestro conocimiento sobre las interacciones entre las células del sistema inmune y sobre las acciones de las citoquinas en estas interacciones se ha elaborado mediante la experimentación in vitro. Sobre la base de dichos resultados se acepta generalmente que muchos tipos de células del sistema inmune innato y adaptable son secretores "profesionales".

Tienen la maquinaria intracelular para producir, almacenar y liberar una variedad de citoquinas, quimiocinas y otras sustancias secretadas (mediadoras, por ejemplo, serotonina, histamina).

Los resultados de investigaciones recientes (Huse, Morgan, B.F. Lillemeier. M.S. Kuhns, D.S. Chen & M.M. Davis) muestran que las células T utilizan dos vías direccionalmente distintas para la secreción de citoquinas. 2006 Nature Immunology 7, 247-255; Stanley, C. Amanda and Lacy Paige Pathways for Cytokine secretion. 2010. Reviews. Physiology 25, 218-229) han demostrado que las moléculas de citoquinas se pueden liberar

- ya sea por exocitosis hacia el exterior de las células o dirigidas a sinapsis a través de las cuales las células están en contacto entre sí, por ejemplo, a las sinapsis inmunológicas entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno,

- o a través de vías multidireccionales (por ejemplo, por liberación de citoquinas constitutivas por vesículas portadoras que transportan carga a la membrana plasmática para liberación inmediata (en cuestión de minutos de estimulación) o por degranulación fragmentaria de pequeñas vesículas secretoras),

- o mediante la secreción bimodal dirigida (la liberación de diferentes cargas (= citoquinas) en diferentes direcciones) permite que las células se involucren simultáneamente tanto en células "públicas" (a todas las células cercanas) como "privadas" (a una célula en contacto) "conversación".

Por consiguiente, las concentraciones de citoquinas en el sitio de lesión o inflamación serán dependientes;

• en la posición momentánea de las células en relación entre sí;

• en el estado de activación/estimulación de las células implicadas;

• en la forma en que se liberan las moléculas de citoquinas (sincronización, goteo o ráfaga); y

• sobre la movilidad de las moléculas de citoquinas liberadas en el fluido extracelular (velocidad de difusión, gradiente de concentración, distancia que las moléculas pueden emigrar).

La farmacología actual no ha encontrado todavía caminos y procedimientos para interactuar e imitar estos procedimientos intercelulares del sistema inmune a nivel celular local. Hasta ahora prácticamente todas las interacciones farmacéuticas se basan en aplicaciones sistémicas (i.v., s.c., i.d.). Sin embargo, si las moléculas moleculares del mensajero, tales como citoquinas, se aplican sistemáticamente, tienden a inundar el organismo y a hacer realmente las interacciones locales de la célula a la célula imposible. Sin embargo, en circunstancias específicas, pueden inducir y modificar reacciones inmunes, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer mediante la activación de linfocitos que han infiltrado lesiones tumorales o metástasis (TIL: linfocitos infiltrantes en el tumor) y han sido suministrados inertes por las células tumorales.

Las células del sistema inmune son capaces de producir, almacenar y liberar más de una única citoquina. También se puede suponer que cada citoquina se libera para un propósito diferente. De este modo, es bastante improbable que todas las citoquinas se almacenen en las mismas vesículas y siempre se liberan juntos. Esto también se ha demostrado experimentalmente. Los mecanismos de esta maquinaria molecular finamente sintonizada que regula la secreción de decenas de citoquinas, quimiocinas y otros mediadores de moléculas pequeñas (por ejemplo, por mastocitos) no se entiende hoy en día, pero debe ser responsable de los procedimientos de liberación.

Las moléculas de citoquinas se liberan cuando una vesícula que contiene citoquina se fusiona con la membrana de la célula y se abre hacia el exterior o a través de una sinapsis en otra célula. Dicho procedimiento no puede resultar en un flujo lento y continuo de moléculas de citoquinas desde la célula hasta su exterior, sino que tiene que ser de tipo ráfaga, "disparar" las moléculas de citoquinas hacia el entorno extracelular o a través de una sinapsis hacia una célula vecina.

En las vesículas, las moléculas de citoquinas están densamente empaquetadas. Por consiguiente, cerca del punto de liberación, cerca de la superficie de las células, las concentraciones de citoquinas son extremadamente altas. Pero después de unos pocos diámetros de difusión de células se reducirán a las concentraciones requeridas para la unión a receptores de citoquinas. Algunas de las moléculas de citoquinas podrían llegar al sistema vascular; la mayoría sólo se perderán en el espacio extracelular.

En 1996 David R. Kaplan publicó una revisión (Kaplan, David R. Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines. 1996 Trends. Immunology Today 17, 303-304), en la que ha resumido datos de otros investigadores. Basándose en estos datos, ha hecho la siguiente estimación:

1. un solo linfocito T activado es capaz de liberar aproximadamente 0.04 pg de IL-2 por hora, correspondiente a aproximadamente 10^6 moléculas de IL-2.

2. estos 0.04 pg de IL-2 se almacenan en 20-2,000 vesículas en una densidad extremadamente alta de 1-100 mM (correspondiente a 12-1.200 gramos de IL-2 por litro).

3. después de la fusión de una vesícula que contiene citoquina con la membrana de la célula y la apertura de la vesícula al exterior de las células, la concentración de IL-2 estará en el mismo intervalo de 1-100 mM.

4. esta concentración es demasiado alta para unirse al receptor de células T en la misma membrana de la célula.

5. después de la difusión durante aproximadamente 100 segundos y en una distancia de pocos diámetros celulares del linfocito secretor, la concentración de IL-2 alcanza el nivel requerido para la unión a receptores de citoquina.

Por consiguiente, en una reacción inmune, cada célula T activada rompería una lluvia de aproximadamente 1,000,000 de moléculas de IL-2 liberadas entre 20 y 2,000 vesículas de diferentes tamaños (= entre 500-50,000 moléculas por vesícula)

Con el fin de imitar dichas reacciones, no es suficiente liberar un goteo de moléculas de IL-2, como es el caso de las células tumorales transfectadas con el gen de citoquina, como se han aplicado en vacunas contra el cáncer (por ejemplo, Nemunaitis et al. J. Natl. Cancer Inst. (2004) 96:326-331).

También la inyección local de varios cientos de microgramos de citoquinas como se hace en el tratamiento sistémico de citoquinas está muy lejos del procedimiento natural: una inmensa cantidad de trillones (más de 1,000,000,000,000) de moléculas de citoquinas no es capaz de imitar el patrón de liberación natural de una célula secretora profesional.

La liberación local de dicha cantidad tan grande de moléculas de citoquina, que corresponde a la liberación simultánea de varios millones de linfocitos activados, nunca ocurrirá bajo condiciones naturales y causará un caos absoluto en y alrededor del sitio de inoculación y - después de alcanzar el sistema vascular - también podría causar estragos en lugares lejanos.

La aplicación directa de IL-2 bajo el nombre comercial de Proleukin (Chiron Corp.) ha sido aprobada por la FDA de los Estados Unidos para el tratamiento de adultos con carcinoma de células renales metastásico y melanoma

metastásico. Ya desde las primeras etapas de la investigación sobre composiciones farmacéuticas que contenían IL-2, era evidente que se necesitaban agentes de prevención de la agregación para asegurar la solubilidad de IL-2. Por ejemplo, en US4604377, que describe las composiciones farmacéuticas más tempranas de IL-2, indica que deben estar presentes aproximadamente 100 a aproximadamente 250 μg de dodecilsulfato de sodio (SDS) para evitar la agregación de IL-2 y asegurar la solubilidad.

El documento EP1688146, que describe entre otros el procedimiento para obtener la composición de Proleukin, detalla más la importancia de la cantidad de SDS en la composición. Se considera que la cantidad necesaria de SDS es de 95 a 250 μg por mg de IL-2, concentración a la que la IL-2 está presente en microagregados de aproximadamente 25-60 moléculas de IL-2 por agregado. La cantidad preferida de SDS, como también está presente en la formulación de Proleukin, es 160 μg de SDS por mg de IL-2, lo que conduce a microagregados de aproximadamente 27 moléculas de IL-2, con un diámetro de aproximadamente 12 nm. A medida que la concentración de SDS cae por debajo de 95 μg/mg, los tamaños de los agregados aumentan bruscamente, lo que conduce a una peor farmacocinética in vivo. La tasa de eliminación en ratas se encontró incluso que era 30 veces mayor para una composición que contenía 25 μg de SDS por mg de IL-2 en comparación con la composición preferida de 160 μg de SDS por mg de IL-2.

Una interesante variación de la inyección directa de IL-2, tal como la inyección de Proleukin, se presenta en el documento US6406689. En dicha patente, la formulación de IL-2 Proleukin mencionada anteriormente (que comprende SDS en un intervalo de 95 a 250 μg por mg) se adsorbe a hidróxido de aluminio. A continuación, se mezcla con células tumorales irradiadas y se inyecta en ratones en los que se induce carcinoma renal. Mientras que las tasas de supervivencia cuando más alta para IL-2 en combinación con células tumorales irradiadas en comparación con las células tumorales irradiadas solo, la tasa de supervivencia aumentó aún más cuando la IL-2 se adsorbe a hidróxido de aluminio.

El inventor de la presente invención ha encontrado sorprendentemente que la generación de macroagregados de citoquinas de, por ejemplo, IL-2 y la adsorción de éstos a un material de depósito, tal como hidróxido de aluminio, conduce a composiciones con propiedades farmacéuticas mejoradas. En lugar de la farmacocinética in vivo peor esperada asociada con estos macroagregados sistemáticamente aplicados como se describe en el documento EP1688146, estos macroagregados mejoran realmente el resultado in vivo en comparación con los microagregados, cuando se adsorben a un material de depósito y se aplican como adyuvantes en vacunas, como se describirá a continuación.

De este modo, ha sido un objeto de la presente invención proporcionar una composición mejorada para inducir respuestas inmunes, en particular para el tratamiento de tumores, tal como para la vacunación contra el cáncer.

Además de la sorpresa del inventor, dicha composición que comprende macroagregados de citoquinas adsorbidos en un material de depósito y material antigénico parece imitar de cerca el sistema inmune natural. Como se describirá con más detalle en lo que sigue, se ha descubierto que las moléculas de citoquinas o pequeños agregados se liberan de los macroagregados en ráfagas localizadas, similares a la liberación de vesículas observada en los eventos secretores de las células del sistema inmune. Además, dicha formulación de vacuna se caracteriza por participar en procedimientos inmunoestimulantes no sólo localmente en el sitio de inoculación, sino también en el/los nódulo(s) linfático(s) que drena(n) la zona del sitio de inoculación. Sin desear estar limitado por la teoría, actualmente se supone que el receptor CD25A podría desempeñar un papel en este efecto. Las células dendríticas CD86+ maduras llevan el receptor de IL-2 CD25A de baja afinidad. Debido a sus propiedades de baja afinidad, el receptor de baja afinidad CD25A en las células dendríticas CD86+ se une a los agregados de IL-2 en lugar de a las moléculas de IL-2 aisladas. Esta podría ser la razón por la cual las células dendríticas CD86+ llevan tanto los fragmentos antigénicos como los agregados de IL-2 a los ganglios linfáticos.

De este modo, es también un objeto de la presente invención proporcionar el uso de una composición que comprende tales macroagregados de citoquinas al imitar el sistema inmune natural y estimularlo, no sólo en el sitio de inoculación, sino también en el(los) ganglio(s) linfático(s) drenando la zona del sitio de inoculación.

Breve descripción de los dibujos

Con referencia específica ahora a las figuras en detalle, se hace hincapié en que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las diferentes realizaciones de la presente invención solamente, y se presentan en la causa de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácil de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se intenta mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle de lo que es necesario para una comprensión fundamental de la invención, la descripción tomada con los dibujos haciendo evidente para los expertos en la técnica cómo se pueden realizar las diversas formas de la invención en la práctica.

Figura 1. Vistas detalladas de la composición de la invención que consisten en macroagregados de IL-2 adsorbidos en las partículas de alumbre

1a. La composición de la invención que comprende macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre. La IL-2 se identifica por incubación con un anticuerpo IgG monoclonal específico para la IL-2 humana seguido por incubación con un anticuerpo IgG anti ratón (h&l) de cabra marcado con AlexaFluor 488. Los macroagregados de IL-2 se pueden reconocer en localizaciones como puntos (1) en un gran conglomerado de alumbre. El gran agregado de alumbre que se muestra en esta imagen tiene un tamaño de aproximadamente 20 x 60 μm. El tamaño de los agregados de IL-2 semejantes a punto sobre la matriz de alumbre se puede estimar entre 50 nm y 6000 nm. Se hicieron observaciones similares para macroagregados de IL-2 adsorbidos en perlas de látex.

1b. La composición de la invención. La IL-2 se tiñó de color verde, el alumbre se tiñó de rojo. Después de la conversión a escala de grises como en la figura 1b, IL-2 se muestra en un tono más claro de gris que el alumbre. La imagen muestra una imagen de microscopía de barrido por láser de un detalle de una partícula de alumbre (2) con macroagregados de IL-2 (1) adsorbidos en el mismo. También se pueden observar algunos macroagregados de IL-2 (3) pequeños adsorbidos en la partícula de alumbre.

Figura 2. Formulación de vacuna contra el cáncer de acuerdo con la presente invención. Partículas de alumbre cargadas con macroagregados de IL-2 (2) y células tumorales marcadas con Texas Red (1). La IL-2 se identificó por incubación con un anticuerpo IgG monoclonal específico para la IL-2 humana, seguido de incubación con un anticuerpo IgG antiratón (h&l) de cabra marcado con AlexaFluor 488.

Los macroagregados de IL-2 se pueden reconocer en localizaciones como puntos (2) sobre un gran conglomerado de alumbre. Las células tumorales y los fragmentos de células tumorales (1) se identifican mediante la fluorescencia roja de las células tumorales marcadas con Texas Red.

Figura 3. Formulación de vacuna contra el cáncer de acuerdo con la presente invención. Las células de melanoma murino B16 irradiadas cargadas con macroagregados de IL-2. La IL-2 unida a células se identificó usando un anticuerpo IgG específico de IL-2, seguido de incubación con un anticuerpo IgG antiratón de cabra marcado con fluoresceína.

Figura 4. Composiciones preparadas sin formación de macroagregados de citoquinas

4a. Partícula de alumbre con IL-2 preparada usando una solución reguladora que contiene SDS en lugar de la formulación de la presente invención.

4b. Partícula de alumbre preparada según el documento US20020176845. Comparada con la partícula de alumbre mostrada en la figura 1, la IL-2 que se identifica por incubación con un anticuerpo monoclonal de IgG específico para IL-2 humana seguido de incubación con un anticuerpo IgG antiratón (h&l) de cabra marcado con AlexaFluor 488, se distribuye homogéneamente sobre la partícula de alumbre de las figuras 4a y 4b.

Figura 5. Efecto sinérgico de GM-CSF macroagregado e IL-4 en la vacunación terapéutica con RenCa. Gráfica de supervivencia para un estudio de vacunación terapéutica con RenCa con una administración subcutánea con células tumorales irradiadas y diferentes preparaciones de macroagregados de depósitos de citoquinas, esto es, GM-CSF murino recombinante (rmuGM-CSF), rmuIL-4 y la combinación de los mismos.

Figura 6a-f. Fotografías de cortes de tejido preparadas a partir de los sitios de inoculación de preparaciones de vacuna aplicadas a ratones. Las fotografías se convirtieron a escala de grises para esta solicitud de patente, con lo que las visualizaciones rojas y verdes se volvieron grises.

6a Una preparación de vacuna de control que contiene, como marcador, una pequeña dosis de albúmina de suero bovino marcada con Texas Red unida a hidróxido de aluminio ("alumbre"). Las macroagregados de citoquinas adsorbidas en alumbre no se adicionaron a la preparación de la vacuna. Se prepararon cortes de tejido (7 mm) a partir de material congelado por choque extirpado del sitio de inoculación 11 días después de la vacunación y se incubaron con anticuerpo monoclonal de rata específico para células endoteliales murinas (anti-CD31), seguido de incubación con un anticuerpo IgG antirata (h&l) de burro marcada con AlexaFluor 488. La tinción fluorescente roja (1) identifica el material inoculado; la tinción fluorescente verde (2) muestra la presencia de capilares en el tejido normal de la piel del ratón. No se observan capilares en y alrededor del inóculo.

6b Se inyectó un ratón con una composición de acuerdo con la invención que contenía células de tumor murino irradiadas y albúmina de suero bovino marcada con Texas Red unida a hidróxido de aluminio y

- 10 μg de macroagregados de IL2 recombinante humana adsorbidos en alumbre

- 2 μg de macroagregados de IL4 murino recombinante adsorbidos en alumbre

- 3 μg de macroagregados de interferón alfa recombinante humano adsorbidos en alumbre

- 3 μg de macroagregados de GM-SCF murino recombinante adsorbidos en alumbre

Se prepararon cortes de tejidos (7 μm) a partir de material congelado por choque obtenido del sitio de inoculación 11 días después de la vacunación y se incubaron con anticuerpo monoclonal de rata específico para células endoteliales murinas (anti-CD31), seguido de incubación con un anticuerpo IgG antirata (h&I) de burro marcada con AlexaFluor 488.

La tinción fluorescente roja (1) identifica el material inoculado, la tinción fluorescente verde (2) muestra el brote de capilares dentro y alrededor del inóculo.

6c La misma composición que en 6b arriba. Se prepararon cortes de tejido (7 μm) a partir de material de tejido congelado por choque obtenido del sitio de inoculación 19 días después de la vacunación y se incubaron con un anticuerpo de rata monoclonal específico para fibroblastos reticulares murinos (ER-TR7), seguido de incubación con un anticuerpo IgG antirata (h&I) de burro marcada con AlexaFluor 488. La tinción fluorescente roja (1) identifica el material inoculado, la tinción fluorescente verde (2) muestra la cápsula formada por fibroblastos alrededor del inóculo.

6d La misma composición que en 6b-c arriba. Se prepararon cortes de tejido (7 μm) a partir de material de tejido congelado por choque obtenido del sitio de inoculación 19 días después de la vacunación y se incubaron con un anticuerpo monoclonal de rata específico para células T CD4 murinas (H129.19), seguido de incubación con un anticuerpo IgG antirata (h&I) de burro marcada con AlexaFluor 488.

La tinción fluorescente roja (1) identifica el material inoculado, la tinción fluorescente verde (2) muestra células T auxiliares CD4 que invaden la cápsula y el inóculo.

6e Se inyectó un ratón con una composición de la invención que comprendía células tumorales irradiadas y macroagregados de IL-2 adsorbidos en partículas de alumbre. 24 horas después de la inyección, se prepararon cortes de tejido del sitio del inóculo y se tiñeron (IL-2: verde, células tumorales: rojo). La imagen fue convertida a escala de grises e invertida, haciendo que el material manchado fuera de color gris oscuro o negro. El inóculo (1) se muestra en negro debido a la abundante presencia de células tumorales e IL-2 de la composición de la vacuna. Toda la zona que rodea el sitio del inóculo está rodeada de macroagregados de IL-2, que se muestran como manchas negras, algunas de los cuales están indicados por las flechas (2). Se puede observar una célula dendrítica (3) que une los fragmentos tumorales (4) y los agregados de IL-2 (2).

6f Se prepararon cortes de tejido del ganglio linfático que drena el sitio del inóculo a partir del ratón como se describe en 6e. Los macroagregados de IL-2 transportados al ganglio linfático se pueden ver en el espacio intercelular (manchas blancas).

Figura 7. A La liberación in vivo de IL-2 a partir de macroagregados de IL-2 inyectados subcutáneamente adsorbidos en depósito de alumbre y de IL-2 libre inyectada subcutáneamente. La IL-2 libre muestra un pico de liberación alto de aproximadamente 1.750 ng y cae a cero después de aproximadamente 6 horas. Los macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre muestran un pico inferior de aproximadamente 250 ng, seguido por una liberación lenta en el intervalo de 50-100 ng hasta después de aproximadamente 30 horas. B La liberación in vitro de IL-2 a partir de macroagregados de IL-2 adsorbidos en el depósito de alumbre, 10 μg de macroagregados de IL-2 fueron adsorbidos en 10 μg, 30 μg y 100 μg de alumbre, respectivamente. Muestra de nuevo el pico inicial seguido de una liberación sostenida de aproximadamente 50 ng/24 horas, con un óptimo para la carga saturada del alumbre. Como se puede ver en esta figura, la subcarga de la citoquina al depósito (30 μg y 100 μg de alumbre) tiene un efecto negativo global sobre la liberación de IL-2 desde el depósito.

Figura 8. Gráfico de supervivencia para un estudio de vacunación terapéutica con RenCa con una administración subcutánea con diferentes cargas de macroagregados de IL-2 del depósito de alumbre. El primer número da la cantidad de alumbre, el segundo la cantidad de citoquina macroagregada. De este modo, parece que para alumbre/IL-2 existe un óptimo de 10/10 a 30/10. Si la IL-2 se adsorbe a un exceso de alumbre, como con 100/10, esto tiene un efecto negativo sobre las supervivencias observadas.

Figura 9. Incremento significativo de los títulos de anticuerpos de HBsAg en ratones vacunados mediante inyección de una vacuna comercialmente disponible de Hepatitis B (por ejemplo, Recombivax HB) adicionalmente adyuvada por citoquinas unidas al alumbre (IL-2, GM-CSF). Para esta investigación, se utilizó la vacuna Recombivax HB comercialmente disponible (40 μg de HBsAg adsorbida en un compuesto de alumbre en una dosis inyectable de 1.0 ml). Se seleccionó 1/40 de la dosis humana como una dosis apropiada para la vacunación de ratones. Se mezclaron 50 μl de la dosis humana (equivalente a 1.0 μg de HBsAg) con 50 μl de IL-2 unida al alumbre (10 μg de rhuIL-2 unida a 10 μg de alumbre) o GM-CSF unido a alumbre (3.0 μg de rmuGM-CSF unido a 10 μg de alumbre) y se aplicó intramuscularmente al músculo de la pata trasera del ratón. Se recogió sangre 15 días después de una sola inyección.

Los títulos de anticuerpos IgG se determinaron en un ELISA con HBsAg recombinante unido a una fase sólida (Serum Institute of India).

De la figura se desprende claramente que la adición de cualquiera de los 2 adyuvantes de citoquina, la IL-2 ("AI10") unida a alumbre y GM-CSF unida a alumbre ("GM3/10"), a la vacuna Recombivax HB da lugar a títulos de anticuerpos mejorados significativamente. Los títulos de anticuerpos inducidos por GM-CSF unido al alumbre se encuentran considerablemente más altos que los títulos de anticuerpos inducidos por IL-2 unida a alumbre como adyuvante ($p = 0.06$).

Figura 10. Títulos de anticuerpos en ratones vacunados por vía intraperitoneal antes y después de un desafío con HBsAg soluble. Los ratones se vacunaron 3 veces con una vacuna que no incluía macroagregados de IL-2 (grupo 1) o que comprendía macroagregados de IL-2 (grupo 2). Después de completar el curso de vacunación, los ratones se dejaron sin tratar durante 139 días. Entonces se desafiaron con una sola dosis de HBsAg soluble, no adsorbido en alumbre. Tal desafío con el antígeno libre después de un largo tiempo de "descanso" se asemeja a una infección. Los títulos de anticuerpo se determinaron antes y después del desafío con HBsAg soluble. El eje Y muestra los títulos de anticuerpos observados, el eje X presenta los diferentes grupos. 1 bC: Grupo 1 antes del desafío; 1 aC: Grupo 1 después del desafío; 2 bC: grupo 2 antes del desafío; 2 aC: grupo 2 después del desafío. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos, el valor mediano se representa con una línea. Los animales previamente vacunados con macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre como adyuvante muestran no sólo un anticuerpo significativamente mejorado después de la exposición, sino que también muestran títulos de anticuerpos mejorados extremadamente significativos cuando se comparan con los títulos observados en animales vacunados con HBsAg sin el adyuvante de alumbre IL.

Figura 11. Cambios dependientes del tiempo en la distribución de tamaños de IL2 - aglomeración determinada por la medición de la intensidad de la dispersión (t=0, t=1h, t=2h, t=3h, t=4h, t=5h).

Figura 12. Títulos de anticuerpos 14 días después de la inyección secundaria en ratones vacunados con 1.0 μg de HBsAg adsorbidos en 10 μg de alumbre mezclado con 10 μg de rhuIL-2 adsorbidos en 10 μg de alumbre en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de SDS.

Descripción de la invención

Una composición que comprende citoquinas, en la que al menos el 20% de dichas citoquinas están presentes en macroagregados de citoquinas con un diámetro promedio de al menos 50 nm, y en el que dichos macroagregados de citoquinas están asociados entre sí mediante:

- adsorción a un material de depósito, y/o

- encapsulación en liposomas.

El término "agregados" se refiere a una combinación de moléculas, en particular moléculas de citoquinas que se reúnen para formar un cuerpo individual. En una realización preferida, los agregados contienen moléculas que interactúan de forma no covalente entre sí.

El término "macroagregados de citoquinas" o "macroagregados" significa agregados de moléculas de citoquina que son más grandes que microagregados, que contienen por lo general de 2 a aproximadamente 30 moléculas, que tienen tamaños de diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 nm. Los macroagregados se pueden definir por su diámetro. En una realización preferida, los macroagregados son agregados que tienen un diámetro mayor de 50 nm. En una realización adicional, los macroagregados tienen un diámetro mayor de 75 nm, más en particular mayor de 100 nm. Se conocen diferentes técnicas para el experto en el arte para medir tamaños de diámetro de agregados, tales como dispersión dinámica de luz o mediciones de microscopía de electrones. Los macroagregados también se pueden definir por el número de moléculas de citoquinas contenidas en los mismos. En una realización preferida, los macroagregados son agregados que contienen al menos 100 moléculas. En una realización adicional, los macroagregados son agregados que contienen al menos 200, 300, 500, 750 o 1000 moléculas. En otra realización adicional, los macroagregados son agregados que contienen al menos 10^4, 10^5 o 10^6 moléculas.

En el contexto de la invención, "una cantidad sustancial de dichas citoquinas está presente en macroagregados de citoquinas" significa que una parte no despreciable de las citoquinas comprendidas por la composición está presente en macroagregados. De este modo, parte de las citoquinas puede estar presente en forma de moléculas de citoquina individuales y/o microagregados con tamaños por debajo de 20-50 nm. Por ejemplo, parte de las citoquinas (por ejemplo, IL-2) puede estar presente en microagregados de 9-17 nm, tales como, por ejemplo, encontrada en una solución típica de Proleukin®. En una realización particular, al menos 25, 30, 35 o 40% de dichas citoquinas están presentes en macroagregados de citoquinas. En una realización adicional, al menos el 50% de dichas citoquinas están presentes en macroagregados de citoquinas. En otra realización, el diámetro promedio de los agregados de citoquinas comprendidos por la composición es mayor de 50 nm. En otra realización particular, el diámetro promedio de los agregados de citoquinas asociados entre sí es mayor de 50 nm. En otra realización más, dicho diámetro promedio de agregados de citoquinas es al menos 60, 75, 100, 150 o 200 nm.

Es bien sabido que la mayoría de los Bio-Farmacéuticos producidos por tecnología recombinante sufren de una tendencia a formar agregados (Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. Int J Pharm. 1999;185:129-188).

Hay varias razones para eso:

1. la mayoría de estas proteínas farmacéuticamente activas son pequeñas y muestran un alto grado de hidrofobicidad

2. debido a la falta de glicosilación, la hidrofobicidad se incrementa adicionalmente cuando la proteína se produce mediante tecnología recombinante en E. coli.

La agregación también depende del pH (más agregados a pH más alto), de la concentración, de la temperatura y de la salinidad de la solución de citoquinas. En el pasado, era comúnmente aceptado que la agregación de los principios activos dentro de estos Bio-Farmacéuticos se debe evitar. Por lo tanto, cuando se usan, estos productos BioFarmacéuticos se disuelven en soluciones reguladoras que comprenden agentes que impiden la agregación, como el dodecilsulfato de sodio, para evitar la agregación de moléculas a moléculas con la formación de grandes agregados. Tal como se describe por ejemplo en el documento EP 1 688 146 A1, en el que se requiere una cantidad mínima de SDS como agente de prevención de la agregación para obtener microagregados de IL-2 con las características terapéuticas deseadas.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que las composiciones que comprenden citoquinas unidas a depósitos en estados macroagregados tan grandes son más eficaces que cuando están en estado microagregado en la generación de una inmunoterapia específica activa para cánceres.

Dentro de una realización típica de la presente solicitud, las citoquinas están presentes como agregados de diversas masas moleculares. Tales agregados se pueden obtener en ausencia de agentes de prevención de la agregación, o en presencia de un agente de prevención de la agregación en una cantidad suficientemente baja para permitir la formación de macroagregados de citoquinas. Se apreciará por el experto en el arte que los macroagregados de citoquinas en una composición de la invención se pueden formar de varias maneras. Se pueden formar agregados de citoquinas antes de mezclar las citoquinas (macroagregados) con los otros componentes de la composición, o citoquinas (no agregadas o microagregadas) se pueden mezclar directamente con otros componentes en condiciones que permitan o estimulen la formación de macroagregados de citoquinas.

En una realización particular, la composición de la invención comprende un tipo de citoquina, seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, e IFN-alfa. En una realización adicional preferida, la composición de la invención comprende macroagregados de IL-2.

En otra realización particular, la composición de la invención comprende diferentes citoquinas en forma de macroagregados. Particularmente citoquinas independientemente seleccionadas del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, e IFN-alfa. En una realización adicional preferida, al menos una citoquina es IL-2. En otra realización preferida, la composición de la invención comprende IL-2 y una o más citoquinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-4, IL-12, GM-CSF e IFN-alfa; en particular IL-4 o GM-CSF; más en particular GM-CSF. Dicha composición que comprende macroagregados de diferentes citoquinas se puede obtener de varias maneras. Como ejemplo, se pueden preparar macroagregados de una primera citoquina y se pueden preparar macroagregados de una segunda citoquina y éstos se pueden mezclar antes de asociarlos unos con otros adsorbiéndolos en un material de depósito y/o encapsularlos en liposomas. Otra opción ejemplar es generar macroagregados directamente a partir de una solución que contiene varios tipos de citoquinas, generando así macroagregados que contienen citoquinas diferentes y usando estos macroagregados para asociarlos entre sí. Un tercer ejemplo es preparar macroagregados de una primera citoquina y asociarlos entre sí; preparar macroagregados de una segunda citoquina y asociarlos entre sí; y posteriormente mezclar los macroagregados asociados. Cuando se utiliza la adsorción en un depósito como medio para asociar macroagregados, esta última opción permite generar materiales de depósito con la densidad más alta posible de una citoquina particular. Por ejemplo, una partícula de alumbre puede estar cubierta por macroagregados de IL-2, mientras que una segunda partícula de alumbre puede estar cubierta por macroagregados de IL-4.

Puesto que uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar que las presentes composiciones y sus componentes, en particular como formulación de vacuna, participarán tanto en los procedimientos locales en el sitio del sitio de inoculación como en los ganglios linfáticos donde se induce el procedimiento inmune específico real, es deseable combinar diferentes citoquinas en forma de macroagregados en la composición. Usando diferentes citoquinas, es posible estimular varias armas del sistema inmune, por ejemplo, IL-2 estimula las células T y aumenta la actividad de las células NK; GM-CSF & IL-4 está involucrado en el reclutamiento y maduración de células dendríticas; GM-CSF además induce la vascularización del inóculo; IL-12 activa células dendríticas y otras inmunes; y el IFN-alfa recluta y activa las células NK.

De este modo, en una realización particular de la presente invención, una o una pluralidad de citoquinas diferentes está presente como macroagregados dentro de la composición; y en particular cada citoquina se selecciona independientemente del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF e IFN-alfa.

Como será evidente para el experto en el arte, las citoquinas mencionadas anteriormente se proporcionan solamente como ejemplos posibles y no tienen intención de restringir los macroagregados de citoquinas usados en las composiciones de la presente invención. Dichas citoquinas han sido seleccionadas sobre la base del conocimiento actualmente disponible sobre la acción de la citoquina, pero también sobre la base de la disponibilidad física de estas citoquinas en calidad farmacéutica. En el futuro, otras citoquinas pueden estar disponibles y añadirse a las composiciones de la presente invención de acuerdo con su actividad descrita.

En principio, dicha combinación de diferentes macroagregados de citoquinas adsorbidos en el depósito se puede conseguir mezclando los macroagregados de citoquinas/citoquinas antes de asociarlos entre sí, pero en una realización preferida las diferentes macroagregados de citoquinas/citoquinas se adsorben por separado al material de depósito y se mezclan posteriormente.

Como se ha descrito anteriormente, en la composición de la presente invención, los macroagregados de citoquinas están asociados entre sí por adsorción a un material de depósito y/o encapsulación en liposomas. De este modo, en una realización particular, la composición de la presente invención comprende macroagregados de citoquinas que están asociados entre sí por adsorción a un material de depósito. En otra realización particular, los macroagregados de citoquinas están asociados entre sí por encapsulación en liposomas. En una realización adicional, parte de los macroagregados de citoquinas están asociados entre sí por adsorción a un material de depósito y parte de los macroagregados de citoquinas están asociados entre sí por encapsulación en liposomas y a continuación, se mezclan los macroagregados de citoquinas adsorbidos y los encapsulados en liposomas.

En las composiciones de la presente invención, los macroagregados de citoquinas unidos a depósitos están unidos no covalentemente al material de depósito o unidos covalentemente a ellos usando procedimientos conocidos en la técnica. El término "adsorbido", como se utiliza en la presente solicitud, abarca de este modo cualquier tipo de adsorción, esto es, la adsorción puede ser una fisisorción o quimisorción causada por atracción electrostática, fuerzas de van der Waals y/o unión covalente.

En cualquier caso, cuando se une covalentemente al material de depósito, la unión covalente debe ser reversible de tal manera que las citoquinas puedan ser liberadas del material de depósito. El experto en el arte sabe muy bien cómo unir de forma covalente y reversible macroagregados de citoquinas a un material de depósito. Por ejemplo, se pueden usar enlaces que se pueden degradar por enzimas (naturales) o por degradación química. Por ejemplo, se puede usar un puente disulfuro como enlazante, que se escinde por medio de reductasas en el organismo vivo; o enlazantes ésteres que se pueden degradar por esterasas.

En principio, se puede usar cualquier material de depósito usado por lo general en la fabricación de composiciones de vacuna y capaz de unirse a los macroagregados de citoquinas. En una realización, y dado el hecho de que los macroagregados de citoquinas son capaces de unirse directamente a las células irradiadas, el material de depósito consiste en las células tumorales irradiadas. Por consiguiente, y en una realización particular de la presente invención, el material de depósito se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, perlas de látex, microesferas o nanopartículas basadas en ácido poliláctico y células tumorales irradiadas (incluyendo células tumorales autólogas irradiadas, células tumorales alogénicas irradiadas y células tumorales xenogénicas irradiadas). En otra realización particular, el material de depósito se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, perlas de látex y microesferas o nanopartículas basadas en ácido poliláctico; en particular el material de depósito es el hidróxido de aluminio. En otra realización particular, el material de depósito es perlas de látex o carbón medicinal.

Como se ha descrito en este documento anteriormente, en otra realización las composiciones de acuerdo con la presente invención se caracterizan además porque las citoquinas y/o los agregados de citoquinas están asociados entre sí por encapsulación en liposomas. En una realización preferida se utilizan liposomas de DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), pero también se pueden usar otros componentes (por ejemplo, fosfolípidos) para la preparación de liposomas.

Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para preparar liposomas (por ejemplo, DMPC); por ejemplo, es posible un procedimiento sencillo en el que las citoquinas no se tratan bajo condiciones de estrés. En dicho procedimiento se adiciona simplemente DMPC cristalizado/liofilizado a una solución concentrada de citoquina que contiene una cantidad sustancial de macroagregados de citoquinas y se mezcla, se congela y se descongela en varios ciclos. El resultado son liposomas pequeños que han encapsulado los macroagregados de citoquinas.

El procedimiento ejemplar:

Se adicionan 300 mg de DMPC liofilizado (esterilizado por irradiación) a una suspensión de 1.0 mg de macroagregados de citoquina/citoquina en 1.0 ml de solución reguladora.

La mezcla se agita en vórtex durante 1 min. y se somete a ultrasonidos en un baño de ultrasonidos durante 1 min.

A continuación, la suspensión se congela durante 5 minutos en un baño de hielo seco en etanol y se descongela en un baño de agua a 37ºC.

Este procedimiento se repite 3 veces.

En la suspensión obtenida, la mayoría de los macroagregados de citoquinas en el material de partida se encapsulan en los liposomas generados, parte de la misma está todavía libre en la suspensión.

Se aplican alícuotas de toda la suspensión obtenida de este modo, y que contienen la cantidad deseada de macroagregados de citoquinas en la composición de la invención.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende además material antigénico. De acuerdo con lo anterior, también dentro de la presente invención se proporciona el uso de macroagregados de citoquinas unidos a depósitos, que opcionalmente incluyen moléculas de citoquinas libres o microagregados de citoquinas, en una composición con material antigénico. En una realización particular, dicho material antigénico es un material antigénico microbiano o asociado a un tumor. En una realización más particular, dicho material antigénico es material antigénico asociado a microbios. Los antígenos microbianos son antígenos de un microorganismo e incluyen, pero no se limitan a, antígenos virales, bacterianos, parasitarios y fúngicos. Los antígenos microbianos pueden ser microorganismos intactos, y los aislados naturales, fragmentos o derivados de los mismos, compuestos sintéticos que son idénticos o similares a antígenos microbianos de origen natural y, preferiblemente, inducen una respuesta inmune específica para el microorganismo correspondiente (de la cual el antígeno microbiano de origen natural originado). En una realización, el antígeno es un antígeno viral. En otra realización, el antígeno es un antígeno bacteriano. En otra realización particular, el antígeno es un antígeno parasitario. En otra realización más, el antígeno es un antígeno patogénico. En otras realizaciones particulares, el antígeno patógeno es un antígeno sintético o recombinante.

En otra realización particular, el material antigénico es material antigénico tumoral, tal como material seleccionado del grupo que consiste en células tumorales autólogas irradiadas, células tumorales alogénicas irradiadas, células tumorales xenogénicas irradiadas, homogenados de células tumorales, extractos de células tumorales, antígenos tumorales individuales (naturales o recombinantes), mezclas de antígenos tumorales (naturales o recombinantes), péptidos de antígenos tumorales (naturales o recombinantes). En una realización preferida, los antígenos solubles en agua, especialmente los antígenos no particulados, se hacen partículas uniéndolos a un material de depósito.

En cualquier caso, en la fabricación de una composición de acuerdo con la presente invención, en la que los macroagregados de citoquinas se adsorben a un material de depósito, los macroagregados de citoquinas se aplican al material de depósito en la densidad más alta posible (μg de citoquina por μg de material de depósito). Bajo dichas circunstancias, la citoquina se libera del depósito con niveles de liberación que están en el mismo intervalo que los observados en ensayos clínicos con células (tumor) transfectadas con el gen de citoquina. Sin embargo, en contraste con la liberación estática de citoquinas observada en los ensayos clínicos con células transfectadas con el gen de citoquina, la liberación de citoquinas de los macroagregados de citoquinas asociados por adsorción a un depósito es dinámica, con una explosión de liberación elevada dentro de las primeras horas y una liberación a largo plazo de bajo nivel (véase la figura 7A). Como es evidente a partir de la figura 7B, la subcarga del depósito tiene un efecto negativo sobre los niveles de liberación y patrón de liberación y supervivencia (véase el gráfico de supervivencia de Kaplan Meyer - Figura 8).

En una realización particular de las composiciones como se describe en este documento, el depósito es hidróxido de aluminio (alumbre) y la proporción en peso de alumbre a citoquina (también llamada densidad) está entre 1:10 y 30:1; más en particular entre 1:1 y 3:1; aún más en particular 1:1.

Se menciona una composición preferida de acuerdo con la presente invención, en la que 1-30 μg de IL-2 recombinante (Proleukin), 1-30 μg de GM-CSF recombinante, 1-30 μg de IL-4 recombinante, 1-30 μg de IL-12 recombinante o 1-30 μg del IFNalfa recombinante se adsorben en una proporción entre 10:1 y 1:10 de citoquina en alumbre.

Una composición más particular de la presente invención es dicha composición, en la que 10 μg de IL-2 recombinante (Proleukin), 10 μg de GM-CSF recombinante, 10 μg de IL-4 recombinante, 3 μg de IL-12 recombinante, o 10 μg de IFNalfa recombinante se adsorben cada una en una proporción de 1:1 de citoquina en hidróxido de aluminio.

Como será evidente a partir de la parte experimental en lo que sigue, las composiciones de la presente invención son particularmente útiles para la estimulación de respuestas inmunes, tales como por ejemplo en la generación de inmunidad del huésped contra el cáncer (por ejemplo, un tumor) o un patógeno (por ejemplo, bacterias infecciosas o virus o subunidades (antígenos) de ellos). De acuerdo con lo anterior, es una realización de la presente invención

proporcionar una composición como la descrita en este documento antes para su uso como medicamento; en particular para uso como medicina humana o veterinaria. En otra realización, la presente invención proporciona composiciones para uso como vacuna. En una realización particular, la presente invención proporciona composiciones para uso como vacuna microbiana. En otra realización particular, la presente invención proporciona composiciones para su uso como una vacuna contra el cáncer.

En otra realización más, la invención proporciona una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular para uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa o cáncer. En una realización adicional, la presente invención proporciona una composición para uso en el tratamiento de cáncer; en particular un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer renal, hepático, de pulmón, de ovario, de próstata, del páncreas, estómago, de cabeza y cuello, carcinoma testicular, fibrosarcoma, melanoma, glioblastoma, linfomas, leucemias y mielomas. En una realización adicional, la invención proporciona una composición para uso en el tratamiento y/o prevención de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en carcinoma renal, carcinoma pancreático, carcinoma de colon, carcinoma de próstata y melanoma; en particular carcinoma renal y pancreático y melanoma. En otra realización, la invención proporciona una composición para uso en el tratamiento y/o prevención de carcinoma renal y melanoma. En una realización particular, la presente invención proporciona un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, tal como una enfermedad infecciosa o cáncer, comprendiendo dicho método administrar una composición de la invención a un sujeto que lo necesite.

Se refiere particularmente al área de inmunoterapia específica activa del cáncer ("vacunas contra el cáncer"), y proporciona el uso de las composiciones como se describe en este documento, en la preparación de vacunas terapéuticas que pueden eliminar las células cancerosas. En comparación con y diferentes de las formulaciones depot de citoquinas conocidas en la técnica, las formulaciones depot de macroagregados de citoquinas de la presente invención extienden la reacción inmune más allá de las reacciones locales en el sitio de inoculación e incluso mejoran la inducción de reacciones inmunes específicas de tumores a nivel de los ganglios linfáticos.

En otra realización particular, la presente invención proporciona una composición para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad infecciosa, tal como una enfermedad causada por patógenos infecciosos (microbianos), incluyendo bacterias, virus, parásitos y hongos. En algunas realizaciones, el tratamiento como se usa en este documento con referencia a patógenos infecciosos se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto a la infección con un patógeno o disminuye la probabilidad de que el sujeto se infecte con el patógeno; y/o tratamiento después de que el sujeto se ha infectado con el fin de combatir la infección, por ejemplo, reducir o eliminar la infección o evitar que empeore. En una realización particular, el método es un tratamiento profiláctico.

Bajo la influencia de las formulaciones depot de macroagregados de citoquinas de la presente invención, los autores de la presente invención han encontrado que las células precursoras dendríticas se diferencian en células dendríticas maduras in situ, esto es en el sitio de inoculación. Esto en sí ya es una mejora significativa cuando se compara con la maduración de células dendríticas in vitro complicada como se aplica actualmente en las vacunas basadas en células dendríticas, pero además de la maduración in situ de células precursoras dendríticas, las formulaciones depot macroagregados de citoquinas de la presente invención también potencian las reacciones inmunes antigénicas a nivel de los ganglios linfáticos. Hasta tal punto, las células dendríticas se unen y/o absorben, además de fragmentos antigénicos, agregados de citoquinas, adsorbidos o no todavía en partículas de alumbre, en el sitio de inoculación y los llevan a los ganglios linfáticos que drenan dicho sitio de inoculación. En los ganglios linfáticos se presentan fragmentos de antígeno (por ejemplo, de una célula tumoral, una bacteria o un virus) a células T y células NK en el ganglio linfático, activando de este modo las células anteriores en células T citotóxicas y específicas de antígeno y células NK. La presencia de partículas cargadas de citoquina en los ganglios linfáticos interactúa con estos procedimientos y refuerza además la presentación del antígeno y la estimulación celular.

La importación de agregados de citoquinas en el entorno de ganglios linfáticos altamente organizados es una posibilidad hasta ahora desconocida para manipular las reacciones inmunes en el nivel de los ganglios linfáticos.

Se pueden observar otros efectos de las formulaciones depot de macroagregados de citoquinas de la presente invención en el sitio del inóculo. De nuevo en comparación con y diferentes de las formulaciones depot conocidas en la técnica, el inóculo basado en las formulaciones depot con macroagregados de citoquinas unidos a depósitos de la presente invención se convierte en un nódulo vascularizado, preservando el material antigénico (por ejemplo, células tumorales irradiadas) y el material de depósito de citoquina. Como tal, este nódulo vascularizado aparece en las células T, que han sido activadas específicamente en los ganglios linfáticos, como un tumor artificial o sitio de infección y permite la reestimulación de las células T activadas por las citoquinas restantes y el material antigénico original. Este procedimiento de contacto renovado con los antígenos de vacuna mejora adicionalmente la estimulación de las respuestas inmunes mediante las formulaciones depot de citoquinas de la presente invención.

Además, se ha observado que las composiciones de vacuna de la presente invención proporcionan una respuesta inmunogénica más rápida y más alta que las composiciones comparables que carecen de macroagregados de citoquinas. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención permiten una inmunización más rápida y permiten la inmunización de sujetos que de otro modo no respondieran.

Es un objeto adicional proporcionar un procedimiento de preparación de la composición de la invención, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una solución acuosa que comprende una citoquina; en el que dicha solución acuosa no contiene agente de prevención de la agregación o un agente de prevención de la agregación en una cantidad suficientemente baja para permitir la formación de macroagregados de citoquinas con un diámetro mayor de 50 nm;

b) incubar dicha solución acuosa durante un tiempo suficiente para agregar al menos el 20% de dichas citoquinas en macroagregados de citoquinas con un diámetro mayor de 50 nm;

c) asociar dichos macroagregados de citoquinas mediante

- mezcla de dicha solución acuosa con el material de depósito, para adsorber dichos agregados de citoquinas al material de depósito; y/o

- encapsulación de dichos agregados de citoquinas en los liposomas.

Dada la importancia de obtener macroagregados de citoquinas, se prefiere proporcionar una solución acuosa que comprende una citoquina, en la que dicha solución no contiene un agente de prevención de la agregación, o un agente de prevención de la agregación en una cantidad suficientemente baja para permitir la formación de macroagregados de citoquinas. Por ejemplo, II-2 se distribuye a menudo en presencia de SDS como un agente de prevención de la agregación, ya que se ha encontrado que, para aplicaciones de la técnica anterior, cuando SDS está presente en una cantidad mayor o igual a 95 μg de SDS por mg de citoquina, se evita la formación de macroagregados (véase, por ejemplo, EP1688146). Cuando se prepara la composición de la invención, tales macroagregados son exactamente requeridos; por lo tanto, cuando se parte de dicha solución que contiene SDS, la solución se puede diluir de manera que contenga menos de 95 μg de SDS por mg de citoquina. En una realización particular, la dilución se realiza en solución salina reguladora con fosfato (PBS).

Los inventores han encontrado que la formación de agregados tiende a ser un procedimiento dependiente del tiempo, esto es, cuando se permite la formación de agregados, los agregados tienden a crecer con el tiempo. Los macroagregados se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento. Por ejemplo, diluyendo una solución de citoquina que contiene SDS con PBS, de modo que la concentración de SDS se reduce por debajo de 95 μg por mg de citoquina, a cuya concentración se forman macromoléculas con relativa rapidez. Sin embargo, también se pueden formar macroagregados a concentraciones aún más bajas de SDS, o la ausencia completa de agentes que previenen la agregación, reduciendo así el tiempo en el que se obtienen macroagregados. Viceversa, los agentes de prevención de la agregación se pueden presentar en cantidades ligeramente mayores, lo que requiere tiempos de incubación más largos para la formación de macroagregados, pero todavía permiten la formación de macroagregados para obtener una composición de la invención.

Cuando la composición de la invención comprende material antigénico, como se ha descrito anteriormente, el procedimiento anterior puede comprender además la etapa

d) poner en contacto dicha solución que comprende macroagregados de citoquinas asociados con material antigénico.

Ejemplos

Ejemplo 1

Unión de IL-2 a alumbre usando IL-2 diluida en PBS

Se usó IL-2 humana recombinante (rhuIL-2, Proleukin/Roche) para este experimento. 1.1 mg de la proteína recombinante liofilizada de se disolvieron en 1.1 ml de agua pura. 180 μg de SDS están presentes como un agente de prevención de la agregación en el producto Proleukin, de este modo, la solución contiene aprox. 164 μg por mg de IL-2. A esta concentración, la IL-2 está predominantemente presente en microagregados de aprox. 9-17 nm.

La vacuna se preparó para la vacunación de 8 animales, recibiendo cada uno 0.2 ml con un exceso de aproximadamente 20%.

Materiales:

Se usó Rehydragel HPA, gel fluido (Reheis Inc. Berkeley heights NJ).

Concentración: 2.0% (= 20 g/l) de óxido de aluminio.

Preparación de los componentes de la vacuna:

1. se prepararon 500 µl de suspensión de alumbre, conteniendo 100 µg de alumbre a partir del stock de gel fluido Rehydragel por dilución con solución reguladora de PBS.

2. Se prepararon 500 µl de solución de macroagregados de IL-2 diluyendo 100 ul de la solución de rhuIL-2 con 400 µl de solución reguladora de PBS. Por consiguiente, la concentración de SDS se reduce a aproximadamente 33 µg por mg de IL-2, permitiendo así la formación de macroagregados como se demuestra además en el experimento de distribución de tamaños mostrado en la figura 11.

Preparación de los macroagregados de citoquinas adsorbidos en alumbre

Con el fin de mezclar los dos componentes muy rápidamente, se mezclaron ambas soluciones pipeteándolas simultáneamente muy rápidamente en un tubo, que al mismo tiempo se agitó vigorosamente en un vórtex. La mezcla se incuba adicionalmente durante 1 h en un rodillo a temperatura ambiente.

El resultado es una suspensión de macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre a una concentración de 10 µg de IL-2 adsorbida a 10 mg de alumbre en 1.0 ml.

En la figura 1a-d, se muestran los macroagregados de alumbre cargados con IL-2. La IL-2 se identifica por incubación con un anticuerpo IgG monoclonal específico para la IL-2 humana seguido por incubación con un anticuerpo IgG antiratón (h&I) de cabra marcado con AlexaFluor 488.

Los macroagregados de IL-2 se pueden reconocer en localizaciones como puntos sobre un gran conglomerado de alumbre (Figuras 1a y 1b). La partícula de alumbre grande mostrada en la figura 1 tiene un tamaño de aproximadamente 20 x 60 µm. El tamaño de los macroagregados de IL-2 como puntos sobre la matriz de alumbre se puede estimar entre 50 nm y 6000 nm. Los macroagregados de IL-2 de aproximadamente 100 nm de tamaño contienen aproximadamente 10^6 moléculas de IL-2, y estos agregados pesan aproximadamente 10 femtogramos. Se estima que los macroagregados de IL-2 más grandes de la figura 1a contienen aproximadamente 10^9 moléculas de IL-2 y pesan aproximadamente 10 picogramos. Dado que las diferentes citoquinas son de tamaños moleculares similares, este cálculo se refiere también a ellas.

Preparación de una vacuna que comprende material antigénico tumoral

Las células de carcinoma renal murino RenCa irradiadas se marcan con Texas Red N-Hidroxisuccinimida éster.

Las células tumorales irradiadas marcadas con Texas Red se suspenden en PBS en una densidad de 10 x 10^6 células por ml.

Se mezclaron poco antes de la aplicación 1.0 ml de los macroagregados de IL-2 adsorbidos en suspensión de alumbre y 1.0 ml de la suspensión de células.

Cada ratón recibe una inyección de 200 µl que contiene:

- 10^6 células tumorales irradiadas

- 10 µg de IL-2 adsorbida en

- 10 µg de alumbre

Cuando las células tumorales (teñidas con Texas Red) se adicionan a los macroagregados de IL-2 en alumbre, adicionalmente se agregan con los conglomerados de alumbre cargados con IL-2, como se ve en la figura 2. La IL-2 se identifica por incubación con un anticuerpo IgG monoclonal específico para la IL-2 humana, seguido de incubación con un anticuerpo IgG antiratón (h&I) de cabra marcado con AlexaFluor 488. Los macroagregados de IL-2 se pueden reconocer en localizaciones como puntos (2) sobre un gran conglomerado de alumbre. En la figura 2 se muestra una partícula de alumbre típica con agregados de citoquinas unidos en combinación con material antigénico. El tamaño de la partícula de alumbre ("conglomerado") es de aproximadamente 20 x 80 µm. La dosis completa de vacuna "lista para inyección" está compuesta por un millón o más de tales partículas de alumbre recubiertas de macroagregado de diferentes tamaños (que contienen un total de 10 µg de IL-2 unidos a 10 µg de alumbre y 10 x 10^6 células tumorales).

Las células tumorales y los fragmentos de células tumorales (1) se identifican mediante la fluorescencia roja de las células tumorales marcadas con Texas Red. La conversión a escala de grises los vuelve grises.

Ejemplo 2

Unión de IL-2 al alumbre usando IL-2 diluida en la solución reguladora que contiene SDS original.

Pero para la solución reguladora utilizada, el procedimiento es exactamente el mismo que el descrito para el ejemplo 1 anterior. En lugar de PBS se utiliza una solución reguladora que contiene todos los ingredientes, entre ellos SDS, ya que están contenidos en el liofilizado original en el que rhuIL-2 (Proleukin) es proporcionado por Novartis.

Las etapas adicionales en la fabricación de la IL-2 adsorbida en alumbre y la vacuna completa que contiene células tumorales de RenCa irradiadas fueron las mismas que se describieron en el procedimiento para el ejemplo 1.

En contraste con el patrón de tinción de fluorescencia inmune obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1, el patrón obtenido usando la solución reguladora que contiene SDS es completamente diferente: la rhuIL-2 unido al aluminio está distribuido uniformemente/homogéneamente sobre las partículas de alumbre, mostrando solamente ligeras agregaciones en alguna localización (véase la figura 4a). Como se describe en la información de prescripción de Proleukin, la IL-2 tratada mediante este procedimiento (180 μg de SDS por mg de IL-2) está presente en forma de microagregados solubles de aproximadamente 27 moléculas de IL-2 por agregados. Tales pequeños microagregados, que corresponden a una masa molecular de aprox. 500 kDa, no pueden ser identificados como agregados aislados, tal como se muestra en la figura 2, pero muestran la presente distribución de tinción homogénea en su lugar.

Se obtuvo la misma composición cuando se preparó una IL-2 adsorbida en un material de depósito siguiendo las instrucciones del documento US2002176845 (véase la figura 4b). La figura 4b muestra que las composiciones generadas usando los procedimientos del documento US2002176845 no contienen agregados con un diámetro mayor de 50 nm.

Ejemplo 3

Comparación de formulaciones de la técnica anterior y una composición de la invención

Los dos tipos de vacunas se aplicaron en experimentos de supervivencia terapéutica.

En estos experimentos terapéuticos, los animales se trataron con una dosis letal de 10^5 células tumorales RenCa vitales.

4 días más tarde se vacunaron los animales con vacunas que contenían 10^6 células tumorales RenCa irradiadas y 10 μg de IL-2 adsorbida a 10 μg de alúmina

- ya sea en PBS (Ejemplo 1)

- o en una solución reguladora que contiene SDS (Ejemplo 2).

Cuando se trataron con vacunas que contenían la IL-2 en forma de macroagregados adsorbidos en alumbre (Ejemplo 1), más animales sobrevivieron que en el grupo en el que los animales fueron tratados con vacunas que contenían IL-2 en forma monomérica o de microagregados (Ejemplo 2).

Observaciones similares se hicieron en experimentos en los que se usaron otras citoquinas.

Ejemplo 4

Uso de células tumorales irradiadas como un material de depósito

En estos experimentos se incubaron 10 x 10^6 células de melanoma murino B16 con 100 μg de rhuIL-2 (Proleukin) en forma de macroagregados, producida por dilución en PBS.

Después de la incubación, se centrifugaron las células y se ensayó el sobrenadante para determinar la presencia de IL-2 no unida mediante ELISA y mediante un ensayo biológico aplicando células CTLL-2 como indicadores de IL-2. 86% de la IL-2 adicionada se unió a las células tumorales.

En una serie de experimentos, otras células tumorales irradiadas:

- carcinoma renal murino RenCa,

- carcinoma de colon murino C26 Dunning,

- carcinoma de próstata de rata,

- células de carcinoma renal humano FA 144 aisladas del carcinoma renal de un paciente,

- células de carcinoma renal humano FA 152 aisladas del carcinoma renal de un paciente.

también fueron "cargadas" con macroagregados de IL-2.

La tasa promedio de carga fue del 85%.

Esto indica que las células tumorales irradiadas se unen de forma no específica a macroagregados de IL-2, y se pueden usar como un material de depósito en las formulaciones de la presente invención.

Después de la carga, las células cargadas con macroagregados de IL-2 se lavaron y la IL-2 unida a las células se identificó usando un anticuerpo IgG específico de IL-2, seguido de incubación con un anticuerpo IgG antiratón de cabra marcado con fluoresceína.

En la figura 3 se muestra un ejemplo de célula de melanoma murino B16 cargada con macroagregados de IL-2. Como se puede ver claramente, la tinción no es homogénea sino irregular, lo que indica que los macroagregados de IL-2 se han unido a la superficie celular, cuando se utiliza PBS libre SDS para la formación y carga de macroagregados.

Suponiendo un diámetro de célula de 10 μm, el tamaño de los agregados de IL-2 adsorbidos se puede estimar como que está en el intervalo de 50-100 nm.

Tales células cargadas con macroagregados de IL-2 se han usado en experimentos de vacunación terapéutica, en los que los ratones se vacunaron con 10^6 células de carcinoma renal RenCa cargadas con macroagregados de IL-2 irradiadas.

En estos experimentos la tasa de supervivencia más alta se obtuvo cuando los ratones fueron vacunados con 10^6 células tumorales irradiadas cargadas con 30 μg de IL-2, de las cuales una cantidad sustancial está presente en forma de macroagregados.

Se obtuvieron observaciones similares con las otras células tumorales indicadas anteriormente. Por consiguiente, en una realización particular de acuerdo con la presente invención, el material de depósito, presente dentro de las composiciones como se describe en este documento, consiste en células irradiadas, en particular células tumorales irradiadas.

Ejemplo 5

Aplicación de diferentes citoquinas en forma de macroagregados.

Con el fin de estimular varias armas del sistema inmune, se puede aplicar una combinación de citoquinas.

IL-2 estimula las células T y mejora la actividad de las células NK

GM-CSF & IL-4 están involucrados en el reclutamiento y maduración de células dendríticas

GM-CSF induce la vascularización del inóculo

IL-12 activa las células dendríticas

IFNalfa recluta y activa las células NK.

Mediante el uso de dicha mezcla de citoquinas se activan varias vías, esto es, células T CD8, células NK, células NKT, y anticuerpos, que son importantes para la inducción de una respuesta inmune antitumoral eficaz.

En un esfuerzo por evaluar los beneficios de una combinación de diferentes citoquinas en las formulaciones depot de la presente invención, se han realizado experimentos de vacunación en los que los ratones fueron vacunados contra células RenCa con ya sea; macroagregados de GM-CSF adsorbidos en alumbre;

macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre;

macroagregados de IL-4 adsorbidos en alumbre;

macroagregados de interferón alfa (IFNalfa) adsorbidos en alumbre;

la combinación de macroagregados de IL-4 y macroagregados de GM-CSF adsorbidos en alumbre;

la combinación de macroagregados de IL-4, macroagregados de GM-CSF, macroagregados de IL-2 y macroagregados de IFNalfa adsorbidos en alumbre.

En la preparación de estas vacunas de múltiples citoquinas se puede cargar cada citoquina por separado sobre el depósito (alumbre) y posteriormente mezclar los adsorbatos de citoquina-alumbre, o se pueden mezclar las citoquinas y adsorberlas como una mezcla en el depósito (alumbre).

Para cada una de las citoquinas se determinó la dosis óptima de citoquina unida al alumbre, y cuando se usaron en combinación con alumbre como depósito, se determinaron las siguientes dosis de citoquinas:

Para IL-2: 10 μg por dosis de vacuna

Para IL-4: 3-10 μg por dosis de vacuna

Para GM-CSF: 3-10 μg por dosis de vacuna

Para IL-12: 1-3 μg por dosis de vacuna

Para IFN alfa: 10-30 μg por dosis de vacuna.

La proporción de unión de citoquina a alumbre debe ser tal que el alumbre esté saturado con la citoquina, la mayoría de las cuales están en forma de macroagregados; en particular en una proporción de entre aproximadamente 3:1 y 1:1; más en particular en una proporción de aproximadamente 1:1.

Para un primer experimento de vacunación se usaron las siguientes preparaciones:

3 μg de macroagregados de IL-4 fueron adsorbidos en 3 μg de alumbre;

3 μg de macroagregados de GM-CSF fueron adsorbidos en 3 μg de alumbre;

y una mezcla de los mismos.

Después de la incubación y laminación, los adsorbatos de citoquina-alumbre se mezclaron y se adicionaron a células tumorales irradiadas.

En cada dosis de vacuna se incluyeron aproximadamente 43 μg de alumbre cargado con citoquina macroagregada y 10^6 células tumorales irradiadas.

Un total de 43 μg de alumbre por dosis de vacuna sigue siendo muy bajo en comparación con la dosis de alumbre contenida en las vacunas convencionales.

La vacuna se utilizó para experimentos de vacunación terapéutica de tumor.

Para un segundo experimento de vacunación se usaron las siguientes preparaciones:

Una preparación de control que contiene un antígeno marcado con Texas Red, un depósito de alumbre pero que carece de macroagregados de citoquinas adsorbidos en alumbre; y

una preparación de citoquinas macroagregadas que contiene un antígeno marcado con Texas Red y macroagregados de citoquinas adsorbidas en alumbre que consisten en;

10 μg de macroagregados de IL-2 fueron adsorbidos en 10 μg de alumbre;

2 μg de macroagregados de IL-4 fueron adsorbidos en 2 μg de alumbre;

3 μg de macroagregados de interferón alfa fueron adsorbidos en 3 μg de alumbre; y

3 μg de macroagregados de GM-CSF fueron adsorbidos en 3 μg de alumbre.

Se inyectaron ratones con dichas formulaciones depot y en diversos días se obtuvieron microfotografías de cortes de tejido preparados a partir de la inoculación situada de los ratones. (Véanse las figuras 6a-d).

Ni la formación de cápsulas, ni cualquier brote de capilares en y alrededor del inóculo se observan 11 días después de la vacunación, en los cortes de tejido de la preparación de control (Figura 6a). En los cortes de tejido para la preparación de macroagregados de citoquinas, al contrario, a los 11 días después de la vacunación, se produce una clara formación de cápsulas y brote de capilares dentro y alrededor del inóculo (Figura 6b).

Después de 19 días, el inoculo de las preparaciones de macroagregados de citoquinas está completamente encapsulado (Figura 6c) y la vascularización de esta cápsula y el sitio de inoculación (Figura 6b) permite que las células T auxiliares CD4 invaden la cápsula y el inóculo (Figura 6d).

Para un tercer experimento de vacunación, se usó la siguiente preparación:

Una vacuna que contenía células tumorales irradiadas marcadas con Texas Red, y macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre. 24 horas después de la inyección, se prepararon y tiñeron cortes de tejido del sitio del inóculo y del ganglio linfático drenante (Figura 6e y 6f, respectivamente). El área que rodea el lado del inóculo está rodeada de macroagregados de IL-2. Se observa que una célula dendrítica que aloja material antigénico tumoral, así como macroagregados de IL-2 de unión. Estas células dendríticas transportan los macroagregados de citoquinas al ganglio linfático que drena la zona del inóculo. Esto se evidencia por la presencia de pequeños agregados de IL-2 en dichos ganglios linfáticos (figura 6f). De interés es que, en presencia de IL-2, las células dendríticas CD86+ exponen CD25, lo que aumenta la afinidad del receptor de IL-2 por su ligando (Boyment & Sprent, Nature Reviews Immunology 12: 180-190). Es probable que estos receptores de afinidad aumentados que se unen a los macroagregados de IL-2, permitiendo así su transporte al ganglio linfático.

La abundancia de agregados de IL-2 que rodean el sitio del inóculo y su aparición en las fotografías puede explicarse de la siguiente manera: se inyectan macroagregados de citoquinas grandes asociados entre sí. En el entorno del fluido inflamatorio que rodea al inóculo, los macroagregados de citoquinas ya no están completamente estables y "explotan" y liberan macroagregados de menor tamaño. Estos infestan el medio ambiente del inóculo con agregados de citoquinas más pequeños (esto es, micro- así como macroagregados) y citoquinas monoméricas.

Los resultados obtenidos mostraron claramente que la mezcla de citoquinas adsorbidas en alumbre indujo mejores respuestas inmunes que los macroagregados de citoquinas adsorbidas en alumbre individuales y un mayor porcentaje de animales sobrevivió (Figura 5).

Por otra parte, la aplicación de mezclas de macroagregados de citoquinas adsorbidos en alumbre en las vacunas produjo resultados aún mejores que el macroagregados de una sola citoquina adsorbidos en alumbre. Como es evidente a partir de lo anterior, cuando se usa en combinación el inóculo de las preparaciones de citoquinas desarrolla propiedades de un órgano inmune artificial, comparable a un granuloma vascularizado.

Este órgano artificial tipo nódulo tiene varias propiedades muy específicas:

1. Mantiene las células tumorales inoculadas y las citoquinas adsorbidas en alumbre durante mucho tiempo en su lugar;

2. Induce fibroblastos para formar una cápsula alrededor de este;

3. Induce el brote de capilares en la cápsula y el inóculo, y, por ello, proporciona "supervivencia" y "nutrición" durante mucho tiempo y evita la degradación y eliminación del inóculo;

4. Las células dendríticas interactúan con el material de la célula tumoral antigénica y con los macroagregados de citoquinas y transportan éstos al ganglio linfático; y

5. Los linfocitos T (y las células NK) que han sido activados específicamente en el ganglio linfático por los antígenos tumorales presentados por células dendríticas, patrullan el organismo y buscan sus células tumorales objetivo. Los capilares les permiten entrar en el inóculo y finalmente encuentran su objetivo "real": las células tumorales.

Por consiguiente, en algún aspecto, el inóculo imita un tumor. Teniendo los macroagregados de citoquinas cargados en alumbre en proximidad cercana a las células tumorales irradiadas en el inóculo, las primeras reestimulan dichas células T circulantes (y otras células) cuando cumplen su objetivo en el sitio de inoculación.

Tomadas en conjunto, las propiedades especiales de estas preparaciones depot de macroagregados de citoquinas permiten la manipulación de la respuesta inmune a nivel del inóculo y al nivel del ganglio linfático. Este procedimiento abre una manera de manipular las reacciones inmunes en el ganglio linfático mediante el transporte de depósitos multi-moleculares de citoquinas biológicamente activas en el ganglio linfático.

Ejemplo 6

Preparación de la vacuna contra la difteria

Se prepararon macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre de acuerdo con el ejemplo 1.

El toxoide diftérico se adsorbió en alumbre como material de depósito. 1 μg de toxoide adsorbido sobre 1 μg de alumbre estaba presente por dosis de vacunación. Esto se mezcló con diferentes cantidades de complejos de

macroagregados de IL-2/alumbre (0, 1, 3 o 10 μg por dosis) para evaluar la adición de los macroagregados de citoquinas adsorbidos depot a vacunas virales.

Los ratones se inyectaron 3 veces con las vacunas y 14 días después de la última aplicación, se recogieron sueros del plexo retroorbital. Los títulos de anticuerpos en sueros se ensayaron usando ELISA con toxoide tetánico adsorbido en fase sólida. Los títulos de anticuerpo se definieron como la dilución a la que la densidad óptica a 450 nm alcanzó 1.0 en el ELISA indirecto.

Dosis de macroagregados de IL-2	Título de anticuerpo
0	1
1	20
3	300
10	10000

Como puede observarse a partir de los resultados, la adición de macroagregados de citoquinas adsorbidos depot mejora en gran medida los títulos de anticuerpos en una proporción dependiente de la dosis. La adición de 10 μg de alumbre de IL-2 incrementa los títulos de anticuerpos de difteria aproximadamente 10000 veces. De este modo, incluso cuando se usan cantidades muy bajas de material antigénico, las composiciones de la invención permiten la generación de títulos de anticuerpos altos.

Ejemplo 7

Preparación de la vacuna contra el tétanos

De forma similar al ejemplo 6, las vacunas contra el tétanos se crearon usando toxoide tetánico en lugar de toxoide diftérico. De manera similar, incluso cuando se usan cantidades muy bajas de macroagregados de citoquinas, los títulos de anticuerpos aumentaron significativamente.

Ejemplo 8

Preparación de las vacunas contra la hepatitis B

Se prepararon macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre de acuerdo con el ejemplo 1.

Se utilizó 1 μg de antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) adsorbida en 10 μg de alumbre por dosis de vacunación. La vacuna comprendía adicionalmente ya sea no o 10 μg de macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre. Se inyectaron por vía subcutánea las vacunas a ratones hembras Balb/cJRj de 5-6 meses. Los sueros se recogieron 33 días después de la inyección primaria y 14 días después de la inyección secundaria. Los títulos de anticuerpos se ensayaron en ELISA indirecto. Para este propósito, se aplicaron muestras de 100 μl de diluciones en serie de los sueros individuales a los pozos recubiertos con HBsAg de placas ELISA (0,1 μg HBsAg en 100 μl de solución reguladora de recubrimiento por pozo). La unión de anticuerpos se determinó aplicando anticuerpos IgG antiratón de cabra (Fcy) secundarios marcados con POD. Después de la adición del sustrato POD, se determinó el OD_{450} para varias diluciones de los antisueros. Los títulos de unión se definieron como la dilución a la que la densidad óptica a 450 nm alcanzaba 1.0.

A los 33 días después de la inyección primaria, el grupo que recibió la vacuna de HBsAg sin citoquinas adsorbidas en depósitos contenía 1 respondedor alto (título mediano = 300) y 7 no respondedores (título mediano = 0). Por el contrario, el grupo que recibió HBsAg con 10 μg de macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre consistió en 4 respondedores altos (título mediano de 1500), 3 respondedores bajos (título mediano de 60) y 1 no respondedor (título mediano = 0).

A los 14 días después de la segunda inyección, la vacuna de HBsAg dio lugar a 5 respondedores altos (título medio de 1500), 2 respondedores bajos (título mediano de 20) y 1 no respondedor (título mediano de 0). El grupo vacunado con la composición de la invención (HBsAg y 10 μg de macroagregados de IL-2 adsorbidos en alumbre) consistía en 7 respondedores altos (título mediano de 3810) y 1 no respondedor (título mediano = 0).

De este modo, no sólo las composiciones de la presente invención condujeron a títulos de anticuerpos más altos, sino que también generaron respuestas más temprano. Ya 33 días después de una sola inyección, el grupo que

recibió la vacuna con macroagregados de citoquinas adsorbidos en depósito tenía un perfil de anticuerpos similar al del grupo que recibió una dosificación doble de la vacuna estándar.

Además, se preparó una vacuna con IL-2 adsorbida en alumbre, en la que la IL-2 estaba presente como microagregados en lugar de macroagregados. A continuación, la IL-2 recombinante (Proleukin) se diluyó en una solución reguladora que contenía SDS para evitar la formación de macroagregados. Una dosis de vacuna contenía de este modo 1 μg de HBsAg, 10 μg de IL-2 adsorbida en alumbre, disuelta en una solución reguladora que contenía 160 μg de SDS por mg de IL-2, esto es, correspondiente a la solución reguladora de Proleukin. Este grupo fue peor que el grupo vacunado con la vacuna estándar (HBsAg).

Ejemplo 9

Vacunas contra la hepatitis B para pacientes intermedios y no respondedores

Similar al ejemplo 8, se prepararon diferentes vacunas de HBsAg. La vacuna estándar contenía 1 μg de HBsAg adsorbido en 10 μg de alumbre. Otras vacunas contenían, además:

- 10 μg de alumbre

- 10 μg de macroagregados de IL-2 adsorbidos en 10 μg de alúmina

- 3 μg de macroagregados de GM-CSF adsorbidos en 10 μg de alúmina

- 10 μg de macroagregados de IL-2 adsorbidos en 10 μg de alumbre + 3 μg de macroagregados de GM-CSF adsorbidos en 10 μg de alúmina

Se vacunaron ratones de tres diferentes cepas de ratón con las vacunas. Los ratones Balb-c son de respondedores altos, los ratones C57Bl/6 son respondedores intermedios, mientras que los SJL son no respondedores. Los sueros se recogieron xxx días después de la inyección y se determinaron los títulos como en el ejemplo 8.

Tabla 2: Mediana de títulos de anticuerpos de HBsAg por grupo

	Balb-c (resp. alta)	C57Bl/6 (resp. int.)	SJL (sin resp.)
HBsAg	350	150	100
HBsAg + AL	1300	780	30
HBsAg + IL-2/AL	4000	9000	2000
HBsAg + GM-CSF/AL	4800	1700	600
HBsAg + GM-CSF/AL + IL-2/AL	37000	16000	1600

De este modo, la adición de macroagregados de IL-2 o GM-CSF adsorbidos en alumbre conduce a mayores títulos de anticuerpos. Además, la combinación de macroagregados de IL-2 y GM-CSF conduce a una inmunización aún mejor. Sorprendentemente, se obtienen buenos títulos de anticuerpos en ratones no respondedores cuando se usan las composiciones de la presente invención. Cuando se usa HBsAg en combinación con macroagregados de citoquinas adsorbidas en alumbre, los ratones no respondedores muestran títulos de anticuerpos más altos que los ratones de alta respuesta que se vacunan con la vacuna estándar.

Ejemplo 10

Recuperación de la memoria de la hepatitis B

Las vacunas de hepatitis B se prepararon de acuerdo con el ejemplo 8 y contenían ya sea 10 μg de alumbre o 10 μg de alumbre a los que se adsorbían 10 μg de macroagregados de IL-2. Los ratones fueron vacunados por inyección intraperitoneal a 0, 4 y 8 semanas. Además, se realizaron experimentos separados de la misma manera, excepto que las inyecciones se realizaron por vía intramuscular, subcutánea o intradérmica.

A los 139 días después de la última inyección, los ratones se desafiaron con 1.0 μg de HBsAg soluble (esto es sin alumbre o IL-2). Esto tiene como objetivo imitar una infección natural de hepatitis B, que provocaría una respuesta inmune en un animal vacunado. Los títulos de anticuerpo se determinaron como en el ejemplo 8, antes del desafío

con HBsAG soluble y 14 días después. Los resultados para el experimento de inyección intraperitoneal de desafío se muestran en la figura 10. Como se puede ver, el desafío da lugar a títulos de anticuerpos aumentados en ratones vacunados con la vacuna "estándar" (que no contiene macroagregados de citoquinas). De hecho, en este grupo (1) los títulos de anticuerpos son mayores después del desafío (aC) que antes del desafío (bC). Sin embargo, los títulos aumentan mucho más en ratones que han sido vacunados con la vacuna de acuerdo con la invención (grupo 2). Observaciones similares se han hecho para ratones vacunados por vía intramuscular, subcutánea o intradérmica.

Ejemplo 11

Distribución de tamaños de macroagregados de citoquinas

Como en el ejemplo 1 anterior, en el presente experimento se utilizó IL-2 (Proleukin) de Novartis. 1 mg de IL-2 se contenía liofilizado en una ampolla de inyección.

El liofilizado contenía, además de 1.0 mg de IL-2, sustancias de solución reguladora y SDS (0.160 μg de SDS por mg de IL-2). El liofilizado se disolvió por inyección de 1.0 ml de agua estéril, filtrada por 25 nm. La solución transparente se retiró de la ampolla de inyección y se diluyó con 5 ml de solución salina reguladora con fosfato (PBS) estéril, filtrada por 25 nm.

Inmediatamente después de la dilución se llenó una muestra en una cubeta y se colocó en una máquina Zetasizer nano ZF. La dispersión de la luz se determinó a una longitud de onda de 633 nm en los puntos de tiempo 0h, 1h, 2h, 3h y 4h. La intensidad de dispersión de la luz se representó frente al tamaño de partícula de 1 nm a 10,000 nm.

Los resultados mostrados en la figura 11 proporcionan:

en el punto de tiempo 0h: la IL-2 está presente en la solución como una mezcla de principalmente nano agregados grandes de 20 nm. Además, se observan algunas partículas de 80 nm y pocas partículas de 300 nm. Sobre la base de un área bajo el análisis de la curva, este primer pico de partículas grandes principalmente de 20 nm (intervalo de aproximadamente 10 a 40 nm) representa aproximadamente el 65% del material, en el que el pico de las partículas de 80 nm más grandes (intervalo de aproximadamente 40 a 100 nm) representa aproximadamente el 25% y el pico restante de partículas de 300 nm (intervalo de aproximadamente 200 a 450 nm) representa aproximadamente el 10%. En otras palabras, desde el inicio y en ausencia de SDS, ya más del 25% de la IL2 está presente en la forma de macroagregados.

Después de 1 h, la mayoría de las partículas estaban presentes como partículas de 110 nm. En dicho ejemplo, el pico de 20 nm ha desaparecido completamente y no se han encontrado partículas por debajo de 15 nm. Además, sólo se encontraron unas pocas partículas de 20 nm. Basándose en un área bajo el análisis de la curva, este primer pico de partículas principalmente de 20 nm representa solamente aproximadamente el 6.5% del material.

Durante el curso posterior del experimento, el tamaño de las partículas sólo aumentó adicionalmente:

- después de 2 horas un pico de 80 nm y un pico de partículas de 200 nm, sin partículas por debajo de 60 nm y el pico de arrastre que representa aproximadamente el 17% del material.

- después de 3 h un pico de 200 nm y un pico de partículas de 700 nm, sin partículas por debajo de 100 nm.

- después de 4 h un pico de 200 nm y un pico de partículas de 1100 nm, sin partículas por debajo de 150 nm;

- después de 5 h, un pico de 500 nm y un pico de partículas de 3000 nm (datos no mostrados)

Ejemplo 12

Influencia del tamaño de partícula sobre los títulos de anticuerpos

En estos experimentos se investigó el efecto del tamaño de partícula sobre los títulos de anticuerpos en una configuración de vacunación. El tamaño de partícula de los agregados de citoquinas se controló por la presencia o ausencia de SDS en la preparación de la vacuna, en el presente caso usando el antígeno del virus de la hepatitis B (HBsAg).

El experimento se realizó de la siguiente manera:

cada ratón se inyectó con 1.0 μg de HBsAg adsorbidos en 10 μg de alumbre mezclado con 10 μg de rhuIL-2 adsorbidos en 10 μg de alumbre, en donde en el grupo control se preparó la rhuIL-2 adsorbida en 10 μg de alumbre en ausencia de SDS con la formación de macroagregados de la presente invención y en el grupo experimental se preparó la rhuIL-2 adsorbida a 10 μg de alumbre en presencia de SDS para mantener los microagregados.

Para el grupo experimental, el adyuvante de IL-2-alumbre se preparó de la siguiente manera:

La IL-2 (Proleukin) de Novartis se obtuvo como un liofilizado en una ampolla de inyección.

El liofilizado contenía, además de la rhuIL-2, todas las sustancias de la solución reguladora necesarias.

Con el fin de limitar la agregación 160 μg de SDS por mg de IL-2 estaban contenidos en el liofilizado. El liofilizado se disolvió por inyección de 1.0 ml de agua estéril en la ampolla de inyección. A continuación, la solución se retiró de la ampolla de inyección y se diluyó 5 veces.

Para el grupo experimental, el PBS usado para la dilución contenía 180 μg/ml de SDS.

Para los grupos de control se utilizó PBS sin SDS.

Después de varias horas, se adicionó una suspensión de alumbre en la concentración/densidad requerida.

El PBS sin SDS que contenía solución de IL-2 desarrolló turbidez en un tiempo muy corto.

El PBS con SDS que contenía solución de IL-2 no desarrolló turbidez.

preparación de la vacuna:

la solución que contenía alumbre y la solución que contenía IL-2 se mezclaron e incubaron en un rodillo durante una hora. Las vacunas obtenidas de este modo se inyectaron por vía subcutánea o intramuscular en ratones BALB/c.

Después de tres semanas, los ratones fueron reforzados con la misma vacuna siguiendo el mismo procedimiento.

De la sangre obtenida por punción del plexo retro-orbital se preparó el suero.

Los títulos de anticuerpo se determinaron mediante ELISA indirecto con anticuerpos IgG antiratón (específicos de Fc) de cabra marcados con peroxidasa.

Se definieron los títulos de anticuerpo como la dilución a la cual se obtuvo una densidad óptica a 450 nm de 1.0.

Para cada grupo se graficaron los títulos de anticuerpos y la media

Como puede verse claramente en la figura 12, los anticuerpos obtenidos en ratones después de la inmunización con una vacuna que contenía SDS eran significativamente más bajos que los títulos de anticuerpos obtenidos de ratones que habían sido vacunados con la vacuna "normal", que no contiene SDS.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende citoquinas, en la que al menos el 20% de dichas citoquinas están presentes en macroagregados de citoquinas con un diámetro promedio de al menos 50 nm, y en la que dichos macroagregados de citoquinas están asociados entre sí mediante:

- adsorción a un material de depósito, y/o

- encapsulación en liposomas.

2. La composición de la reivindicación 1, que comprende citoquinas diferentes en forma de macroagregados.

3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha(s) citoquina(s) se seleccionan independientemente del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, e IFN-alfa, en particular en la que al menos una citoquina es IL-2.

4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho material de depósito se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato de calcio, perlas de látex y microesferas o nanopartículas basadas en ácido poliláctico.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos liposomas son liposomas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además material antigénico.

7. La composición de la reivindicación 6, en la que el material antigénico se selecciona del grupo que consiste en células tumorales autólogas irradiadas, células tumorales alogénicas irradiadas, células tumorales xenogénicas irradiadas, homogenados de células tumorales, extractos de células tumorales, antígenos tumorales individuales (naturales o recombinantes), mezclas de antígenos tumorales (naturales o recombinantes), péptidos de antígenos tumorales (naturales o recombinantes).

8. La composición de la reivindicación 6, en la que el material antigénico es material antigénico microbiano y/o parasítico.

9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso como medicamento.

10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en el tratamiento y/o prevención de cáncer, tal como un cáncer seleccionado del grupo que consiste en el cáncer renal, hepático, de pulmón, de ovario, de próstata, del páncreas, estómago, de cabeza y cuello, carcinoma testicular, fibrosarcoma, melanoma, glioblastoma, linfomas, leucemias y mielomas; en particular carcinoma renal, carcinoma pancreático, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, y melanoma; más en particular carcinoma pancreático y renal y melanoma.

11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8, para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad infecciosa.

12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente un ingrediente farmacéutico adicional.

13. Un procedimiento de preparación de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una solución acuosa que comprende una citoquina; en el que dicha solución acuosa no contiene ningún agente que impida la agregación, o un agente de prevención de la agregación en una cantidad suficientemente baja para permitir la formación de macroagregados de citoquinas con un diámetro mayor de 50 nm;

b) incubar dicha solución acuosa durante un tiempo suficiente para agregar al menos el 20% de dichas citoquinas en macroagregados de citoquinas con un diámetro promedio de al menos 50 nm;

c) asociar dichos macroagregados de citoquinas mediante

- mezcla de dicha solución acuosa con el material de depósito, para adsorber dichos macroagregados de citoquinas al material de depósito; y/o

- encapsulación de dichos macroagregados de citoquinas en los liposomas.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicha solución acuosa comprende menos de 95 mg de SDS por mg de citoquina.

15. El procedimiento de la reivindicación 13 o 14, de preparación de la composición según la reivindicación 6, que comprende además la etapa

d) mezclar dicha solución que comprende macroagregados de citoquinas asociados con material antigénico.

Figura 1a

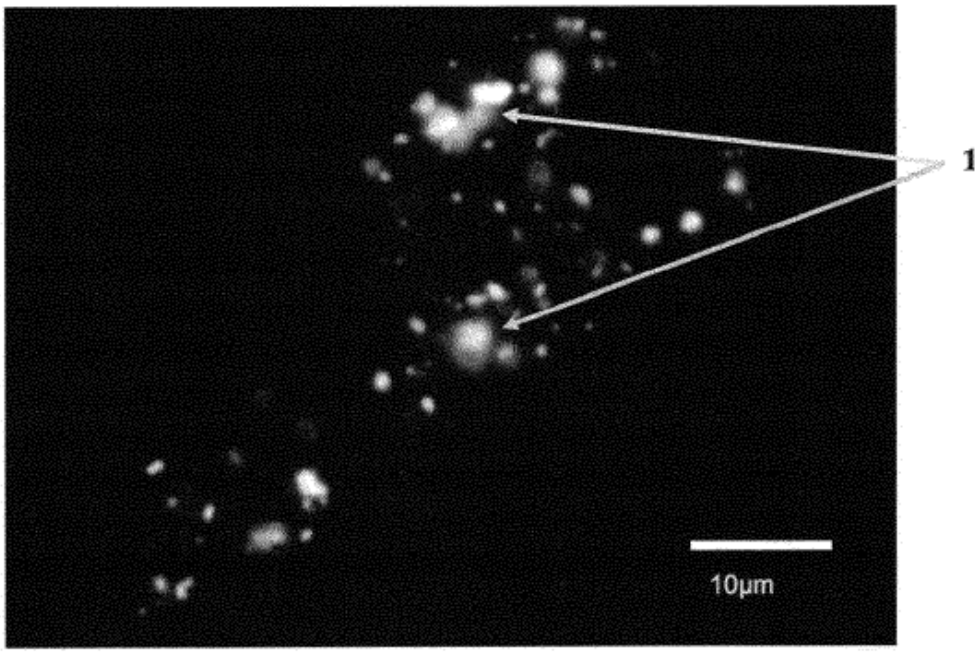


Figura 1b

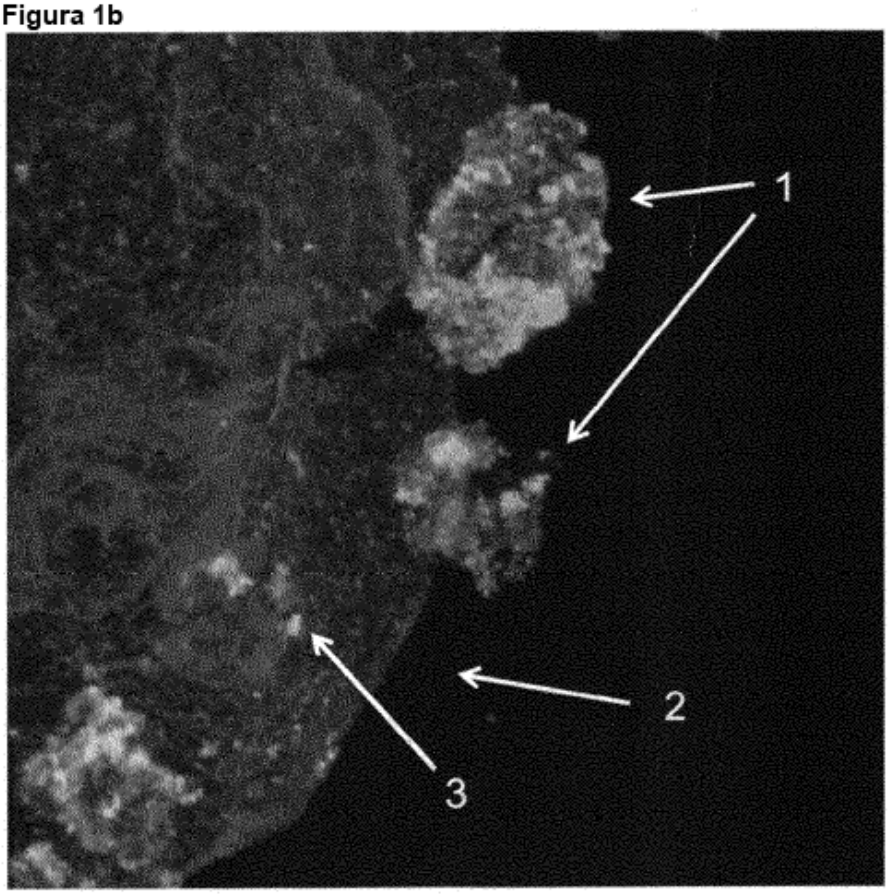


Figura 2

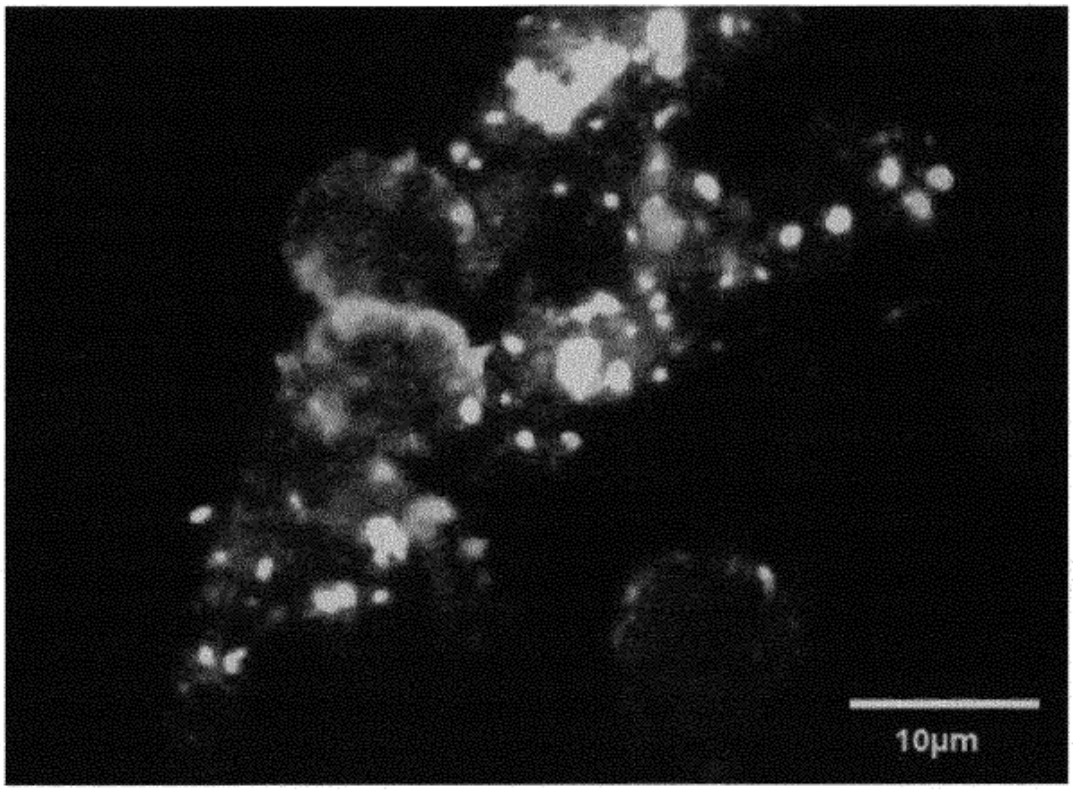


Figura 3

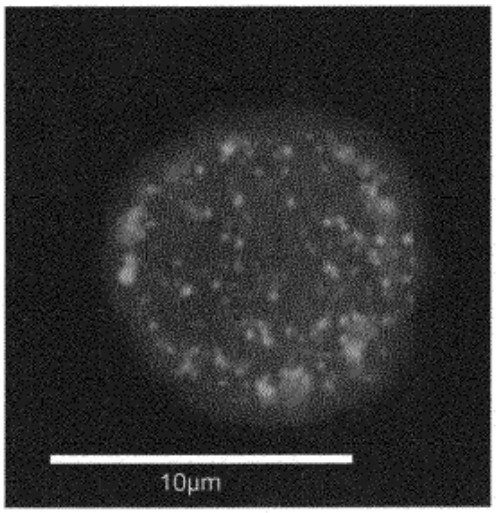


Figura 4a

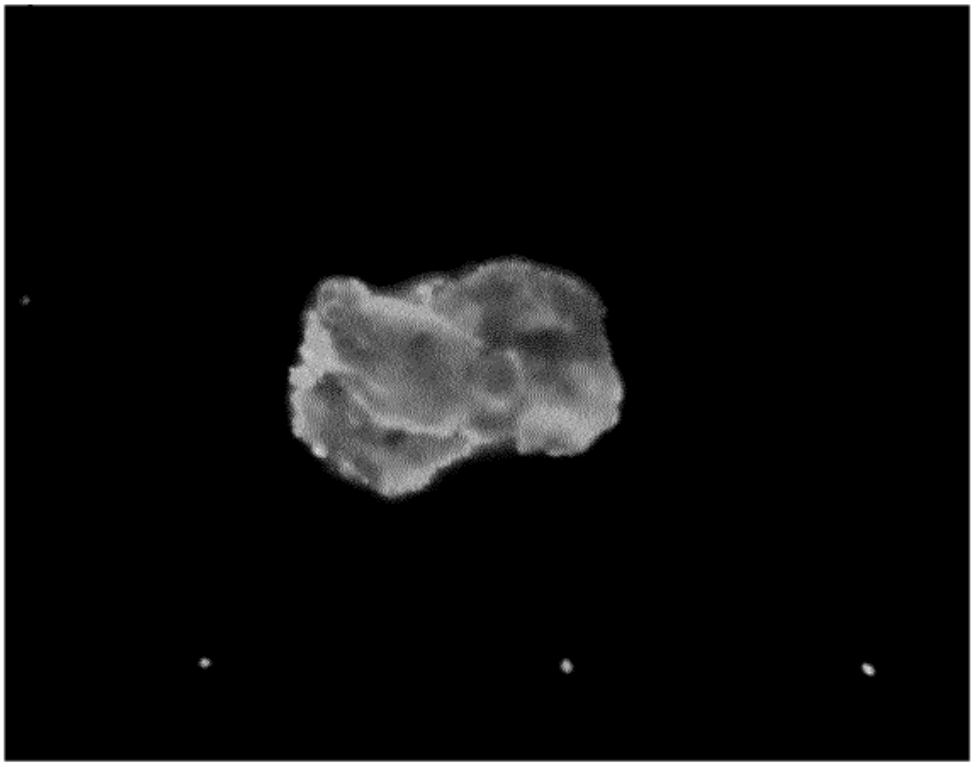


Figura 4b

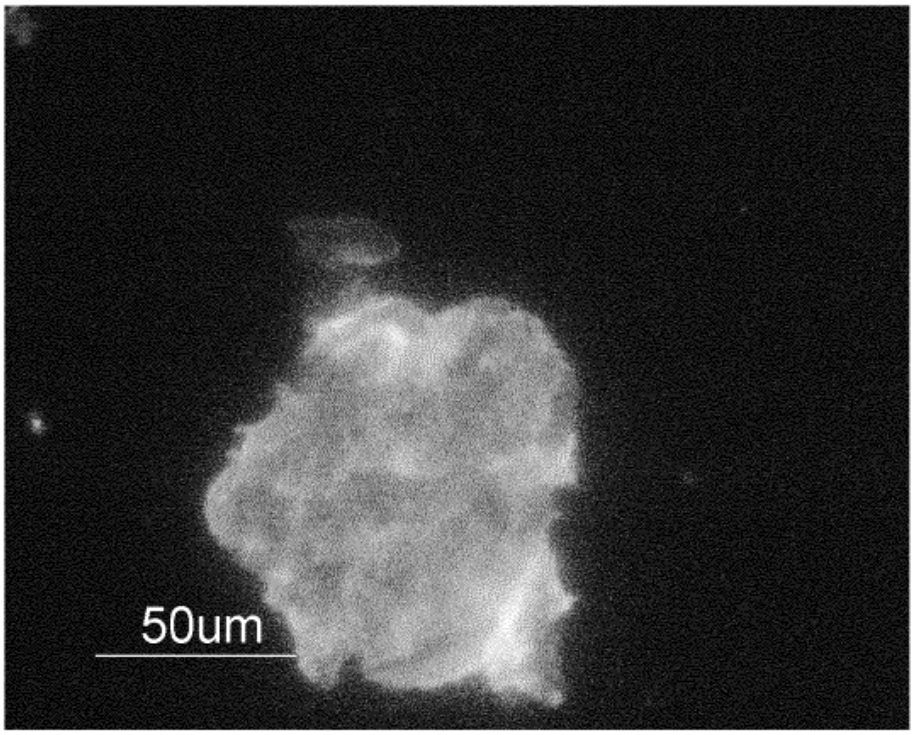


Figura 5

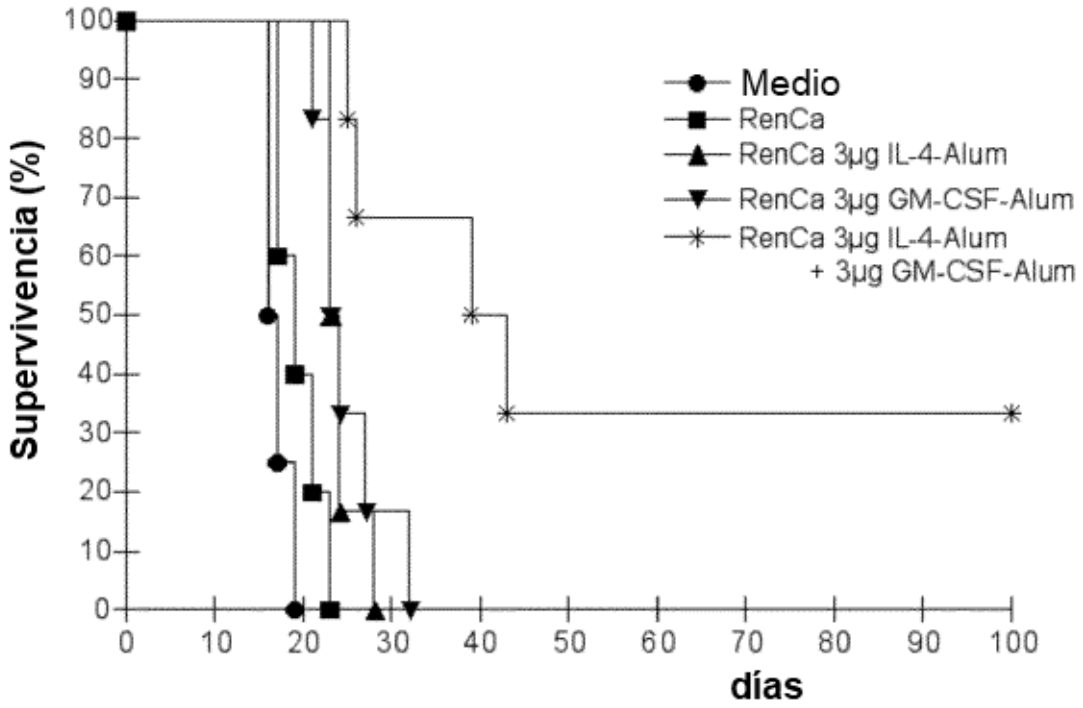


Figura 6a

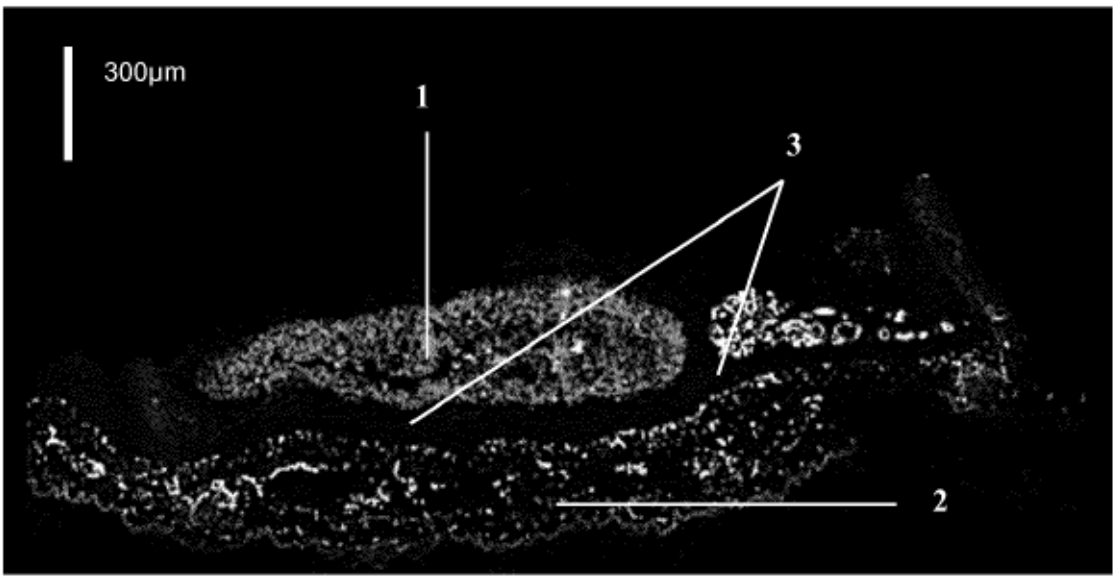


Figura 6b

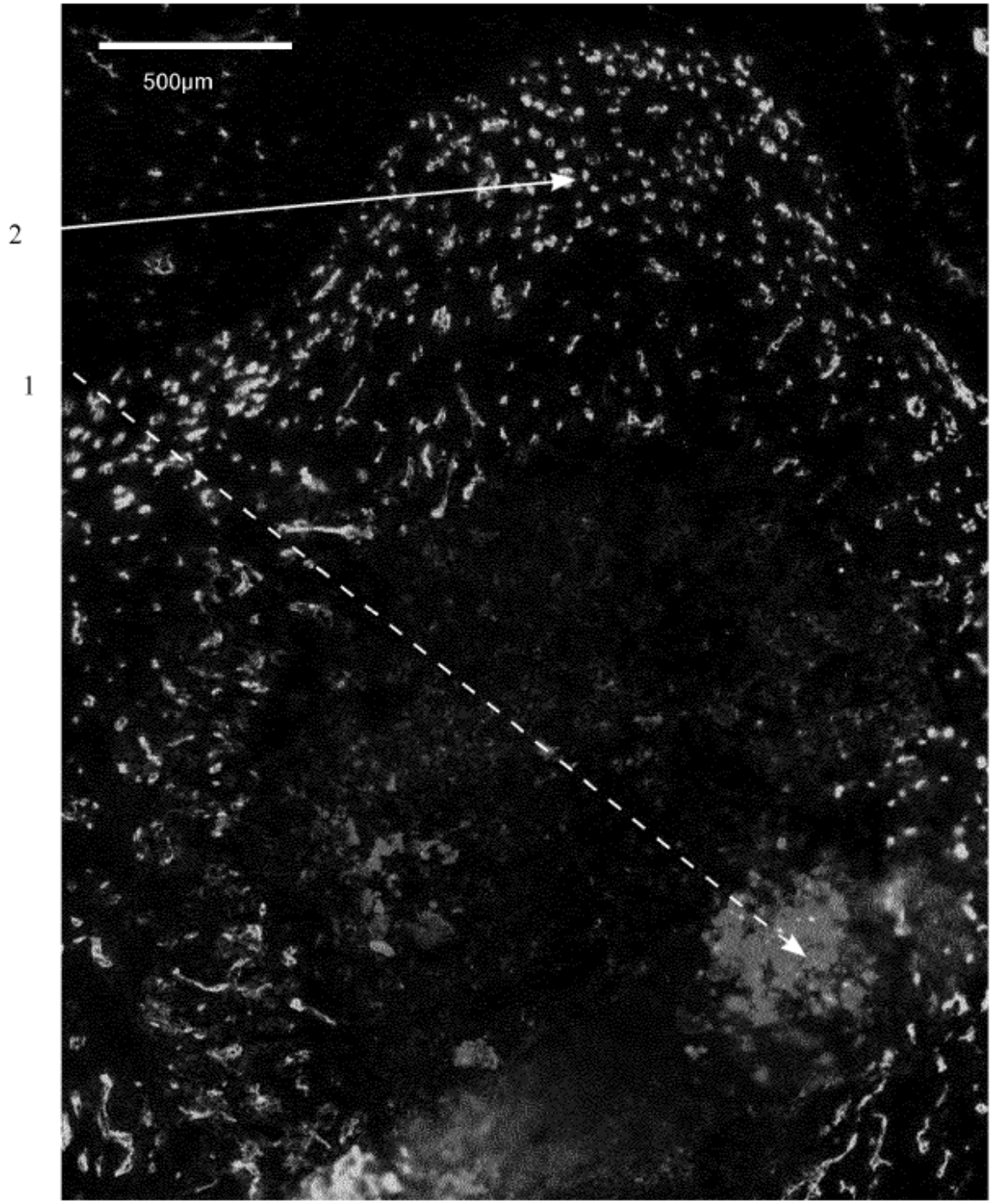


Figura 6c

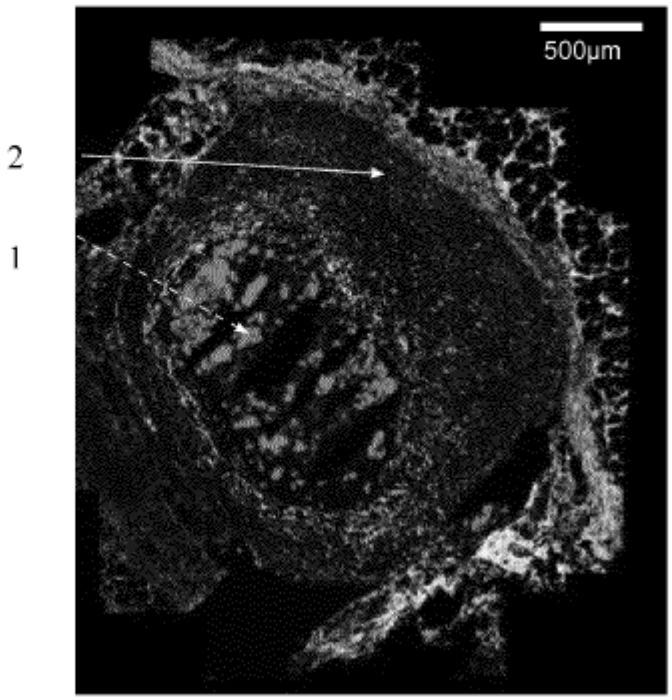


Figura 6d

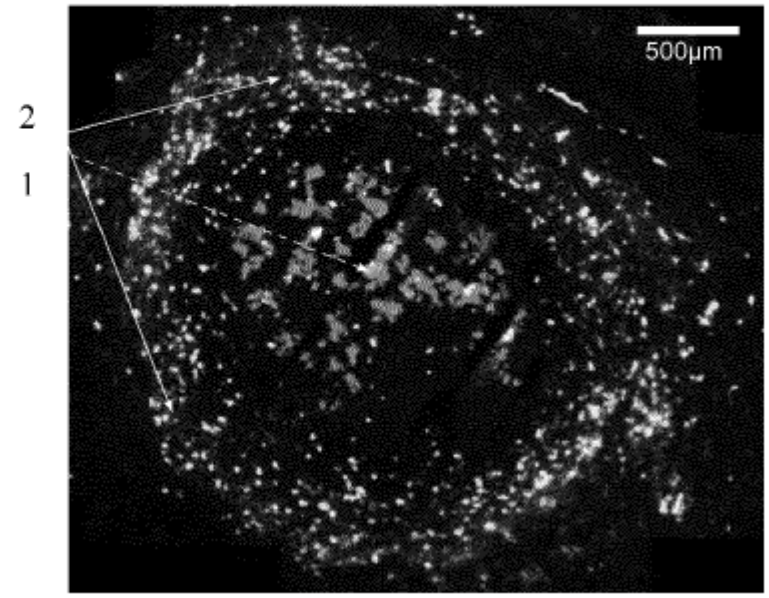


Figura 6e

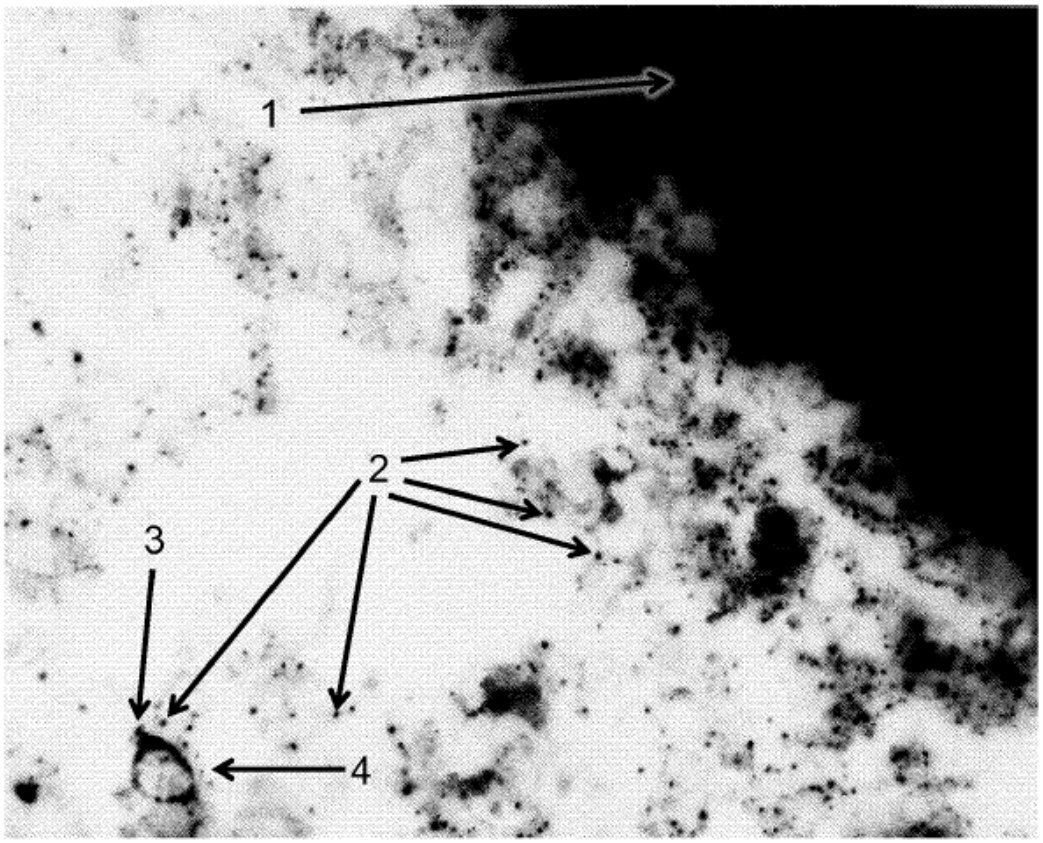


Figura 6f

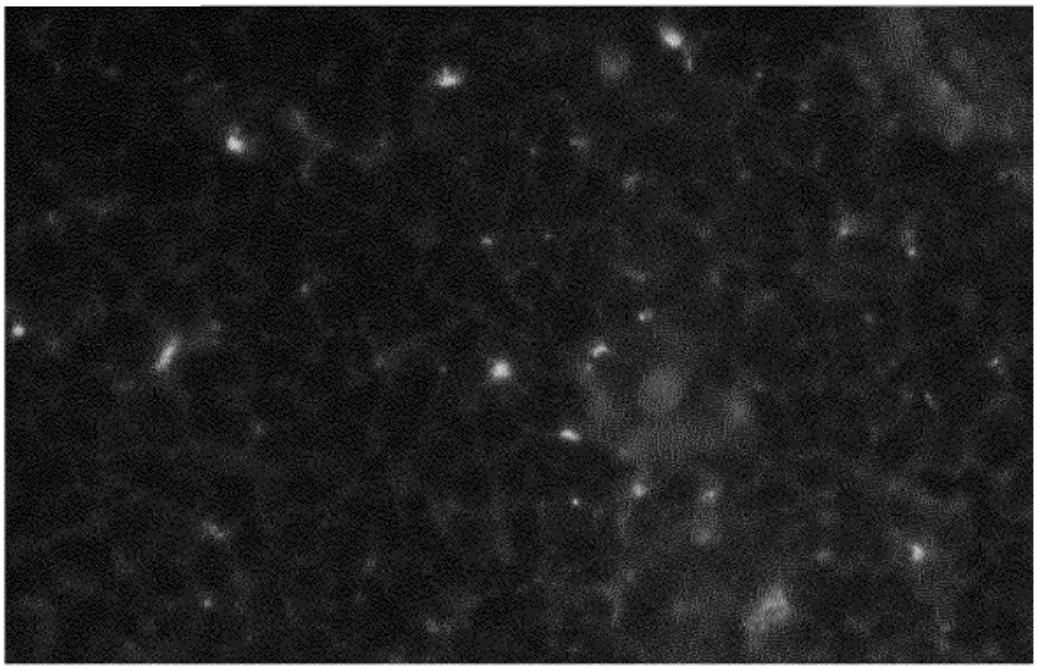


Figura 7a

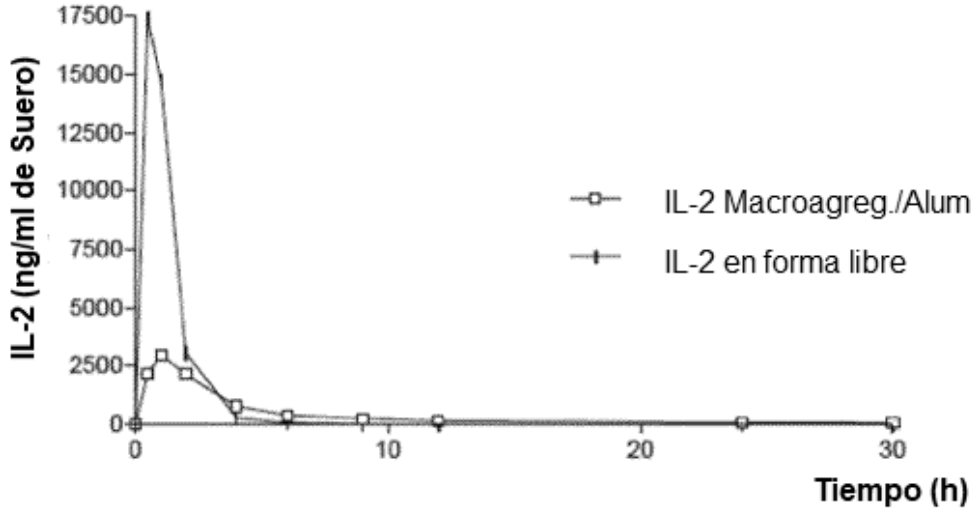


Figura 7b

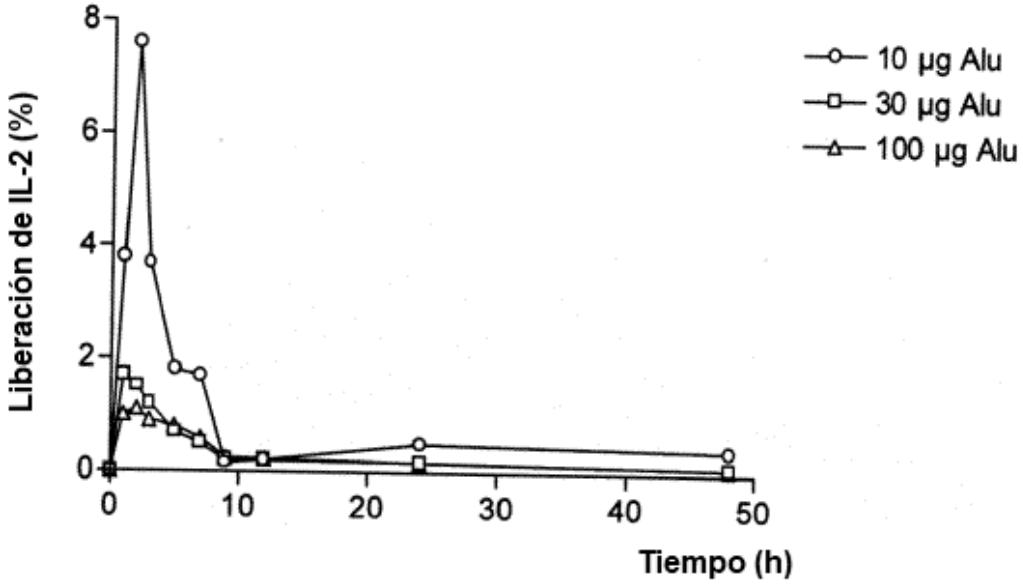


Figura 8

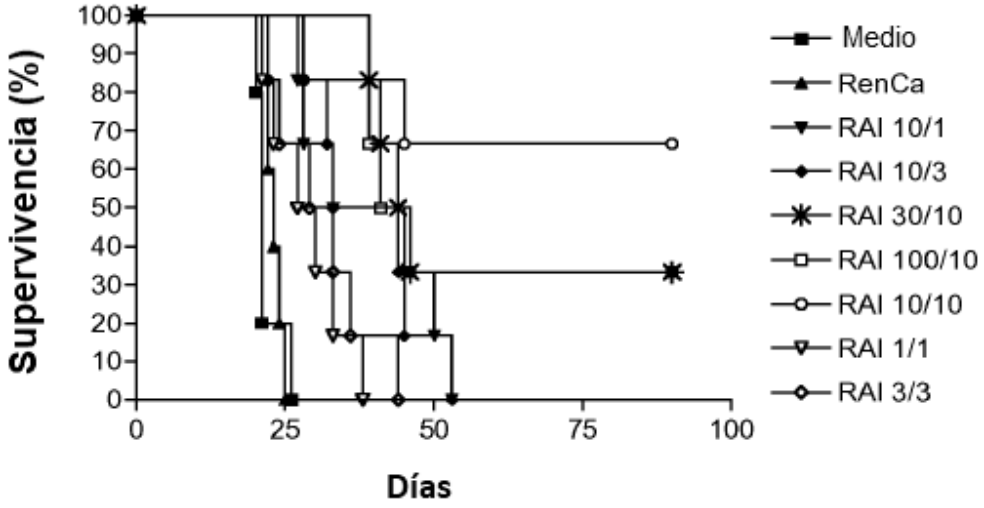


Figura 9

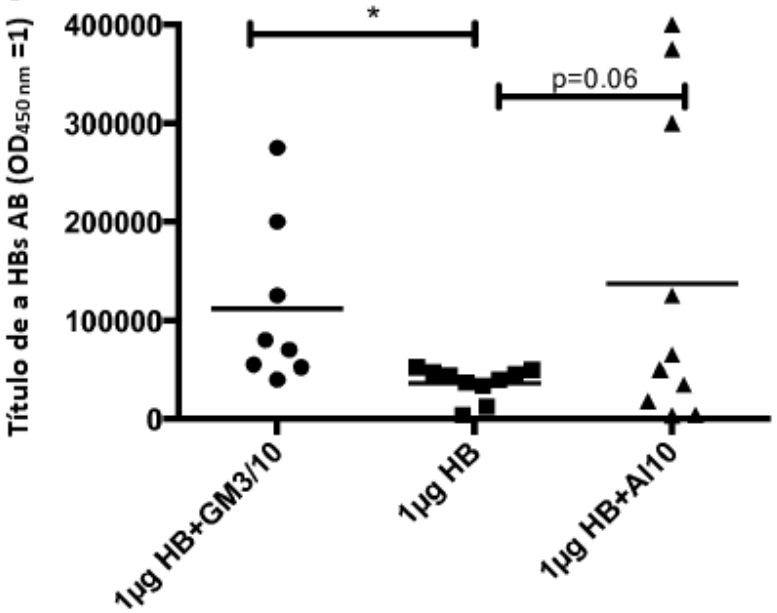


Figura 10

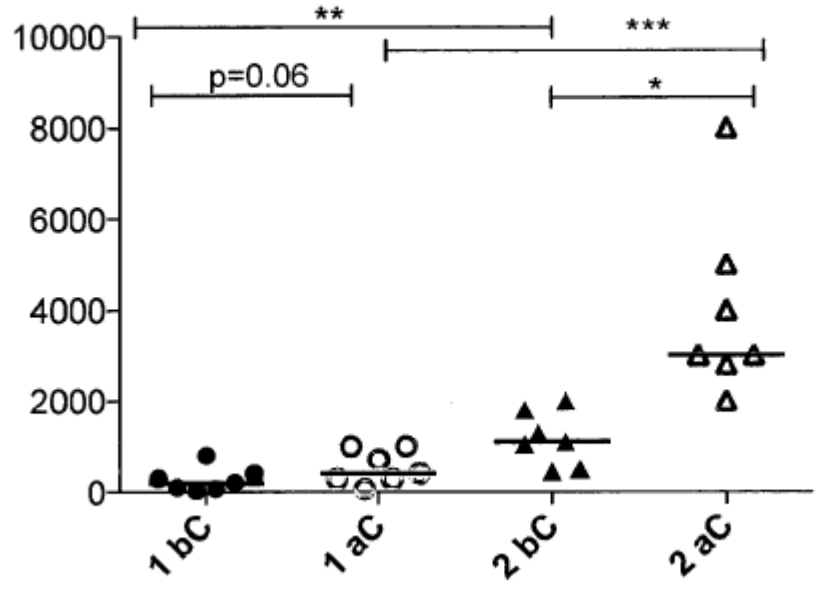


Figura 11

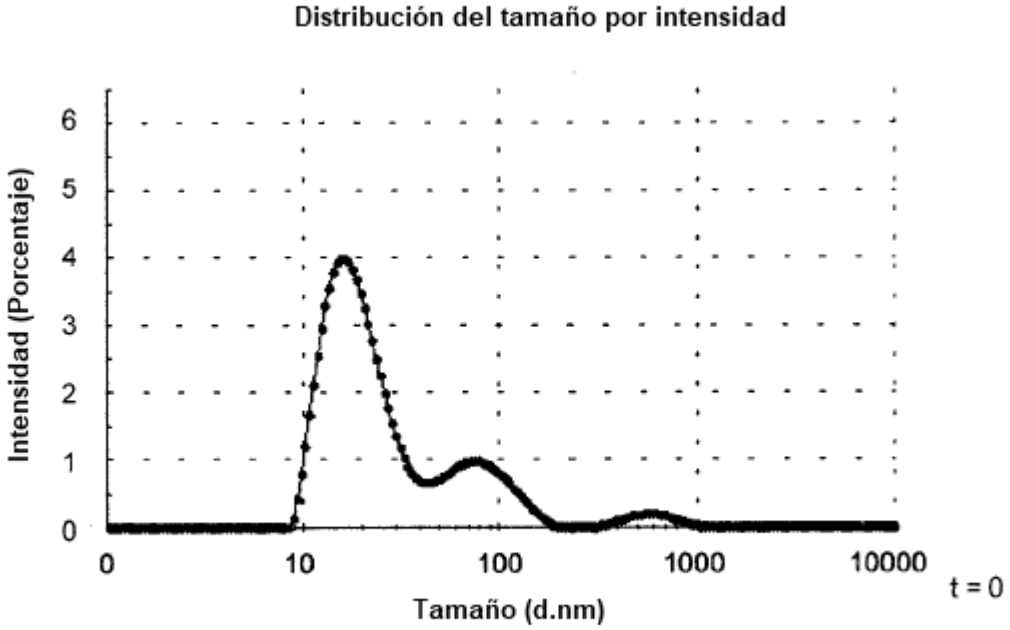
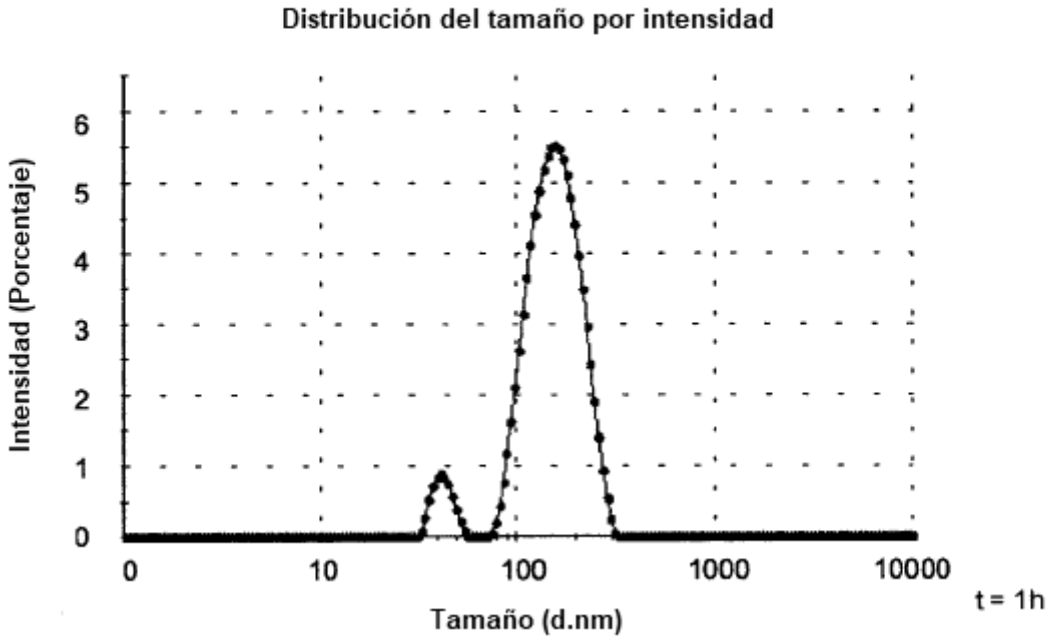


Figura 11 – continuación



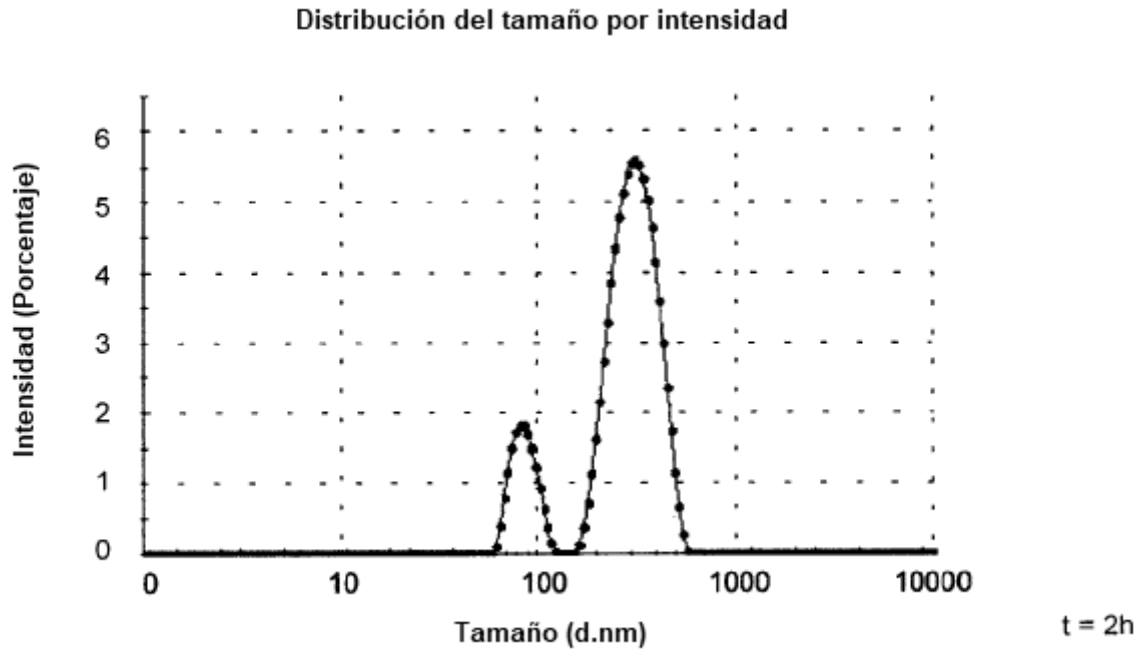
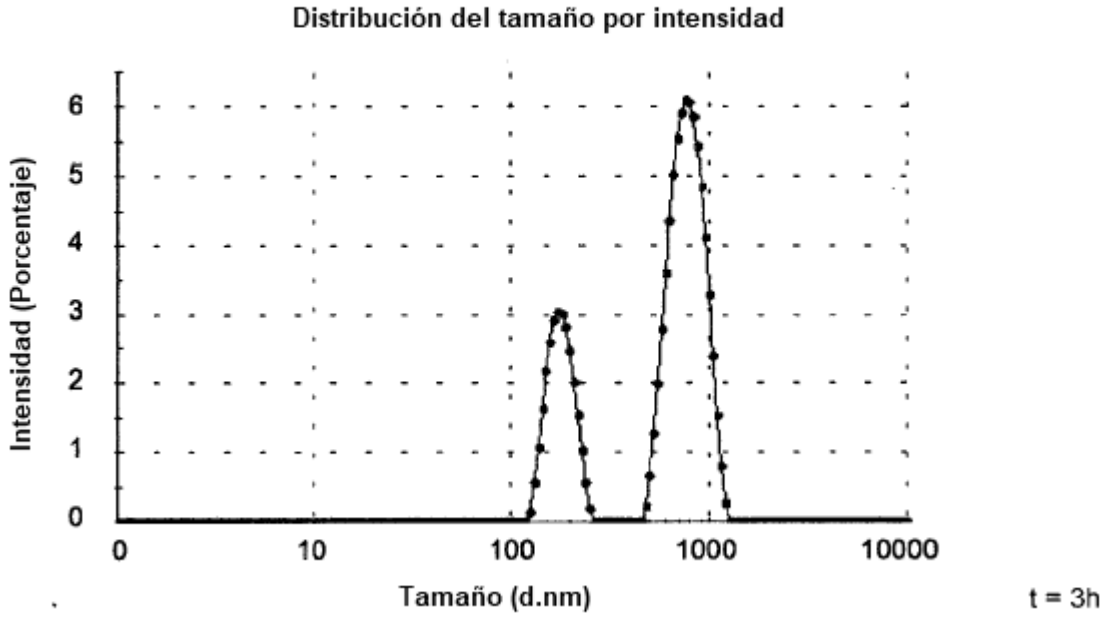
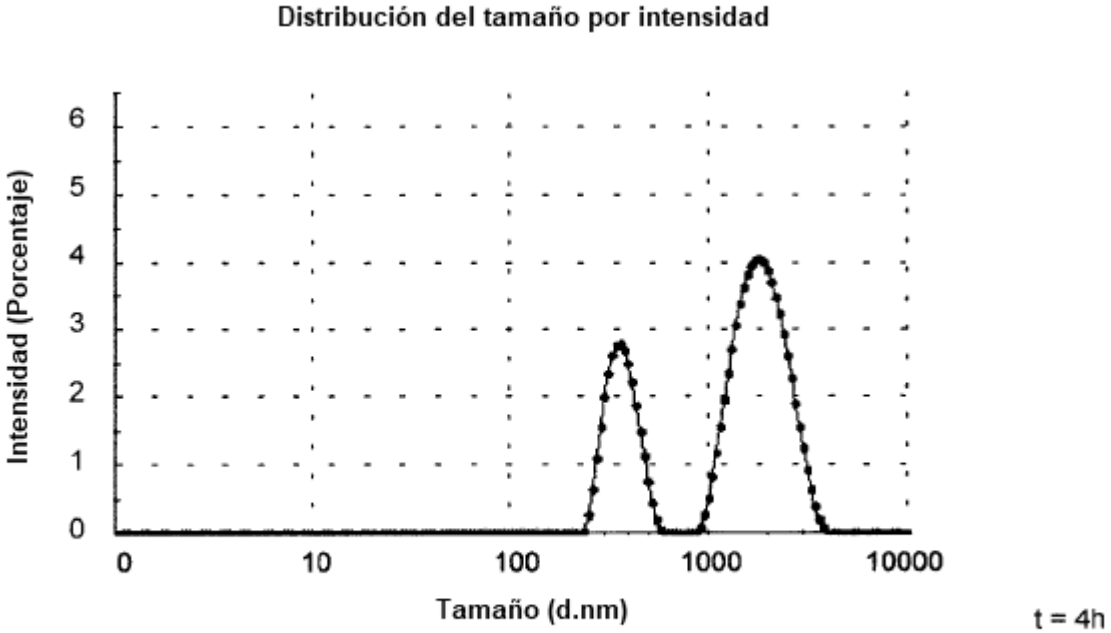


Figura 11 – continuación

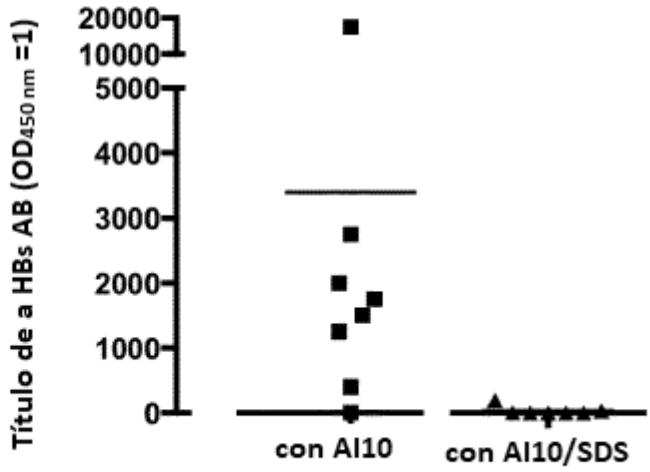


t = 3h



t = 4h

Figura 12


Título de a HBs AB (OD450 nm =1)
20000
10000
5000
4000
3000
2000
1000
0
con AI10
con AI10/SDS