

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 293**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2013** **PCT/IB2013/002372**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014** **WO14041427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2013** **E 13795566 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 2895192**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende una nanopartícula sólida y al menos un antígeno para el tratamiento frente a un agente patógeno intracelular**

30 Prioridad:

17.09.2012 EP 12370002

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

13.06.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE DROIT ET DE SANTÉ DE LILLE II
(33.3%)**

42 rue Paul Duez

59800 Lille, FR;

**UNIVERSITÉ DE TOURS FRANCOIS RABELAIS
(33.3%) y**

**CENTRE HOSPITALIER REGIONAL
UNIVERSITAIRE DE LILLE (33.3%)**

72 Inventor/es:

BETBEDER, DIDIER;

DIMIER-POISSON, ISABELLE y

DUCOURNAU, CÉLINE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

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

ES 2 672 293 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que comprende una nanopartícula sólida y al menos un antígeno para el tratamiento frente a un agente patógeno intracelular

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que se puede usar en el tratamiento preventivo de infecciones causadas por un patógeno intracelular tal como, por ejemplo, un virus, una bacteria o un parásito y más particularmente *Toxoplasma gondii*.

Antecedentes en la técnica

Toxoplasma gondii (en lo sucesivo en el presente documento *T. gondii*) es una especie de protozoo parásito del género *Toxoplasma*. El hospedador final de *T. gondii* son los felinos, pero el parásito puede portarse por parte de numerosos animales de sangre caliente (pájaros, ganado, ovejas y también seres humanos). El ciclo de vida de *T. gondii* tiene dos fases. La parte sexual del ciclo de vida (de tipo coccidio) tiene lugar solamente en los gatos, tanto domésticos como salvajes, lo que hace de los gatos el hospedador principal del parásito. La segunda fase, la parte asexual del ciclo de vida, tiene lugar en otro animal de sangre caliente denominado hospedador intermedio.

T. gondii existe en tres formas:

- El taquizoíto es siempre intracelular y se replica en las células del hospedador intermedio, la forma de taquizoíto no es contaminante y se puede destruir fácilmente cuando está en el exterior de la célula;
- El bradizoíto contenido en quistes, principalmente en los tejidos de los músculos y el cerebro del hospedador intermedio, donde la respuesta inmune es baja; esta forma es contaminante por vía oral;
- El esporozoíto contenido en los oocitos esporulados que es la forma capaz de sobrevivir fuera del hospedador intermedio y primario; esta forma también es contaminante por vía oral.

La toxoplasmosis, la enfermedad de la que *T. gondii* es el agente causal, es habitualmente minoritaria y autolimitante pero puede tener efectos graves o incluso fatales en el feto cuya madre contrae primero la enfermedad durante el embarazo o en un paciente inmunodeficiente. En el ganado y las ovejas, por ejemplo, la toxoplasmosis es la causa principal de aborto y de ese modo genera grandes pérdidas.

Recientemente, se ha postulado que el *Toxoplasma* tiene cierto grado de relación causal con la esquizofrenia. Este postulado descansa en las relaciones positivas entre la prevalencia de anticuerpos frente a *Toxoplasma* y el desarrollo de esquizofrenia. Este estudio proporciona un ejemplo del valor de integrar los efectos del comportamiento de *Toxoplasma* en modelos de afecciones emocionales y psiquiátricas (Yolken RH, Bachmann S, Rouslanova I, Lillehoj E, Ford G, Fuller Torrey E *et al.* Antibodies to *Toxoplasma gondii* in individuals with first-episode schizophrenia. Clin. Infect. Dis. 2001; 32: 842-44.). Debin *et al.* 2002, Vaccine 20:2752-2763 desvelan nanopartículas catiónicas para su uso como sistema de suministro de vacuna nasal para HBsAg. Paillard *et al.* 2010, Pharmaceutical Research 27:126-133 desvelan partículas de polisacáridos porosas cargadas positivamente cargadas con fosfolípidos que se absorben por parte de dichas partículas, y sugieren su uso como sistema de suministro de fármacos. Por lo tanto, un fin de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que permite una vacuna para el paciente frente a un patógeno intracelular, más particularmente frente a un parásito intracelular tal como, por ejemplo, un protozoo y más particularmente, *T. gondii*.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a una vacuna frente a un patógeno intracelular que comprende una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, la mezcla de:

- una nanopartícula sólida que comprende un núcleo de polisacárido catiónico poroso, cargada con al menos un fosfolípido aniónico y sin ninguna capa fosfolipídica rodeando a dicho núcleo;
- al menos un antígeno obtenido de dicho agente patógeno; y
- un disolvente farmacéuticamente aceptable.

Más particularmente, la invención se refiere a la composición farmacéutica mencionada anteriormente para su uso en el tratamiento profiláctico frente a un agente patógeno intracelular en un paciente o en el tratamiento profiláctico de una enfermedad o infección causada por un agente patógeno intracelular.

De acuerdo con la presente invención, el término "tratamiento" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o la mejora o la prevención de la enfermedad, afección, o trastorno, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como remisión, recuperación o disminución de síntomas o hacer la patología más tolerable para el paciente, ralentización en la velocidad de degeneración o declive, o hacer el punto final de la degeneración menos debilitante. El tratamiento o la mejora de los síntomas se pueden basar en parámetros objetivos o subjetivos,

incluyendo los resultados de un examen por parte de un médico.

El término "tratamiento" también se refiere a cualquier disminución de la cantidad del agente patógeno en el cuerpo del paciente o a cualquier alteración del agente patógeno, incluso en un periodo de tiempo corto. Cuando el agente patógeno tiene varias formas que incluyen formas extracelulares, una disminución o una modificación de al menos una forma del agente patógeno se considera como un efecto del tratamiento. Si el agente patógeno puede estar presente en varios órganos del cuerpo del paciente, una disminución de la cantidad del agente patógeno o una modificación del agente patógeno en al menos un órgano se considera como un efecto del tratamiento.

Por lo tanto, el término "tratar" incluye la administración de la composición de la invención para prevenir o retrasar, para aliviar, o para detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o las afecciones asociadas a una enfermedad, afección o trastorno que se describe en el presente documento. El término "terapéutico" se refiere al menos la reducción parcial, eliminación, o prevención de la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o los efectos secundarios de la enfermedad en el sujeto.

El término "profiláctico" significa que el tratamiento es capaz de prevenir o retrasar el inicio de la enfermedad, o es capaz de prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los disolventes, compuestos, materiales, composiciones, o formas de dosificación que son, dentro del ámbito del juicio médico razonable, adecuados para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, que correlacionan con una relación beneficio/riesgo razonable.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la invención se refiere a la composición mencionada anteriormente para su uso como medicamento y en particular como medicamento inmunogénico que permite una respuesta inmune celular en un paciente. Sin embargo, la presente invención no se limita a una respuesta inmune Th1 (respuesta celular). La composición farmacéutica también induce la producción de anticuerpos específicos (respuesta humoral) o induce ambas respuestas. En la presente invención, "respuesta inmune" significa cualquier reacción del sistema inmune, una respuesta inmune celular y/o una respuesta inmune humoral. Estas reacciones incluyen la alteración de la actividad del sistema inmune del organismo en respuesta a un antígeno y puede implicar, por ejemplo, producción de anticuerpos, inducción de inmunidad mediada por células, activación del complemento, o desarrollo de tolerancia inmunológica. La respuesta inmune puede ser una respuesta Th1 o una respuesta Th2 o una mezcla de las mismas. El término "inmunogénico" se refiere a la capacidad de inducir una respuesta inmune, directamente o no.

De acuerdo con la presente invención, el núcleo de la nanopartícula está cargado con al menos un fosfolípido. Por lo tanto, el núcleo sólido es poroso y los poros del mismo están llenos con un fosfolípido o una mezcla de al menos dos lípidos o fosfolípidos. El núcleo de la nanopartícula está hecho de un polisacárido catiónico o una mezcla de al menos dos polisacáridos catiónicos. También puede estar hecho de cualquier otro compuesto que se copolimerice o no con dicho polisacárido o polisacáridos catiónicos.

De acuerdo con la invención, el núcleo de la nanopartícula no está rodeado por ninguna capa fosfolipídica. Una capa fosfolipídica se define como una capa que comprende al menos un fosfolípido.

El polisacárido catiónico puede ser un polímero reticulado o se puede obtener por reacción entre un polisacárido elegido entre almidón, dextrano, dextrina, y maltodextrina, derivatizado con ligandos catiónicos tales como sal de amonio cuaternario. También se pueden usar aminas primarias, secundarias y terciarias. Más particularmente, el polisacárido catiónico se puede obtener a partir de la reacción entre maltodextrina y glicidil-trimetilamonio.

El fosfolípido aniónico se puede elegir entre fosfolípidos de glicerol y puede ser, por ejemplo, diacilfosfatidil glicerol tal como diacilfosfatidil serina, diacilfosfatidil inositol y dipalmitoilfosfatidil glicerol.

Los siguientes resultados experimentales muestran que al menos en el caso de *T. gondii*, la composición de la invención induce la producción de IFN- γ frente a *T. gondii*. En el caso de toxoplasmosis, se conoce que la resistencia del hospedador parece producirse a través de la síntesis de IFN- γ por las células NK y linfocitos T adaptativos. Después de la infección, las células presentadoras de antígeno sintetizan TNF- α e IL-12 que inducen a las células NK a segregar IFN- γ . La acción combinada de IL-12 e IFN- γ inducen una fuerte diferenciación de precursores colaboradores T en linfocitos Th1. Estos linfocitos T CD4+ sintetizan a continuación grandes cantidades de IFN- γ e IL-2. Estas dos citoquinas inducen finalmente la proliferación de linfocitos T CD8+ y la secreción de IFN- γ . De ese modo, la protección frente a la infección de *T. gondii* se atribuye principalmente a inmunidad mediada por células. Por lo tanto, la composición de la invención también protege al feto cuando la madre se ha tratado con la composición/vacuna de la invención.

De acuerdo con la invención, el agente patógeno intracelular es un patógeno intracelular que puede ser un virus, una bacteria, una micobacteria, un hongo o un parásito. Un agente patógeno intracelular se define como cualquier micro o macroorganismo que tiene al menos una forma intracelular. El término "patógeno" se refiere a un agente capaz de implicar cambios fisiológicos y/o psicológicos en el paciente o en la progenie o descendencia del paciente.

Los virus del herpes simple 1 y 2, virus del papiloma humano, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, *Mycobacterium tuberculosis*, virus de la fiebre del dengue, VIH, virus respiratorio sincitial humano (RSV), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C se pueden citar como ejemplos del agente patógeno intracelular.

5 Un "parásito" significa, de acuerdo con la invención, cualquier micro o macroorganismo que se beneficia a expensas de otro denominado "hospedador". De acuerdo con la invención, el término parásito incluye macroparásitos (por lo general helmintos) y microparásitos (por lo general protozoos) y todas las formas que puedan tener durante su ciclo de vida.

10 Cuando el agente patógeno es un parásito que tiene una forma intracelular durante su ciclo de vida, se puede seleccionar entre parásitos intracelulares apicomplejos, tales como, por ejemplo, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* spp., *Neospora caninum*, *Sarcocystis* spp., *Plasmodium* spp. (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi*, por ejemplo) y *Cryptosporidium* spp. También se pueden elegir entre *Acanthamoeba* spp., *Babesia* spp., *Balantidium coli*, *Blastocystis*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*,
15 *Giardia lamblia*, *Isospora belli*, *Leishmania* spp., *Naegleria fowleri*, *Rhinospordium seeberi*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei*, y *Trypanosoma cruzi*. Estos parásitos se conocen como parásitos al menos humanos y veterinarios.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "antígeno obtenido a partir de un agente patógeno" puede ser cualquier antígeno o mezcla del mismo conocido y ya usado para obtener una respuesta inmune en un paciente frente a dicho agente patógeno. Esta expresión se refiere a un antígeno o antígenos nativos o una mezcla de los mismos así como a un antígeno o antígenos recombinantes o una mezcla de los mismos o una mezcla o mezclas de antígenos nativos y recombinantes. El antígeno puede ser una proteína, en particular una proteína superficial. El término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia capaz de inducir por sí misma (directamente) una respuesta
25 inmune y/o a cualquier sustancia capaz de inducir una respuesta inmune por combinación con algunos productos de una respuesta inmune una vez se ha creado.

De acuerdo con la invención, el antígeno puede estar comprendido en cualquier forma del agente patógeno. El propio agente patógeno se puede usar vivo, eliminado o atenuado para proporcionar dicho antígeno o mezcla de los
30 mismos.

El antígeno o la mezcla de antígenos se puede obtener a partir de células infectadas. El patógeno intracelular contenido en estas células infectadas se extrae a continuación, por ejemplo, destruyendo la membrana celular. Dependiendo de la técnica que se use para lisar la membrana celular, el agente patógeno se puede eliminar al
35 mismo tiempo.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el antígeno se obtiene a partir de un agente patógeno previamente eliminado. Cuando el agente patógeno es un parásito y en particular un protozoo que puede ser un taquizoíto, el antígeno se puede obtener a partir de dicho taquizoíto y en particular de un taquizoíto eliminado previamente.

40 Los presentes inventores han descubierto que la forma de taquizoíto de *T. gondii*, que es intracelular pero no contaminante, proporciona al menos un antígeno eficaz para la profilaxis de la toxoplasmosis. El antígeno o antígenos pueden estar presentes en una mezcla obtenida a partir de células infectadas que contienen taquizoítos.

45 El término "paciente" se refiere a un animal de sangre caliente tal como un mamífero que está aquejado, o tiene el potencial de estar aquejado, de una o más enfermedades y afecciones que se describen en el presente documento. El término "paciente", como se usa en el presente documento, incluye tanto seres humanos como no humanos e incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos, especies ovinas (ovejas, cabras, etc.), especies caninas, especies felinas, especies murinas, especies bobinas, especies equinas, y especies porcinas. El paciente
50 puede ser un pájaro.

La presente invención también se refiere a una vacuna frente a un patógeno intracelular que comprende la composición farmacéutica de la invención y que comprende además un excipiente adecuado y/o un portador adecuado y/o un vehículo adecuado.

55 Los vehículos, excipientes, diluyentes y/o adyuvantes se eligen de acuerdo con la vía de administración. Se pueden elegir entre lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, celulosa, agua (estéril), metilcelulosa, hidroxibenzoatos de metilo y propilo, talco, estearato de magnesio, aceites comestibles, aceites vegetales y aceites minerales o las mezclas adecuadas de los
60 mismos. Las composiciones farmacéuticas pueden contener opcionalmente otras sustancias que se usan habitualmente en las formulaciones farmacéuticas, tales como agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulgentes y de suspensión, agentes dispersantes, agentes disgregantes, agentes estabilizantes, agentes isotónicos, agentes de volumen, cargas, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, agentes colorantes, agentes antibacterianos y/o agentes antifúngicos tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, agentes de dispensación, reguladores de flujo, agentes de liberación, etc.

El término "vacuna" se refiere a un producto capaz de prevenir la infección causada por un agente patógeno intracelular tras la exposición futura al mismo.

La composición y/o la vacuna de la invención se pueden administrar de forma diversa. Por ejemplo, la composición/vacuna se puede formular para que se administre por vía oral o tópica o enteral o no parenteral. Los términos "oral", "enteral", y las expresiones "por vía enteral", "por vía oral", "no parenteral" y "por vía no parenteral", y similares, se refieren a la administración de una composición a un individuo mediante una ruta o modo a lo largo del canal alimentario. Algunos ejemplos de rutas de administración "orales" de una composición incluyen, sin limitación, tragar las formas líquidas o sólidas de una composición de vacuna desde la boca, la administración de una composición de vacuna a través de un tubo nasoyeyunal o de gastronomía, la administración intraduodenal de una composición de vacuna, y la administración rectal usando, por ejemplo, supositorios.

La expresión "administrado por vía tópica" se refiere a la aplicación de un agente farmacéutico en la superficie externa de la piel o las membranas mucosas (incluyendo las membranas superficiales de la nariz, pulmones y boca), de un modo tal que el agente cruce la superficie externa de la piel o la membrana mucosa y entre en los tejidos subyacentes. La administración tópica puede dar como resultado una distribución limitada de la gente en la piel y los tejidos circundantes o, cuando el agente se retira del área de tratamiento por parte de la corriente sanguínea, la distribución sistémica del agente.

La vacuna de acuerdo con la presente invención se puede formular para administración intranasal. La expresión "administración intranasal" se refiere a cualquier forma de administración mediante la cual el principio activo se impulsa o introduce de otro modo en los conductos nasales de un sujeto de un modo tal que entre en contacto con el epitelio respiratorio de la cavidad nasal, del que se absorbe a la circulación sistémica. La administración nasal también puede implicar el contacto con el epitelio olfativo, que está situado en la parte superior de la cavidad nasal entre el tabique nasal central y la pared lateral de cada conducto nasal principal.

La presente invención también se refiere al uso de una nanopartícula que comprende un núcleo sólido de polisacárido catiónico que es porosa, cargada con un fosfolípido aniónico que no está rodeada por ninguna capa fosfolipídica, como adyuvante de la vacuna. Como se explica en lo sucesivo en el presente documento, las nanopartículas que se usan en la composición de la invención se pueden usar como adyuvantes de la vacuna y son al menos tan eficaces como la toxina del cólera.

El polisacárido y/o el fosfolípido o fosfolípidos se pueden elegir como se ha descrito anteriormente con respecto a la composición farmacéutica de la invención.

La presente invención también se refiere a un método para provocar una respuesta inmune frente a un patógeno intracelular en un paciente, comprendiendo dicho método administrar a un paciente una cantidad terapéutica de una composición de la invención o una vacuna de la invención.

De acuerdo con un aspecto del método de la invención, la respuesta inmune comprende una respuesta Th1.

La presente invención también se refiere al uso de una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para la fabricación de una vacuna frente a un agente patógeno intracelular.

De acuerdo con la presente invención, la cantidad de antígeno o antígenos contenida en la vacuna de la invención no se limita a un valor determinado. Por ejemplo, la composición puede comprender de 5 µg a 1 mg de antígeno o antígenos, más particularmente de 10 µg a 1 mg de antígeno o antígenos y, por ejemplo, de 15 µg a 200 µg de antígeno o antígenos.

La presente invención también se refiere a un kit que comprende una vacuna de la invención y un folleto.

Figuras

La Figura 1 muestra el análisis por ELISA de los anticuerpos IgG frente a *T. gondii* en suero de ratones Swiss tratados con tres administraciones intranasales (intervalo de 15 días entre cada administración) de DGNP, TE (extracto de antígenos total), una mezcla de TE y NPS y una mezcla de TE y DGNP, los análisis se llevaron a cabo el día de la primera administración, 14 días después de la primera administración (segunda administración), 28 días después de la primera administración (tercera administración) y finalmente 42 días después de la primera administración, respectivamente;

la Figura 2 muestra el análisis por ELISA de IFN-γ en los sobrenadantes de esplenocitos cultivados obtenidos a partir de los grupos de ratones tratados como se ha explicado en la Figura 1, después de la tercera administración intranasal;

la Figura 3 muestra las cargas de parásito de los cerebros de los ratones obtenidas por recuento con microscopio después de homogeneización del cerebro en los grupos de los ratones tratados como se ha indicado en la Figura 1 y después de infección con quistes de *T. gondii*, los resultados se obtienen 6 semanas después de la infección con *T. gondii*.

La Figura 4 muestra los resultados del análisis humoral de anticuerpos IgG frente a *Toxoplasma* en suero de ratones CBA/J tratados con tres administraciones intranasales de TE solo, DGNP solo, una mezcla de TE y DGNP, toxina del cólera (CT) sola, y una mezcla de TE y CT, respectivamente, obteniéndose dichos resultados 14 días después de la tercera administración intranasal, las cruces se refieren a ratones mientras que las rayas se refieren al valor medio obtenido para cada grupo de ratones; se han rodeado las cruces que se refieren a los ratones que tienen el valor de respuesta más fuerte en los grupos tratados con una mezcla de TE y DGNP y con una mezcla de TE y CT, respectivamente; también se han rodeado las cruces que se refieren a los ratones que muestran una respuesta humoral media para cada uno de los grupos citados anteriormente.

La Figura 5 muestra el análisis por ELISA de IFN- γ (pg/ml) en sobrenadantes de esplenocitos cultivados para cada grupo que se ha mencionado por referencia a la Figura 4 y después de la tercera administración intranasal; la Figura 6 muestra la producción de IFN- γ por parte de esplenocitos producidos en cada grupo de ratones como se ha definido por referencia a la Figura 4, dos semanas después de la tercera administración intranasal, las columnas de color gris oscuro se refieren a la producción de IFN- γ de los ratones que tienen la respuesta humoral más fuerte, en el grupo de TE-DGNP y en el grupo de TE-CT, respectivamente, mientras que las columnas de color gris claro se refieren a la producción de IFN- γ de los ratones que tienen una respuesta humoral media, en el grupo de TE-DGNP y en el grupo de TE-CT, respectivamente;

la Figura 7 muestra el número de quistes en el cerebro de los ratones para el grupo de los ratones sin tratar, los ratones tratados con tres administraciones intranasales de DGNP solo, los ratones tratados con tres administraciones intranasales de TE solo, los ratones tratados con tres administraciones intranasales de una mezcla de TE y DGNP, los ratones tratados con tres administraciones intranasales de CT solo y los ratones tratados con tres administraciones intranasales de una mezcla de TE y CT, respectivamente, obteniéndose dicho número de quistes dos semanas después de la tercera administración intranasal.

Parte experimental

Preparación de las nanopartículas

Las partículas de polisacárido se preparan a partir de maltodextrina de la farmacopea de Estados Unidos, como se ha descrito anteriormente (Paillard *et al.*, 2010). En resumen, se disolvieron 100 g de maltodextrina en hidróxido sódico 2 N con agitación magnética a temperatura ambiente. Además, se añaden 1-cloro-2,3-epoxipropano (epiclorohidrina) y cloruro de glicidil-trimetilamonio (hidroxicolina, ligando catiónico) para preparar el gel de polisacárido catiónico. A continuación, el gel se neutraliza con ácido acético y se aplica cizalladura a alta presión en un homogeneizador Minilab (Rannie; APV Baker, Evreux, Francia). Las nanopartículas de polisacárido de 60 nm obtenidas se someten a ultrafiltración en un sistema SGI Hi-flow (módulo de fibra hueca: 30 UFIB/1 S.6/40 kDa; Setric Genie Industriel, Francia) para retirar los reactivos de bajo peso molecular y las sales. Las nanopartículas obtenidas se denominan en lo sucesivo en el presente documento NPS.

Algunas de las NPS anteriores se cargan con fosfolípidos aniónicos. Los fosfolípidos aniónicos se cargan en estas NPS porosas por inyección de una solución en etanol de dipalmitoilfosfatidil glicerol (DPPG). Las nanopartículas porosas que contienen un fosfolípido se denominan en lo sucesivo en el presente documento DGNP. El núcleo de estas nanopartículas no está rodeado por ninguna capa de fosfolípidos.

Síntesis y purificación de extracto de antígenos total (TE) de *T. gondii*

Se obtienen taquizoítos de la división sucesiva de células HFF (*Human Foreskin Fibroblasts*, fibroblastos de prepucio humano). Se obtienen aproximadamente 1×10^8 taquizoítos de un frasco de cultivo de 225 cm² que corresponde a 200 μ g de TE. A continuación se lleva a cabo la lisis de los taquizoítos mediante ciclos de congelación/descongelación, se mezclan, se someten a ultrasonidos (2 x 10 mn, 60 W en hielo) y se evalúa la cantidad de proteínas mediante un método de micro BCA.

TE se refiere al producto obtenido de los taquizoítos de acuerdo con el proceso que se ha descrito anteriormente. TE se usa para la inmunización de ratones en combinación con nanopartículas (NPS y DGNP), revestimiento de ELISA y ensayo de reestimulación celular. TE es una mezcla de varios antígenos.

Vacunación y selección del protocolo de desafío entre NP y DGNP

Se determinaron las nanopartículas más eficaces como vehículos de antígenos basándose en la intensidad de las respuestas y la protección humoral y celular.

Se adquirieron ratones hembra adultos Swiss y CBA/J de 20-25 g y 6-8 semanas de edad en Janvier (Francia). Los experimentos con animales cumplieron con las reglamentaciones de ética y experimentos con animales del gobierno francés.

Los ratones Swiss recibieron un tratamiento intranasal, tres veces a intervalos de 15 días, con TE (10 μ g) y nanopartículas DGNP (30 μ g) solo (definidos como grupos de control) o con la combinación de TE + NPS, TE + DGNP (10 μ g de TE y 30 μ g de NPS o DGNP).

Cada dosis del extracto total (TE) mencionado anteriormente, las nanopartículas y las mezclas de los mismos se diluyó hasta un volumen final de 10 µl en solución salina tamponada con fosfato (fosfato 10 mM, NaCl 140 mM [PBS]) y se instiló en los orificios nasales de ratones no anestesiados con una micropipeta (5 µl/orificio nasal). Los ratones tratados se infectaron por vía oral con 50 quistes de la cepa de *Toxoplasma* 76 K un mes después del tratamiento y se siguieron mediante examen clínico durante un periodo adicional de 6 semanas.

Estudio de respuestas inmunes humorales

Se cuantificaron por ELISA IgG frente a *Toxoplasma* específicos en los sueros de los ratones tratados. La síntesis de IgG frente a antígenos de *Toxoplasma* se monitorizó de forma secuencial en los sueros. Los resultados se muestran en la Figura 1.

La Figura 1 muestra la densidad óptica (DO), medida en los sueros de los ratones tratados. La densidad óptica muestra el nivel de IgG sérica frente a *T. gondii*. DGNP se refiere a los ratones tratados con DGNP solo antes de la inyección, TE se refiere a los ratones tratados con el extracto de antígenos total (TE) solo antes de la inyección, TE-NPS se refiere a los ratones tratados con la mezcla de TE y NPS antes de la inyección, y TE-DGNP se refiere a los ratones tratados con la mezcla de TE y DGNP, antes de la inyección. D0 se refiere a la densidad óptica medida antes del tratamiento para cada grupo de los ratones tratados. D14 se refiere a la densidad óptica medida 14 días después de la primera administración intranasal, D28 se refiere a la densidad óptica medida 14 días después de la segunda administración intranasal y D42 se refiere a la densidad óptica medida 14 días después de la tercera administración intranasal.

Como se muestra en la Figura 1, los IgG frente a *Toxoplasma* específicos se pudieron detectar después de la segunda administración intranasal en los grupos de ratones inmunizados con TE-NPS o TE-DGNP. El efecto de potenciación debido a la tercera administración intranasal dio como resultado una fuerte inducción de la expresión de IgG, pero no se observaron diferencias significativas entre las dos nanopartículas. No se detectó ningún IgG en el grupo de los ratones tratados con TE solo.

Estudio de respuestas inmunes celulares:

Para investigar las respuestas inmunes celulares, se analizaron las citoquinas de esplenocitos, un fuerte biomarcador de inmunogenicidad de la eficacia de la vacuna, en los sobrenadantes de esplenocitos estimulados con *Toxoplasma* de los ratones tratados mencionados anteriormente, 3 semanas antes de la tercera administración intranasal. Las citoquinas (IFN-γ, IL-12, IL-10, IL-13, TNF-α, IL-5) se cuantificaron por ELISA.

Dado que IFN-γ derivado de linfocitos T también fue un valioso distintivo de inmunidad protectora en toxoplasmosis, se determinó IFN-γ mediante análisis por ELISPOT después de estimulación con antígenos de *Toxoplasma*.

Para investigar la respuesta inmune celular inducida después del tratamiento con TE-NPS, TE-DGNP, TE solo o nanopartículas solo, se evaluaron los sobrenadantes de las células cultivadas del bazo de 2 ratones de los diferentes grupos para la producción de IFN-γ, IL-10 e IL-12 en respuesta a reestimulación con TE (10 µg.ml⁻¹).

La Figura 2 muestra la concentración de IFN-γ (pg/ml) en los sobrenadantes de esplenocitos cultivados obtenidos a partir de los grupos de ratones tratados mencionados anteriormente.

Cada columna a la que se hace referencia como DGNP corresponde a un ratón tratado con DGNP solo. Cada columna a la que se hace referencia como TE corresponde a un ratón tratado con TE solo. Cada columna a la que se hace referencia como TE-NPS corresponde a un ratón tratado con una mezcla de TE y NPS. Cada columna a la que se hace referencia como TE-DGNP corresponde a un ratón tratado con una mezcla de TE y DGNP.

Como se muestra en la Figura 2, solo un ratón inmunizado con la mezcla de TE y NPS respondió a la estimulación con TE mediante la producción de IFN-γ por las células del bazo (175 pg/ml). Por el contrario, como se muestra en la Figura 2, se observó una producción específica de IFN-γ por las células del bazo de los 2 ratones inmunizados con la mezcla de TE y DGNP (237 y 375 pg/ml, respectivamente). En consecuencia, DGNP pareció ser más eficaz para inducir una respuesta inmune celular.

Evaluación de la cantidad de quistes en el cerebro de ratones tratados con una mezcla de TE y DGNP

Seis semanas después de la infección con *T. gondii*, los ratones se trataron con una mezcla de TE y DGNP y a continuación se infectaron con *T. gondii*, se sacrificaron y se recogieron sus cerebros. Se recogieron los cerebros de los ratones supervivientes 6 semanas después de la infección y se homogeneizaron en 5 ml de RPMI 1640 con un mazo y un mortero. Los quistes en cada homogenato de cerebro se contaron con un microscopio (10 recuentos, cada uno en 10 µl). Los resultados se expresan como los valores medios ± SEM para cada grupo. Los datos se analizaron estadísticamente usando el ensayo U de Mann-Whitney (software GraphPad prism), (P < 0,05). Los resultados se muestran en la Figura 3.

La Figura 3 muestra el número de quistes en el cerebro de los ratones para los ratones tratados antes de la infección con *T. gondii*, con DGNP solo (a lo que se hace referencia como DGNP), TE solo (a lo que se hace referencia como TE), con la mezcla de TE y NPS (a lo que se hace referencia como TE-NPS) y con la mezcla de TE y DGNP (a lo que se hace referencia como TE-DGNP).

Como se muestra la Figura 3, los ratones tratados con la mezcla de TE y DGNP tuvieron considerablemente menos quistes que los ratones tratados con de GNP, TE y las mezclas de TE y NPS, respectivamente (672, 1333, 1180 y 1072, respectivamente; $p < 0,05$). Los ratones tratados con la mezcla de TE y DGNP tuvieron un 56 % menos de quistes en sus cerebros. Estos resultados sugieren que el tratamiento (vacunación) con la mezcla de TE y DGNP induce una respuesta inmune celular y a continuación reduce la extensión de los parásitos y la formación de quistes en el cerebro.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se usaron las partículas DGNP para los siguientes experimentos de vacunación y para comparar el protocolo de vacunación con DGNP con el protocolo de vacunación con toxina del cólera (CT).

Comparación entre DGNP y toxina del cólera (CT)

Se trataron seis grupos de ratones 10 CBA/J mediante tres administraciones intranasales a intervalos de 15 días con TE (10 µg), nanopartículas (DGNP - 30 µg), toxina del cólera (CT - 0,5 µg) solos (definidos como grupos de control), con la combinación de TE + DGNP, TE + CT (10 µg de TE y 30 µg de DGNP o 0,5 µg de CT), respectivamente. El diseño experimental incluye un grupo de ratones sin tratar. Cada dosis de la toxina, las nanopartículas y las combinaciones (mezclas) mencionadas anteriormente se diluyó hasta un volumen final de 10 µl en solución salina tamponada con fosfato (fosfato 10 mM, NaCl 140 mM [PBS]) y se instiló en los orificios nasales de ratones no anestesiados con una micropipeta (5 µl/orificio nasal). Se realizaron cinco experimentos independientes.

Análisis de la respuesta humoral:

Se monitorizó la síntesis de IgG frente a antígenos de *Toxoplasma* en los sueros 14 días después de la tercera administración intranasal. El protocolo experimental se describe por referencia a la Figura 1. Los resultados se muestran en la Figura 4. La Figura 4 muestra la densidad óptica de los sueros obtenidos a partir de los ratones tratados mencionados anteriormente. La concentración de anticuerpo específico se da como la inversa de la mayor dilución que produce una densidad óptica (DO) que es 2,5 veces mayor que la de los sueros de los ratones sin tratar para la misma dilución. Los resultados se expresan como el valor medio del logaritmo de las concentraciones y la desviación estándar (S.D).

Como se muestra en la Figura 4, se detectaron IgG frente a *Toxoplasma* específicos en los grupos de ratones tratados con la mezcla de TE y DGNP y la mezcla de TE y CT. Como se muestra en la Figura 4, no se observó ninguna diferencia significativa entre los dos grupos. No se detectó ningún IgG en el grupo de los ratones inmunizados con TE, CT o DGNP solo.

Análisis de la respuesta celular:

Para investigar la respuesta inmune celular inducida después del tratamiento que se ha mencionado anteriormente, los sobrenadantes de las células cultivadas a partir del bazo de 2 ratones de los diferentes grupos indicados anteriormente en el presente documento se evaluaron para la producción de IFN-γ, IL-10, IL-13, TNF-α, IL-5 e IL-12 en respuesta a reestimulación con TE con un análisis por ELISA e IFN-γ con Elispot. Los resultados se muestran en la Figura 5.

La Figura 5 muestra la concentración de IFN-γ (pg/ml) en los sobrenadantes de esplenocitos cultivados para dos ratones de cada grupo que se ha definido anteriormente.

Como se muestra en la Figura 5, ambos ratones inmunizados con la mezcla de TE y DGNP y los ratones tratados con la mezcla de TE y CT, respondieron a la estimulación con TE mediante la producción de IFN-γ por las células del bazo. Los ratones inmunizados con una mezcla de TE y DGNP produjeron más de 400 pg/ml de IFN-γ. Los ratones tratados con TE y CT produjeron aproximadamente 1400 pg/ml de IFN-γ.

Además, la producción de IFN-γ por los esplenocitos se midió dos semanas después de la tercera administración intranasal. Los resultados se muestran en la Figura 6.

La Figura 6 muestra la producción de IFN-γ para dos ratones de cada grupo que se muestra la Figura 4. En lo que respecta al grupo tratado con una mezcla de DGNP y TE (DGNP-TE) y al grupo tratado con una mezcla de TE y CT (TE-CT), los resultados se obtienen para los ratones a los que se hace referencia con cruces rodeadas. Como se muestra la Figura 6, la producción de IFN-γ por los esplenocitos aumenta en los ratones vacunados con una mezcla de DGNP y TE. No se detectó la liberación de IL-12, IL-13, TNF-α e IL-5 en ninguna de las muestras analizadas.

Ensayo de infección

Los ratones tratados con tres administraciones intranasales de DGNP solo, TE solo, la mezcla de TE y DGNP, CT solo y la mezcla de CT y DGNP, respectivamente, se infectaron por vía oral con quistes de la cepa 76K de *T. gondii*.
5 También se infectó un grupo de ratones no tratados como control.

Porcentaje de supervivencia

La supervivencia de cada grupo se siguió durante 30 días después de la infección con 80 quistes. El número total de
10 animales sometidos a ensayo en cada grupo es n = 8.

Excepto un ratón en el grupo de control, todos los ratones mostraron rápidamente síntomas clínicos de la enfermedad, perdieron peso corporal y murieron en 11 días después de la infección, mientras que un 100 % de los ratones vacunados con la mezcla de TE y DGNP sobrevivieron durante el periodo experimental de 30 días.
15

Número de quistes en el cerebro de los ratones

Los ratones de cada grupo tratado se infectaron por vía oral con 50 quistes y se sacrificaron un mes después de la infección oral. La protección frente a *T. gondii* se evaluó midiendo el número de quistes en los cerebros de los ratones (tres experimentos con 50 quistes). El número total de animales sometidos a ensayo en cada grupo es n = 8. El protocolo es como se describe por referencia a la Figura 3. Los resultados se muestran en la Figura 7.
20

La Figura 7 muestra el número de quistes en los cerebros de los ratones de cada grupo. Como se muestra en la Figura 8, los ratones tratados con la mezcla de TE y DGNP antes de la infección con *T. gondii*, tienen considerablemente menos quistes que los ratones de control (611 frente a 1980 quistes, respectivamente; $p < 0,01$), lo que representa un 70 % de reducción. El grupo de los ratones tratados con una mezcla de TE y DGNP tuvo menos quistes que el grupo tratado con la mezcla de TE y CT. Los resultados mencionados anteriormente sugieren que la vacunación con la mezcla de DGNP y TE proporciona una protección a largo plazo.
25

REIVINDICACIONES

1. Vacuna frente a un patógeno intracelular que comprende una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, una mezcla de:
 - una nanopartícula sólida que comprende un núcleo de polisacárido catiónico, siendo dicho núcleo poroso y estando cargado con un fosfolípido aniónico; y
 - al menos un antígeno obtenido a partir de dicho patógeno intracelular; y
 - un disolvente farmacéuticamente aceptable,
 en la que el fosfolípido aniónico se selecciona entre diacilfosfatidil glicerol, diacilfosfatidil serina o diacilfosfatidil inositol, y en la que dicha nanopartícula no está rodeada por ninguna capa de fosfolípido.
2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho polisacárido catiónico es un polímero reticulado y se obtiene mediante la reacción entre un polisacárido elegido entre almidón, dextrano, dextrina, y maltodextrina, y al menos un ligando catiónico elegido entre una amina primaria, secundaria o terciaria y amonios cuaternarios.
3. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho polisacárido catiónico se obtiene mediante la reacción entre maltodextrina y glicidil-trimetilamonio.
4. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en la que dicho fosfolípido aniónico es dipalmitoilfosfatidil glicerol.
5. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho patógeno intracelular se elige entre virus, bacterias, micobacterias y hongos y más particularmente entre virus del herpes simple 1 y 2, virus del papiloma humano, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, *Mycobacterium tuberculosis*, fiebre del dengue, VIH, virus respiratorio sincitial humano (RSV), hepatitis A, virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C.
6. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho patógeno intracelular es un parásito intracelular y en particular un parásito intracelular elegido entre *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis* spp., *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp., *Acanthamoeba* spp., *Babesia* spp., *Balantidium coli*, *Blastocystis*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Isospora belli*, *Leishmania* spp., *Naegleria fowleri*, *Rhinosporidium seeberi*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*.
7. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho antígeno está comprendido en una mezcla obtenida a partir de un patógeno intracelular eliminado previamente.
8. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en la que dicho antígeno se obtiene a partir de la forma de taquizoito de dicho patógeno.
9. La vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento profiláctico frente a dicho agente patógeno intracelular en un paciente.
10. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho paciente se elige entre seres humanos, primates no humanos, ovinos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos, porcinos y pájaros.
11. Vacuna frente a un patógeno intracelular que comprende la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y que comprende además un excipiente adecuado y/o un portador adecuado y/o un vehículo adecuado.
12. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicha vacuna se formula para administración intranasal.
13. Nanopartícula sólida, para su uso como adyuvante de vacuna, comprendiendo dicha nanopartícula un núcleo de polisacárido catiónico poroso cargado con un fosfolípido aniónico elegido entre diacilfosfatidil glicerol, diacilfosfatidil serina o diacilfosfatidil inositol, y sin ninguna capa fosfolípida rodeando dicho núcleo.
14. Kit que comprende una vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 12 y un folleto.

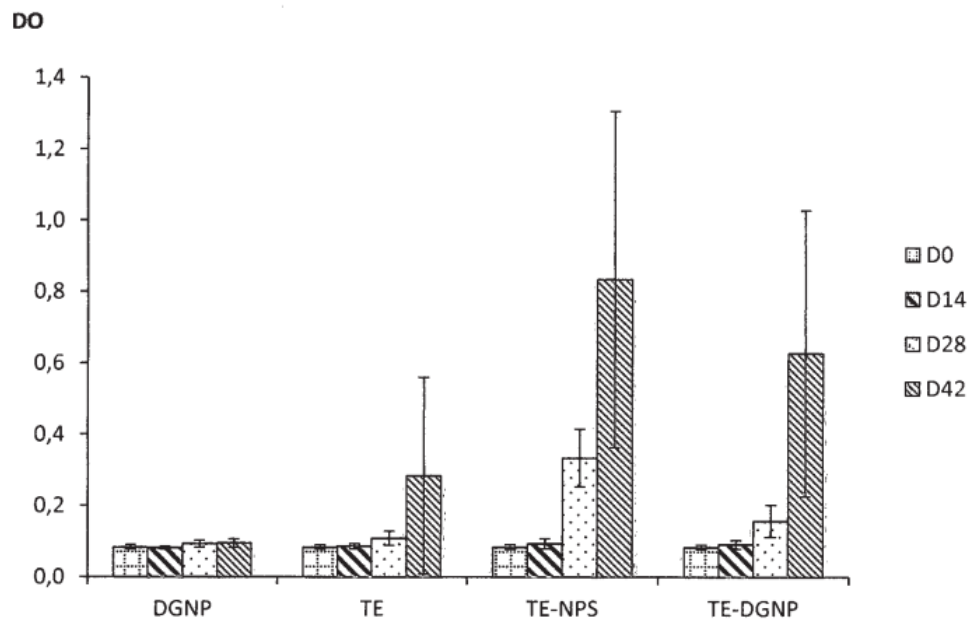


FIG. 1

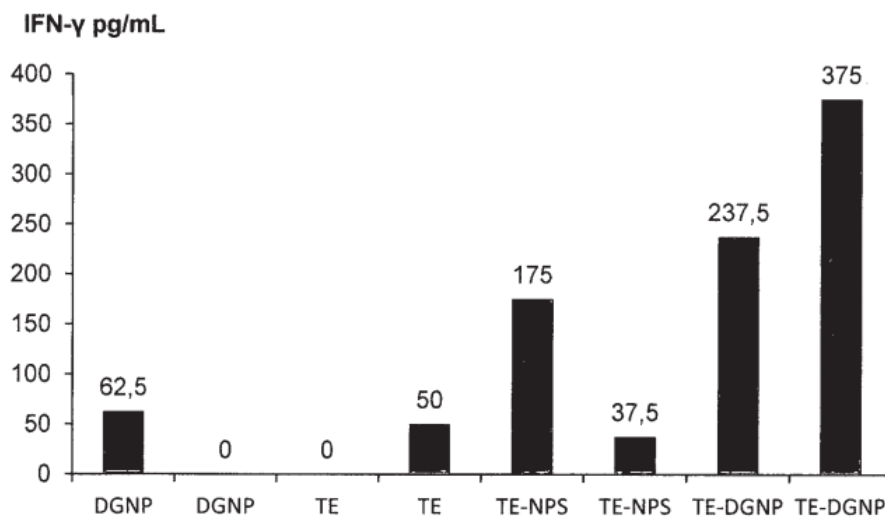


FIG. 2

Número de quistes en el cerebro de los ratones

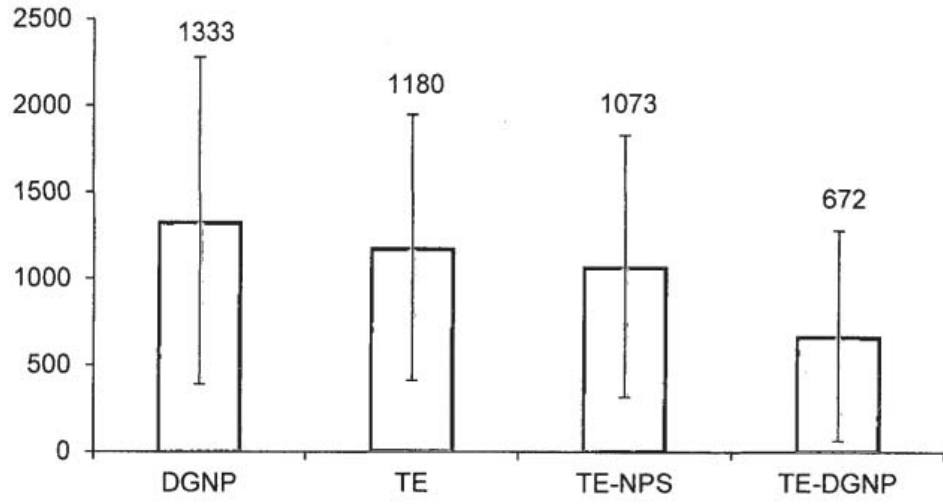


FIG. 3

Concentración de IgG log2

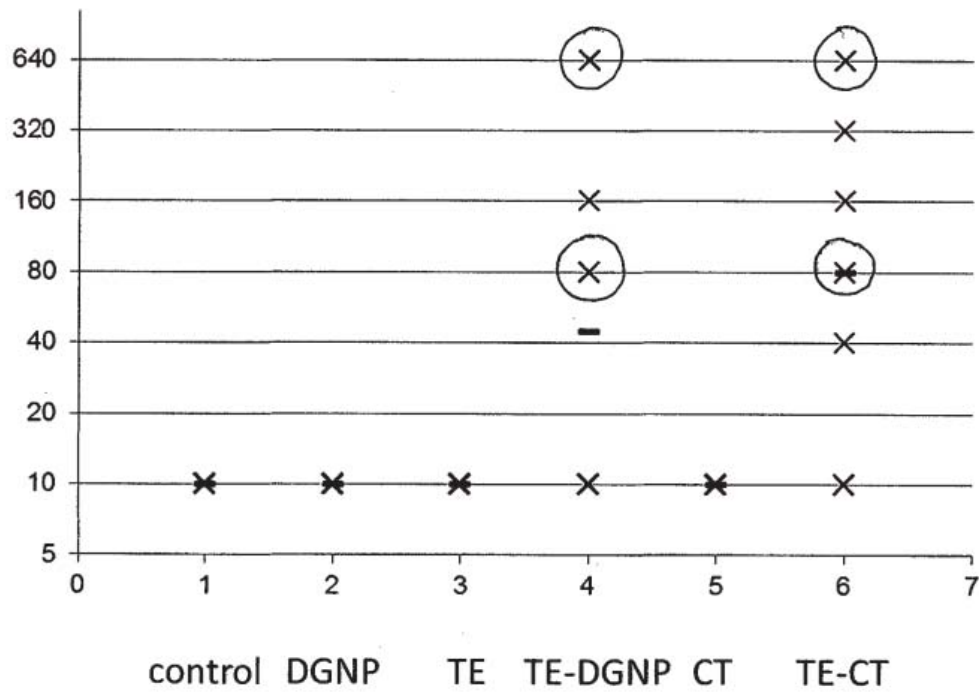


FIG. 4

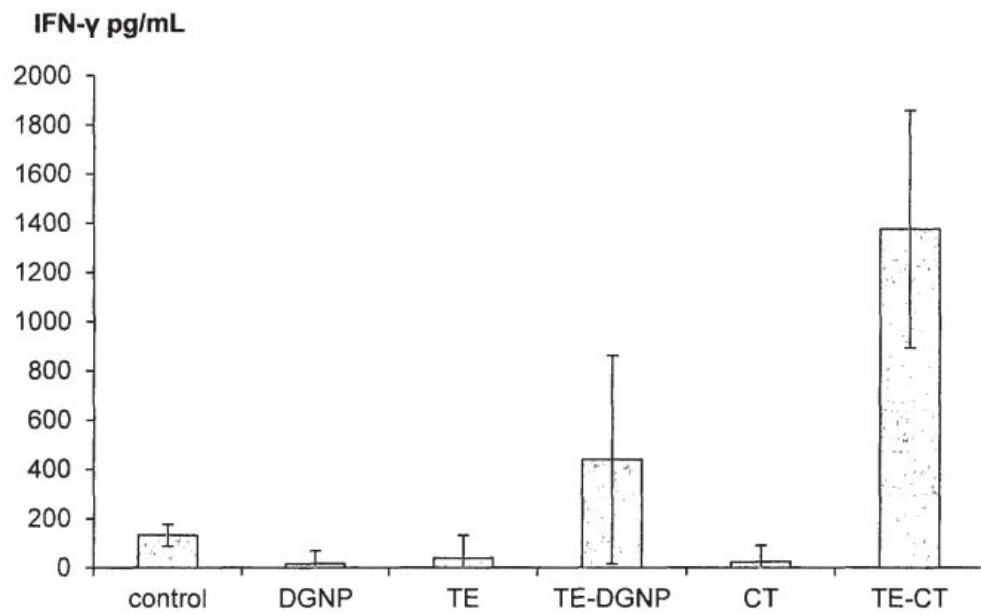


FIG. 5

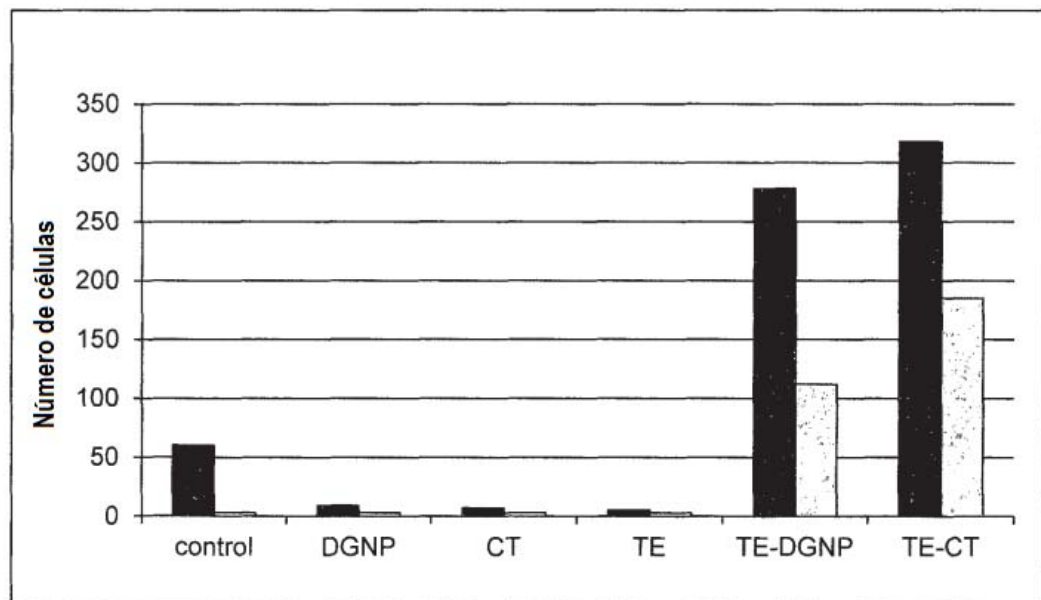


FIG. 6

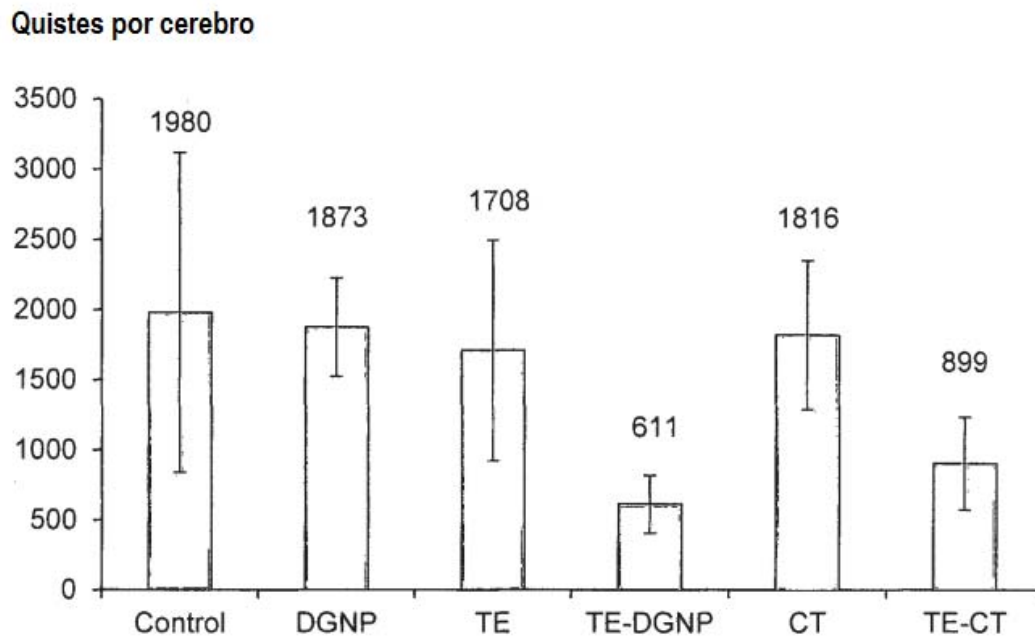


FIG. 7