

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 895**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2013 PCT/US2013/036827**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13158673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2013 E 13718760 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 2838515**

54 Título: **Composiciones de sílice mesoporosa para modular las respuestas inmunitarias**

30 Prioridad:

16.04.2012 US 201261624568 P

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

15.07.2020

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE (100.0%)
17 Quincy Street
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**KIM, JAEYUN;
LI, WEIWEI AILEEN y
MOONEY, DAVID, J.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 773 895 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de sílice mesoporosa para modular las respuestas inmunitarias

Apoyo Gubernamental

5 Esta invención se realizó con el apoyo del Gobierno bajo la subvención No. R01DE019917 otorgada por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones inyectables biocompatibles.

Antecedentes de la invención

10 Las vacunas que requieren la manipulación *ex vivo* de las células, como la mayoría de las terapias basadas en células, conducen a una mala localización de los ganglios linfáticos y una eficiencia limitada.

15 Cancer Research, vol. 71, no. 24 Supplement, P1-01-12 se refiere a partículas de silicio mesoporosas para la presentación de antígenos tumorales y adyuvantes para la inmunidad contra el cáncer. El documento describe que ensayos se llevaron a cabo sobre la capacidad de las partículas de silicio mesoporosas (pSi) para funcionar como sustratos para las células dendríticas (DC) y para activar las células mediante la activación de los receptores de superficie del tipo Toll (TLR). También se examinó el impacto de una mezcla de citoquinas en la maduración de DC y su impacto en la absorción de partículas.

20 El documento de Patente WO 2007/030901 se refiere a un complejo inmunogénico formado antígenos vacunales encapsulados por sílice mesoporosa nano estructurada. El documento describe que un complejo inmunogénico está constituido por antígenos de diversas naturalezas, encapsulados por sílices mesoporosas nano estructuradas altamente ordenadas que actúan como adyuvantes. Las partículas de sílice mesoporosas comprenden estructuras, por ejemplo, en la forma de canales que tienen poros de 2-50 nm.

El documento de Patente WO 2011/130753 describe nano- y micro-materiales funcionalizados para terapias médicas. Se describen soportes de sílice mesoporosos que tienen una superficie funcionalizada.

Compendio de la invención

25 La invención proporciona una solución a problemas e inconvenientes asociados con los enfoques anteriores. Por consiguiente, la invención presenta una composición que comprende varillas de sílice mesoporosa (MPS) que comprenden un compuesto de reclutamiento de células inmunes y un compuesto de activación de células inmunes en donde dicho compuesto de reclutamiento comprende un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el ligando 21 de la quimiocina (motivo C-C) (CCL-21), el ligando 19 de la quimiocina (motivo C-C) (CCL-19), o un ligando tirosina quinasa 3 del tipo FMS (Fit-3); y el agonista de TLR comprende monofosforil lípido A (MPLA), o un oligonucleótido de citosina-guanosina (CpG-ODN), CpG-ODN condensado con poli(etilenimina) (PEI), ácido policitidílico (poli I:C), PEI-poli (I:C), ácido poliadenílico-poliuridílico (poli (A:U)), PEI-poli (A:U), o lipopolisacárido (LPS). La longitud de las varillas varía desde 5 μm hasta 500 μm .

35 Preferiblemente, las varillas comprenden poros de entre 2-50 nm de diámetro, por ejemplo, poros de entre 5-25 nm de diámetro o poros de entre 5-10 nm de diámetro. En realizaciones preferidas, las varillas comprenden poros de aproximadamente 8 nm de diámetro. En un ejemplo, las varillas comprenden una longitud de 5-25 μm , por ejemplo, 10-20 μm . En otros ejemplos, las varillas comprenden una longitud de 50 μm a 250 μm . El reclutamiento robusto de células se logró con composiciones de micropartículas de MPS caracterizadas por tener una relación de aspecto más alta, por ejemplo, con varillas que comprenden una longitud de 80 μm a 120 μm .

40 Ejemplos de compuestos de reclutamiento descritos en la presente memoria incluyen quimiocinas, por ejemplo, una quimiocina seleccionada del grupo que consiste en el ligando 21 de la quimiocina (motivo C-C) (CCL-21, número de acceso de GenBank: (aa) CAG29322.1 (GI:47496599), (na) EF064765.1 (GI:117606581), ligando 19 de la quimiocina (motivo C-C) (CCL-19, número de acceso de GenBank: (aa) CAG33149.1 (GI:48145853), (na) NM_006274.2 (GI:22165424), así como un ligando tirosina quinasa 3 del tipo FMS (Fit3); número de acceso de GenBank: (aa) AAI44040 (GI:219519004), (na) NM_004119 (GI:121114303).

45 Los compuestos que activan las células inmunes incluyen agonistas de TLR. Dichos agonistas incluyen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), por ejemplo, una composición que simula infecciones, tal como un inmunomodulador derivado de bacterias (también conocido como señal de peligro). Los agonistas de TLR incluyen composiciones de ácido nucleico o lípidos [por ejemplo, monofosforil lípido A (MPLA)]. En un ejemplo, el agonista de TLR comprende un agonista de TLR9 tal como un oligonucleótido de citosina-guanosina (CpG-ODN), un oligonucleótido (ODN) condensado de poli(etilenimina) (PEI) tal como PEI-CpG-ODN, o ácido desoxirribonucleico bicatenario (DNA). Por ejemplo, el dispositivo comprende 5 μg , 10 μg , 25 μg , 50 μg , 100 μg , 250 μg , o 500 μg de CpG-ODN. En otro ejemplo, el agonista de TLR comprende un agonista de TLR3 tal como el ácido poliinosínico-

policitídico (Poli I:C), PEI-poli (I:C), ácido poliadenílico-poliuridílico (poli A:U), PEI-poli (A:U), o ácido ribonucleico bicatenario (RNA).

Los lipopolisacáridos (LPS) son también útiles para este fin.

5 Para generar una respuesta inmune, la composición comprende un antígeno al que se desea la respuesta inmune. Por ejemplo, la composición comprende un antígeno tumoral. En realizaciones preferidas, el antígeno comprende un lisado de células tumorales (por ejemplo, de una muestra de biopsia tumoral que se tomó al sujeto a tratar). El sujeto es preferiblemente un paciente humano, pero las composiciones/sistemas se utilizan también para uso veterinario, por ejemplo, para el tratamiento de animales de compañía tales como perros y gatos, así como animales de trabajo tales como caballos y ganado tal como ganado vacuno, bueyes, ovejas, cabras y similares.

10 Las células que presentan el antígeno, tal como las células dendríticas (DC's), trafican a través del dispositivo de MPS, es decir, las células no permanecen en el dispositivo de forma permanente. Las células inmunes se reclutan para el dispositivo y están presentes en el dispositivo temporalmente mientras se encuentran con el antígeno y se activan. Las células inmunes tal como las DC's se dirigen después a un ganglio linfático. Se acumulan en un ganglio linfático, por ejemplo, un ganglio linfático de drenaje, no en el dispositivo de MPS. Las células acumuladas en el
15 ganglio linfático aumentan aún más la respuesta inmune al antígeno de la vacuna dando como resultado una fuerte respuesta celular y humoral al antígeno.

Por lo tanto, un método para inducir una respuesta inmune específica de antígeno sistémico a un antígeno de vacuna, comprende administrar a un sujeto la composición de MPS descrita anteriormente. La composición se carga en una jeringa y se inyecta en el cuerpo del receptor. Por ejemplo, una pequeña cantidad (por ejemplo, 50-500 µl, por ejemplo, 150 µl) se administra por vía subcutánea. Típicamente, el dispositivo (composición de MPS) se infiltra con células el día 2 después de la administración, y en el día 5-7, un ganglio linfático de drenaje se hincha con células que han migrado fuera del dispositivo y al tejido de los ganglios linfáticos, donde se acumulan y propagan aún más una respuesta específica de antígeno. Las composiciones son, por lo tanto, útiles para inducir el paso de las células inmunes a un ganglio linfático. No es necesario eliminar la composición de MPS después de la terapia de
20 vacunación. La composición puede permanecer en el cuerpo en el sitio de administración, donde se degrada. Por ejemplo, las partículas de MPS son consumidas por los macrófagos con el tiempo y eliminadas después del cuerpo.

Un método para fabricar una vacuna comprende proporcionar una suspensión de varillas de sílice mesoporosa, poner en contacto las varillas con un antígeno de vacuna, un compuesto de reclutamiento de células inmunes y un compuesto de activación de células inmunes. El antígeno de la vacuna comprende un lisado de células tumorales, el
30 compuesto de reclutamiento comprende un GM-CSF y el compuesto de activación comprende un CpG ODN. En algunos casos, las varillas se modifican con ácido glicólico o ácido láctico antes de poner en contacto las varillas con uno o más de los siguientes compuestos: antígeno de vacuna, compuesto de reclutamiento o compuesto de activación. Opcionalmente, la composición/dispositivo de MPS se fabrica con varillas de MPS, un compuesto de reclutamiento de células inmunes y un compuesto de activación de células inmunes (opcionalmente, con modificación de ácido glicólico o láctico), almacenados y/o enviados al sitio de uso, después de lo cual la
35 preparación de antígeno tumoral específico del paciente o lisado se añade a la suspensión de las varillas antes de la administración, por ejemplo 1, 2, 6, 12, 24 o 48 horas, antes de la administración al paciente.

Los compuestos que se cargan en la composición de MPS se procesan o purifican. Por ejemplo, los polinucleótidos, polipéptidos u otros agentes se purifican y/o aíslan. Específicamente, como se utiliza en la presente memoria, una
40 molécula de ácido nucleico, polinucleótido, polipéptido o proteína de "aislada" o "purificada" está sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan de forma química. Los compuestos purificados son al menos el 60% en peso (peso seco) del compuesto de interés. Preferiblemente, la preparación es al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 90%, y lo más preferiblemente al menos el 99% en peso del compuesto de interés.
45 Por ejemplo, un compuesto purificado es uno que tiene al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 98%, 99% o 100% (p/p) del compuesto deseado en peso. La pureza se mide mediante cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Un polinucleótido purificado o aislado (ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA)) está libre de genes o secuencias que lo flanquean en su estado natural. Purificado define también un grado
50 de esterilidad que es seguro para la administración a un sujeto humano, por ejemplo, que carece de agentes infecciosos o tóxicos. En el caso de los antígenos tumorales, el antígeno puede ser purificado o una preparación procesada tal como un lisado de células tumorales.

De manera similar, por "sustancialmente puro" se entiende un nucleótido o polipéptido que se ha separado de los componentes que lo acompañan naturalmente. Típicamente, los nucleótidos y polipéptidos son sustancialmente puros cuando son al menos del 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o incluso 99%, en peso, libres de proteínas y moléculas orgánicas naturales con las que están naturalmente asociado.
55

Una molécula pequeña es un compuesto que tiene menos de 2000 daltons en masa. La masa molecular de la molécula pequeña es preferiblemente inferior a 1000 daltons, más preferiblemente inferior a 600 daltons, por ejemplo, el compuesto es inferior a 500 daltons, 400 daltons, 300 daltons, 200 daltons o 100 daltons.

El término de transición “que comprende”, que es sinónimo de “que incluye”, “que contiene” o “caracterizado por”, es inclusivo o abierto y no excluye elementos adicionales no citados o etapas del método. Por el contrario, la frase de transición “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. La frase de transición “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificadas y “aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada.”

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la misma, y de las reivindicaciones. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puedan utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayos de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una imagen SEM de las varillas de MPS. El apilamiento aleatorio y el autoensamblaje de estas varillas generan un espacio 3D que permite la infiltración celular.

La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra la expresión del marcador de superficie dependiente de las varillas de MPS de diferentes longitudes. Se incubaron 100 μg de las varillas de MPS de diferentes longitudes con células dendríticas derivadas de médula ósea durante 18 horas. Como un marcador de inflamación, el porcentaje de células activadas se determinó mediante tinción para los receptores de superficie celular CD11c (marcador de DC), MHCII (marcador de presentación de antígeno) y CD86 (receptor coestimulador). La propiedad inflamatoria de las varillas aumentó con el aumento de la longitud. Dado que un andamio deseado muestra propiedades inflamatorias (similar al control del andamio de PLG), se utilizaron varillas entre 30 y 100 μm o 120 μm en experimentos posteriores.

La Figura 3 es una serie de imágenes que muestran el efecto de las varillas de MPS en un ratón. La Figura 3A es una imagen que representa un sitio de inyección del andamio extirpado después de 7 días después de que se inyectasen por vía subcutánea 5 mg de varilla de MPS marcada con rodamina en un ratón C57bl/6j. El bolsillo subcutáneo indica que las varillas se localizaron y se autoensamblaron para crear un microambiente 3D. La Figura 3B es una imagen SEM del sitio del andamio extirpado que demuestra la infiltración celular en el sitio del andamio. La Figura 3C representa imágenes vivas/muertas de las células separadas del andamio de MPS, demostrando el reclutamiento de células vivas.

La Figura 4A es un gráfico lineal que muestra la liberación del GM-CSF de las varillas de MPS. Se cargó 1 μg de GM-CSF en las varillas de MPS y se incubaron en BSA/PBS al 0,1%. Es sobrenadante se recogió periódicamente y se midió para el GM-CSF utilizando ELISA (R&D). GM-CSF se libera continuamente de las varillas de MPS. La Figura 4B es un gráfico de barras que muestra la expresión del marcador de superficie en un cocultivo *in vitro* de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) con MPS. Se incubaron 100 μg de las varillas de MPS no modificadas, modificadas con amina, tiol, cloro y fosfonato con $10^6/\text{ml}$ de BMDCs durante 18 horas. Las células se analizaron después para la expresión de MHC de clase II y la molécula coestimuladora CD86. Una expresión aumentada de MHCII y CD86 de los BMDCs estimulados por MPS indica que las varillas de MPS son inflamatorias, y esta propiedad se moduló modificando la superficie de las varillas de MPS.

La Figura 5A es un gráfico de barras que representa el reclutamiento de CDs por las varillas de MPS cargadas con GM-CSF. Se inyectaron por vía subcutánea 5 mg/ratón de varillas de MPS cargadas con o sin 1 μg /ratón de GM-CSF. Las células del sitio del andamio se recuperaron y se tiñeron para el receptor CD11c (marcador de DC). El andamio de MPS cargado con GM-CSF fue capaz de reclutar más DCs que el andamio de MPS blanco. La Figura 5B es un gráfico de barras que representa la expresión del marcador de superficie de DCs. El andamio de MPS cargado con GM-CSF y CpG-ODN activó más DCs que sin CpG-ODN.

Las Figuras 6A-B son gráficos de barras que muestran (Figura 6A) el porcentaje de células B220+ o (Figura 6B) el número total de células B220+ en el sitio del andamio. Se inyectaron por vía subcutánea 5 mg/ratón de varillas de MPS cargadas con o sin 1 μg /ratón de GM-CSF, 100 μg de CpG-ODN y 130 μg de ovoalbúmina. Las células del sitio del andamio se recuperaron periódicamente y se tiñeron para el receptor B220 (marcador de células B). El andamio de MPS cargado con GM-CSF, CpG-ODN y Ova fue capaz de reclutar más células B para el día 3.

Las Figuras 7A-C son diagramas de dispersión de citometría de flujo (Figura 7A) y gráficos de barras (Figuras 7B-C) que representan la presencia del marcador MHC-I-SIINFEKL (SEQ ID NO:1) en la superficie de las DCs. El andamio de MPS cargado con GM-CSF, CpG-ODN y el antígeno modelo de ovoalbúmina indujo la expansión de DCs específicas de antígeno dirigidas al ganglio linfático de drenaje (dLN). Las células del dLN se tiñen con el marcador dendrítico CD11c y el marcador MHC-I-SIINFEKL, que indica que una parte de la proteína ovoalbúmina, la secuencia de péptidos SIINFEKL, se presenta en la superficie de la célula en el complejo MHC-I.

Las Figuras 8A-B son gráficos de barras que muestran la formación del centro germinal debido al andamio de MPS. El andamio de MPS cargado con GM-CSF, CpG-ODN y el antígeno modelo de ovoalbúmina pudo inducir el centro

germinal, albergando células B activadas y cebadas con antígeno, en el dLN. Las células del dLN se tiñen con B220 (marcador de células B) y GL7 (marcador del centro germinal) para investigar la formación del centro germinal, que alberga solo las células B que se activan y en el proceso de hipermutación somática y cambio de isotipo.

5 Las Figuras 9A-B son gráficos de barras que representan que el andamio de MPS cargado con GM-CSF, CpG-ODN y el antígeno modelo de ovoalbúmina fue capaz de inducir la expansión de linfocitos T citotóxicos (CTLs) CD8+ que pueden reconocer específicamente el antígeno modelo. Los esplenocitos se tiñeron para CD8 (marcador de células T asesinas) y con un anticuerpo MHC1-tetramer-SIINFEKL, que indica si una célula T puede reconocer un antígeno específico presentado en el complejo MHC1.

10 Las Figuras 10A-C son histogramas que muestran que el andamio de MPS cargado con GM-CSF, CpG-ODN y el antígeno modelo de ovoalbúmina fue capaz de inducir la expansión clonal de CTLs CD8+ específicas de antígeno en el dLN y el bazo. Los esplenocitos inyectados del ratón OT-I se tiñeron con el colorante de seguimiento celular CFSE, cuya fluorescencia se reduce a la mitad cada vez que una célula se divide. La fluorescencia más baja en los esplenocitos teñidos con CFSE en el bazo y el dLN en el grupo de la vacuna completamente cargada indica la proliferación de CTL específica de ovoalbúmina.

15 Las Figuras 11A-C son histogramas que muestran que el andamio de MPS cargado con GM-CFS, CpG-ODN y el antígeno modelo de ovoalbúmina fue capaz de inducir la expansión clonal de THs CD4+ específicas de antígeno en el dLN y el bazo. Los esplenocitos inyectados del ratón OT-II se tiñeron con el colorante de seguimiento celular CFSE, cuya fluorescencia se reduce a la mitad cada vez que una célula se divide. La fluorescencia más baja en los esplenocitos teñidos con CFSE en el bazo y el dLN en el grupo de la vacuna completamente cargada y el MPS cargado solo con el grupo de antígeno indica la proliferación de células TH CD4+ específicas de ovoalbúmina.

20 Las Figuras 12A-B son histogramas que muestran que el título de los anticuerpos se define como el grado en que la disolución de suero de los anticuerpos puede diluirse y aún contener una cantidad detectable del anticuerpo. Los anticuerpos de suero de anti-ovoalbúmina se titularon. El andamio de MPS cargado con GM-CSF, CpG-ODN y ovoalbúmina provocó una respuesta de anticuerpos TH1 y TH2 fuerte y duradera. El MPS cargado con OVA solo puede provocar una fuerte respuesta de TH2, lo que indica el potencial adyuvante del material de MPS en sí.

25 Las Figuras 13A-B son gráficos de líneas que muestran que GM-CSF se libera de las micropartículas de MPS de manera controlada y sostenida. A) Se cargó 1 µg de GM-CSF en 5 mg de varillas de MPS y se incubaron en BSA/PBS al 0,1%. El sobrenadante se recogió periódicamente y se midió para GM-CSF utilizando ELISA (R&D). El GM-CSF se liberó continuamente de las varillas de MPS, aunque en pequeñas cantidades. B) Se cargó 1 µg de GM-CSF en 5 mg de MPS que contenía OVA y CpG. Después se inyectó por vía subcutánea en ratones C57BL/6j. En varios puntos de tiempo, el tejido que rodea el andamio de partículas inyectadas se recogió y se analizó para determinar el nivel de GM-CSF. El nivel de GM-CSF se mantuvo durante una semana.

30 Las Figuras 14A-B son fotografías, y la Figura 14C es un gráfico de barras. Las micropartículas de MPS de mayor relación de aspecto reclutan más células. La Figura 14A muestra imágenes SEM de micropartículas de MPS entre 10 µm y 20 µm o entre 80 µm y 120 µm de longitud. Las varillas más largas dieron como resultado una composición con mayor área o espacio entre las varillas. La Figura 14B muestra composiciones de MPS que se recogieron de ratones. Se inyectaron 5 µg de micropartículas de MPS por vía subcutánea en ratones, y el sitio del andamio se recogió el día 7 después de la inyección. La Figura 14C es un gráfico de barras que muestra la enumeración de las células que se aislaron del andamio. Las micropartículas de MPS de mayor relación de aspecto reclutaron más células.

35 Las Figuras 15A-B son gráficos de barras. Las células dendríticas (DCs) se reclutan en las micropartículas de MPS como respuesta al GM-CSF. Las micropartículas de MPS se cargaron con GM-CSF (0 ng, 500 ng, 1000 ng, 3000 ng) y se inyectaron por vía subcutánea en ratones. El día 7 después de la inyección, se recogió el andamio y se analizó utilizando citometría de flujo. La Figura 15A muestra que las DCs CD11c+ CD11b+ reclutadas aumentan al aumentar la dosis de GM-CSF. La Figura 15B muestra que las DCs CD11c+ MHCII+ maduras reclutadas también aumentan las DCs con el aumento de la dosis de GM-CSF.

40 La figura 16 es un gráfico de barras que muestra que el GM-CSF aumenta el tráfico de DCs reclutadas al LN de drenaje. Las micropartículas de MPS se cargaron con ovoalbúmina marcada con Alexa 647 (OVA) o con OVA marcada con Alexa 647 con 1 µg de GM-CSF, y se inyectaron por vía subcutánea en ratones. El día 7 después de la inyección, el ganglio linfático de drenaje (dLN) se recogió y analizó utilizando citometría de flujo. Con la adición de antígeno (OVA), hay un aumento modesto de las DCs Alexa 647+ CD11c+ que se han movido al andamio y han absorbido la OVA. Sin embargo, la adición de GM-CSF aumenta drásticamente el tráfico de DC desde el andamio al dLN.

45 Las Figuras 17A-C son diagramas de dispersión y la Figura 17D es un gráfico de barras. La administración local de CpG-ODN desde el andamio de micropartículas de MPS aumenta la circulación de DCs activadas. Las micropartículas de MPS se cargaron con 1 µg de GM-CSF, 300 µg de OVA y 100 µg de CpG-ODN. Después se inyectaron por vía subcutánea en ratones. Los dLN se recogieron y analizaron después de 7 días después de la

inyección. Las células de LN se tiñeron con CD11c y CD86. La adición de CpG-ODN, que se libera localmente del andamio de MS, aumenta aún más el porcentaje y el número de DCs maduras activadas en el dLN.

Las Figuras 18A-C son fotografías y la Figura 18D es un gráfico de barras. Las proteínas se liberan del andamio de micropartículas de MPS de manera controlada y sostenida. La ovoalbúmina marcada con Alexa 647 se inyectó por vía subcutánea en el costado de un ratón en una disolución tampón o se cargó en las micropartículas de MPS. La fluorescencia relativa se midió utilizando IVIS en varios puntos de tiempo. Si se inyecta en una disolución tampón, la proteína se difunde fuera del sitio de inyección en menos de 1 día. Sin embargo, si se carga en las micropartículas de MPS, la proteína se libera del sitio del andamio local de manera sostenida, por ejemplo, en el transcurso de una semana (2, 3, 4, 5, 7 o más días).

Las Figuras 19A-B son gráficos de líneas que muestran títulos de anticuerpos. El título de un anticuerpo se define como el grado en que la disolución de suero del anticuerpo puede diluirse y contener aún una cantidad detectable del anticuerpo. Los ratones se vacunaron con 300 µg de OVA, 100 µg de CpG-ODN y 1 µg de GM-CSF en forma soluble o se cargaron en 5 mg de micropartículas de MPS. Se titulan los anticuerpos del suero de anti-ovoalbúmina. El andamio de MPS cargado con GM-CSF, CpG-ODN y OVA puede provocar una respuesta de los anticuerpos TH1 y TH2 fuerte y duradera, como lo indica un alto título del anticuerpo IgG2a e IgG1, respectivamente. Más impresionantemente, esta respuesta es evidente más allá de 200 días después de la vacunación con una sola inyección. Esta respuesta se comparó con la OVA administrada con hidróxido de aluminio, el único adyuvante aprobado para uso humano en los Estados Unidos. Si bien la vacuna de MPS es capaz de inducir respuestas tanto de anticuerpos TH1 como TH2, debido a su capacidad de cargar pequeñas citoquinas, proteínas y DNAs, la respuesta inducida por el alumbre está completamente limitada a TH2. La vacuna de MPS es muy versátil y se ajusta y controla fácilmente para inducir respuestas inmunes específicas.

Las Figuras 20A-D son diagramas de dispersión que muestran que la vacunación con la vacuna de MPS induce la expansión de las células T foliculares auxiliares. Los esplenocitos de OT-II se tiñeron con CFSE y se transfirieron adoptivamente a ratones receptores de Thy1.1+. Los ratones receptores se vacunaron con MPS y lisozima, MPS y OVA, y la forma completa de la vacuna que contenía GM-CSF y CpG. Tres días después de la vacunación, se recogieron los dLN y se analizaron las células transferidas adoptivamente. Aquí se muestra que los ratones que fueron vacunados con MPS y OVA, y la forma completa de la vacuna, generaron una fuerte población de células T foliculares auxiliares, que son las células responsables directamente de "ayudar" a las células B a diferenciarse y madurar en células plasmáticas que segregan anticuerpos específicos de antígeno funcionales completos.

Las Figuras 21A-D son gráficos de líneas que muestran que la vacunación con la vacuna de MPS induce la expansión clonal de las células T CD4+ auxiliares. Los esplenocitos de OT-II se tiñeron con CFSE y se transfirieron adoptivamente a ratones receptores de Thy1.1+. Los ratones receptores se vacunaron con MPS y lisozima, MPS y OVA, y la forma completa de la vacuna que contenía GM-CSF y CpG. Tres días después de la vacunación, se recogieron los dLN y se analizaron las células transferidas adoptivamente. Aquí se muestra que tanto MPS como OVA, y la vacuna completa, indujeron una fuerte expansión clonal de las células T CD4+ auxiliares, lo que indica una respuesta específica de antígeno sistémico.

Las Figuras 22A-B son gráficos de líneas que muestran que la modificación con ácido glicólico y ácido láctico de las micropartículas de MPS ayuda a la liberación de GM-CSF bioactivo. Se cargó 1 µg de GM-CSF en 5 mg de varillas de MPS modificadas con ácido glicólico o ácido láctico y se incubaron en BSA/PBS al 0,1%. El sobrenadante se recogió periódicamente y se midió para GM-CSF utilizando ELISA (R&D). En comparación con el GM-CSF liberado de micropartículas de MPS no modificadas, la modificación con ácido glicólico y ácido láctico aumentan la liberación acumulativa de GM-CSF bioactivo en más de 20 veces.

Las Figuras 23A-D son diagramas de dispersión que muestran que la MPS modificada con ácido glicólico aumenta el porcentaje de las DCs reclutadas y DCs maduras. Se cargaron 5 mg de micropartículas de MPS no modificadas o modificadas con ácido glicólico con 1 µg de GM-CSF durante 1 hora a 37°C, y se inyectaron por vía subcutánea en ratones. El andamio se recogió el día 7 y se analizó. Es evidente aquí que la MPS modificada casi duplica el porcentaje de DCs CD11c+ CD11b+ reclutadas, y aumenta más drásticamente el porcentaje de DCs CD11c+ CD86+ maduras. Estos resultados indican que el gran potencial de modificación de la superficie de las micropartículas de MPS permite una mayor manipulación del fenotipo de las células reclutadas para inducir respuestas inmunes más potentes.

Descripción detallada

Las microvarillas inyectables basadas en MPS se ensamblan aleatoriamente para formar andamios 3D *in vivo*. Este sistema se diseña de tal manera que libera una citoquina para reclutar y alojar temporalmente células inmunes, presentarles un antígeno y activarlas con una señal de peligro. Después del reclutamiento y el alojamiento temporal o la presencia de las células en la estructura, estas células inmunes migran fuera de la estructura del dispositivo y se dirigen a un ganglio linfático. Por lo tanto, la composición es una en la que las células trafican/circulan dentro y fuera, su estado de activación inmune se altera/modula como resultado del movimiento a través del dispositivo.

5 Se encontró una población marcadamente expandida de células dendríticas específicas de antígeno en el ganglio linfático, así como la formación del centro germinal, que se ve favorecida por la participación de células T foliculares auxiliares en el ganglio linfático como resultado de la administración del dispositivo. También se encontró que una población de CTLs CD8+ que reconocen antígenos en el bazo aumentaba significativamente. El sistema también induce la expansión clonal de las células T CD4 y CD8 específicas de antígeno. Además de la amplificación significativa de la respuesta inmune celular, se detectó una producción de anticuerpos alta y duradera y una respuesta equilibrada de T_H1/T_H2.

Los elementos clave del sistema de andamios de microvarillas de sílice mesoporosa inyectable para modular el tráfico y la reprogramación de células inmunes incluyen:

- 10 • la relación de aspecto de las micro varillas de MPS (área de sección transversal de 10 nm por 100 micras de longitud) evita su absorción y, por lo tanto, permite la formación local de una estructura 3D.
- el tamaño de poro de 8 nm permite la adsorción de moléculas pequeñas que pueden administrarse por difusión de manera controlada y continua.
- 15 • la alta relación de área superficial a volumen permite el control de la carga de varias citoquinas, señal de peligro y antígeno.
- la propiedad inflamatoria de las micro varillas de MPS promueve el reclutamiento de células inmunes sin la necesidad de otras citoquinas inflamatorias.
- la versatilidad en la capacidad de modificación química de la superficie de las varillas de MPS que modulan las propiedades de las varillas y las formas en que las proteínas se unen a las varillas.
- 20 • la liberación controlada de GM-CSF puede modular el tráfico de células inmunes al sitio del andamio.
- la liberación controlada de CpG-ODN activa las células dendríticas reclutadas.
- los antígenos proteicos anclados son absorbidos por las células inmunes reclutadas en el sitio del andamio.

25 Se encontró que un tamaño de poro de aproximadamente 5-10, por ejemplo 8 nm, era óptimo para la eficiencia de carga para moléculas pequeñas, así como para proteínas más grandes, por ejemplo, GM-CSF (cuya molécula tiene un diámetro de aproximadamente 3 nm).

Tras la inyección subcutánea de las micro varillas suspendidas en un tampón, las varillas se apilan al azar en una estructura 3D; los extremos de las varillas forman contacto físico entre sí, y se forma un micro espacio entre los contactos.

MPS

30 Las nanopartículas de sílice mesoporosa se sintetizan haciendo reaccionar el ortosilicato de tetraetilo con una plantilla hecha de varillas micelares. El resultado es una colección de esferas o varillas de tamaño nano que se rellenan con una disposición regular de poros. La plantilla se puede quitar lavando con un disolvente ajustado al pH apropiado. En otra técnica, la partícula mesoporosa podría sintetizarse utilizando un método simple gel sólido o un método de secado por pulverización. El ortosilicato de tetraetilo también se utiliza con un monómero de polímero adicional (como una plantilla). Otros métodos incluyen los descritos en las Solicitudes de Patente U.S. 20120264599 y 20120256336.

Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)

40 El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es una proteína secretada por macrófagos, células T, mastocitos, células endoteliales y fibroblastos. Específicamente, GM-CSF es una citoquina que funciona como un factor de crecimiento de glóbulos blancos. GM-CSF estimula a las células madre para que produzcan granulocitos y monocitos. Los monocitos salen del torrente sanguíneo, migran a los tejidos y posteriormente maduran en macrófagos.

45 Los dispositivos de andamio descritos en la presente memoria comprenden y liberan polipéptidos del GM-CSF para atraer las DCs del huésped al dispositivo. Los polipéptidos del GM-CSF contemplados se aíslan de fuentes endógenas o se sintetizan *in vivo* o *in vitro*. Los polipéptidos endógenos del GM-CSF se aíslan de tejido humano sano. Los polipéptidos sintéticos del GM-CSF se sintetizan *in vivo* después de la transfección o transformación del DNA de plantilla en un organismo o célula huésped, por ejemplo, un mamífero o una línea celular humana cultivada. Alternativamente, los polipéptidos sintéticos del GM-CSF se sintetizan *in vitro* por reacción en cadena de polimerasa (PCR) u otros métodos reconocidos en la técnica, Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989).

5 Los polipéptidos del GM-CSF se modifican para aumentar la estabilidad de la proteína *in vivo*. Alternativamente, los polipéptidos del GM-CSF se diseñan para ser más o menos inmunogénicos. Los polipéptidos del GM-CSF humanos endógenos maduros se glicosilan, según se dice, en los restos de los aminoácidos 23 (leucina), 27 (asparagina) y 39 (ácido glutámico) (véase el documento de Patente U.S. Pat. No. 5,073,627). Los polipéptidos del GM-CSF de la presente invención se modifican en uno o más de estos restos de aminoácidos con respecto al estado de glicosilación.

10 Los polipéptidos del GM-CSF son recombinantes. Alternativamente, los polipéptidos del GM-CSF son derivados humanizados de polipéptidos del GM-CSF de mamífero. Ejemplos de especies de mamíferos de las que se derivan los polipéptidos del GM-CSF incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, hámster, cobaya, hurón, gato, perro, mono o primate. En una realización preferida, GM-CSF es una proteína humana recombinante (PeproTech, Catálogo #300-03). Alternativamente, GM-CSF es una proteína murina recombinante (ratón) (PeproTech, Catálogo #315-03). Finalmente, GM-CSF es un derivado humanizado de una proteína recombinante de ratón.

El GM-CSF humano recombinante (PeproTech, Catálogo # 300-03) está codificado por la siguiente secuencia de polipéptidos (SEQ ID NO:2):

15 MAPARSPSPS TQPWEHVNAI QEARRLLNLS RDTAAEMNET VEVISEMFDL QEPTCLQTRL
ELYKQGLRGS LTKLKGPLTM MASHYKQHCP PTPETSCATQ IITFESFKEN LKDFLLVIPF
DCWEPVQE

El GM-CSF murino recombinante (PeproTech, Catálogo # 315-03) está codificado por la siguiente secuencia de polipéptidos (SEQ ID NO:3):

MAPTRSPITV TRPWKHVEAI KEALNLLDDM PVTLNEEVEV VSNEFSFKKL TCVQTRLKIF
EQGLRGNFTK LKGALNMTAS YYQTYCPPTP ETDCEQVTT YADFIDSLKT FLTDIPFECK
KPVQK

20 El GM-CSF humano endógeno está codificado por la siguiente secuencia de mRNA (No. de acceso de NCBI NM_000758 y SEQ ID NO:4):

```

1  acacagagag aaaggctaaa gttctctgga ggatgtggct gcagagcctg ctgctcttgg
61  gcactgtggc ctgcagcadc tctgcacccg cccgctcgcc cagccccagc acgcagccct
121  gggagcatgt gaatgccatc caggaggccc ggcgtctcct gaacctgagt agagacactg
181  ctgctgagat gaatgaaaca gtagaagtca tctcagaaat gtttgacctc caggagccga
241  cctgcctaca gaccgcctg gagctgtaca agcagggcct gcggggcagc ctcaccaagc
301  tcaagggccc cttgaccatg atggccagcc actacaagca gcaactgcct ccaaccccgg
361  aaacttctctg tgcaaccagc attatcacct ttgaaagttt caaagagAAC ctgaaggact
421  ttctgcttgt catccccttt gactgctggg agccagtcca ggagtgagac cggccagatg
481  aggctggcca agccggggag ctgctctctc atgaaacaag agctagaAAC tcaggatggt
541  catcttgagg ggaccaaggg gtggggccaca gccatggtgg gagtggcctg gacctgcctc
601  gggccacact gacctgata caggcatggc agaagaatgg gaatatTTTA tactgacaga
661  aatcagtaat atttatatat ttatattttt aaaatattta tttatttatt tatttaagtt
721  catattccat atttattcaa gatgttttac cgtaataatt attattaaaa atatgcttct
781  a

```

El GM-CSF humano endógeno está codificado por la siguiente secuencia de aminoácidos (No. de acceso de NCBI NP_000749.2 y SEQ ID NO:5):

MWLQSLLLLGTVAC SISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEM
NETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGS LTKLKGPLTMMASHYKQHC
PPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE

25 Secuencias de oligonucleótidos(CpG-ODN) de citosina-guanosina (CpG)

Los sitios CpG son regiones de ácido desoxirribonucleico (DNA) donde un nucleótido de cisteína aparece junto a un nucleótido de guanina en la secuencia lineal de bases a lo largo de su longitud (la "p" representa el enlace fosfato entre ellos y los distingue de un apareamiento de bases complementarias de citosina-guanina). Los sitios CpG

- juegan un papel fundamental en la metilación del DNA, que es uno de los diversos mecanismos endógenos que utilizan las células para silenciar la expresión génica. La metilación de sitios CpG dentro de elementos promotores puede conducir al silenciamiento génico. En el caso del cáncer, se sabe que los genes supresores de tumores a menudo se silencian mientras se expresan los oncogenes, o genes inductores de cáncer. Se ha demostrado que los sitios CpG en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores (que evitan la formación de cáncer) están metilados, mientras que los sitios CpG en las regiones promotoras de oncogenes están hipometilados o no metilados en ciertos tipos de cáncer. El receptor TLR-9 se une a sitios CpG no metilados en el DNA.
- La composición de la vacuna descrita en la presente memoria comprende oligonucleótidos CpG. Los oligonucleótidos CpG se aíslan de fuentes endógenas o se sintetizan *in vivo* o *in vitro*. Los ejemplos de fuentes de oligonucleótidos CpG endógenos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, bacterias, hongos, protozoos, virus, mohos o parásitos. Alternativamente, los oligonucleótidos CpG endógenos se aíslan de tumores neoplásicos benignos o malignos de mamíferos. Los oligonucleótidos CpG sintéticos se sintetizan *in vivo* después de la transfección o transformación del DNA de plantilla en un organismo huésped. Alternativamente, los oligonucleótidos CpG sintéticos se sintetizan *in vitro* por reacción en cadena de polimerasa (PCR) u otros métodos reconocidos en la técnica (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989).
- Los oligonucleótidos CpG se presentan para la captación celular por las células dendríticas. Por ejemplo, se utilizan oligonucleótidos CpG desnudos. El término "desnudo" se utiliza para describir un polinucleótido (u oligonucleótido) endógeno o sintético aislado que está libre de sustituyentes adicionales. En otra realización, los oligonucleótidos CpG se unen a uno o más compuestos para aumentar la eficacia de la captación celular. Alternativamente, o, además, los oligonucleótidos CpG se unen a uno o más compuestos para aumentar la estabilidad del oligonucleótido dentro del andamio y/o la célula dendrítica. Los oligonucleótidos CpG se condensan opcionalmente antes de la absorción celular. Por ejemplo, los oligonucleótidos CpG se condensan utilizando polietilimina (PEI), un polímero catiónico que aumenta la eficiencia de la absorción celular en las células dendríticas.
- Los oligonucleótidos CpG se pueden dividir en múltiples clases. Por ejemplo, Ejemplos de CpG-ODNs abarcados por las composiciones, métodos y dispositivos de la presente invención son estimulantes, neutros o supresores. El término "estimulante" describe una clase de secuencias de CpG-ODN que activan TLR9. El término "neutral" describe una clase de secuencias de CpG-ODN que no activan TLR9. El término "supresivo" describe una clase de secuencias de CpG-ODN que inhiben TLR9. El término "activar TLR9" describe un proceso mediante el cual TLR9 inicia la señalización intracelular.
- Los CpG-ODNs estimulantes pueden dividirse además en tres tipos A, B y C, que difieren en sus actividades inmunoestimuladoras. Los CpG-ODN estimulantes de tipo A se caracterizan por un motivo palindrómico de fosfodiéster central que contiene CpG y una cadena de fosforotioato poli-G en 3'. Después de la activación de TLR9, estos CpG-ODN inducen una alta producción de IFN- α a partir de células dendríticas plasmacitoides (pDC). Los CpG-ODNs de tipo A estimulan débilmente la señalización de NF-kB dependiente de TLR9.
- Los CpG-ODN estimulantes de tipo B contienen un esqueleto de fosforotioato completo con uno o más dinucleótidos CpG. Después de la activación de TLR9, estos CpG-ODN activan fuertemente las células B. A diferencia de los CpG-ODN de tipo A, los CpG-ODN de tipo B estimulan débilmente la secreción de IFN- α .
- Los CpG-ODN estimulantes de tipo C comprenden características de los tipos A y B. Los CpG-ODN de tipo C contienen un esqueleto completo de fosforotioato y un motivo palindrómico que contiene CpG. Similar a los CpG-ODN de tipo A, los CpG-ODN de tipo C inducen una fuerte producción de IFN- α a partir de pDC. Similar a los CpG-ODN de tipo B, los CpG-ODN de tipo C inducen una fuerte estimulación de las células B.
- Ejemplos de CpG-ODNs estimulantes comprenden, pero no se limitan a, ODN 1585, ODN 1668, ODN 1826, ODN 2006, ODN 2006-G5, ODN 2216, ODN 2336, ODN 2395, ODN M362 (todas en InvivoGen). La presente invención abarca también cualquier versión humanizada de los CpG-ODN anteriores. En una realización preferida, las composiciones, métodos y dispositivos de la presente invención comprenden ODN 1826 (cuya secuencia de 5' a 3' es `tccatgacggtcctgacggtt`, en donde los elementos de CpG están en negrita, SEQ ID NO: 10).
- La presente invención abarca los CpG-ODN neutros o de control que no estimulan TLR9. Estos ODN comprenden la misma secuencia que sus contrapartes estimulantes, pero contienen dinucleótidos GpC en lugar de dinucleótidos CpG.
- Ejemplos de CpG-ODNs neutros o de control abarcados por la presente invención comprenden, pero no se limitan a, control para ODN 1585, control para ODN 1668, control para ODN 1826, control para ODN 2006, control para ODN 2216, control para ODN 2336, control para ODN 2395, control para ODN M362 (todos de InvivoGen). La presente invención también abarca cualquier versión humanizada de los CpG-ODN anteriores.
- Antígenos

Las composiciones, métodos y dispositivos descritos en la presente memoria comprenden antígenos tumorales u otros antígenos. Los antígenos provocan inmunidad protectora o generan una respuesta inmunitaria terapéutica en un sujeto al que se administró dicho dispositivo. Los antígenos tumorales preferidos son los lisados de células tumorales (véase, por ejemplo, Ali et. al., 2009, Nature Materials 8, 151-158). Por ejemplo, se extrae una muestra de biopsia tumoral o un tumor completo de un paciente humano (o animal no humano) y se digiere utilizando colagenasa para degradar la matriz celular adicional. Después, las células tumorales se someten a tres ciclos del proceso de congelación y descongelación, en el que las células se congelan en N₂ líquido y después se descongelan en un baño de agua. Este proceso genera los antígenos tumorales, que luego se cargan en las partículas de MPS al mismo tiempo con GM-CSF y CpG-ODN. Por ejemplo, una dosis de vacuna de antígeno de lisado de células tumorales es la cantidad obtenida de 1 x 10⁶ células tumorales. Después de la fabricación de las partículas de MPS, las partículas se suspenden en un tampón fisiológicamente aceptado, por ejemplo, PBS, y el compuesto de reclutamiento (por ejemplo, GM-CSF), el compuesto activador (por ejemplo, CpG) y el antígeno añadido a la suspensión de varillas. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche y después se liofiliza durante aproximadamente 4 horas. Antes de la administración, las varillas se suspenden nuevamente en tampón y la suspensión se carga en una jeringa de 1 ml (aguja de calibre 18). Una dosis de vacuna típica es de 150 µl de la mezcla por inyección.

Ejemplos de los antígenos de cáncer abarcados por las composiciones, métodos y dispositivos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, lisados tumorales extraídos de biopsias, células tumorales irradiadas, series de antígenos MAGE (MAGE-1 es un ejemplo), MART-1/melana, tirosinasa, gangliosida, gp100, GD-2, GD-3 O-acetilada, GM-2, MUC-1, Sos1, proteína de unión a la proteína quinasa C, proteína de la transcriptasa inversa, proteína AKAP, VRK1, KIAA1735, T7-1, T11-3, T11-9, fermento de telomerasa de Homo Sapiens (hTRT), citoqueratina-19 (CYFRA21-1), antígeno 1 del carcinoma de células escamosas (SCCA-1), (proteína T4-A), antígeno 2 del carcinoma de células escamosas (SCCA-2), antígeno del carcinoma de ovario CA125 (1A1-3B) (KIAA0049), mucina 1 (mucina asociada al tumor), (mucina asociada al carcinoma), (mucina epitelial polimórfica), (PEM), (PEMT), (episialin), (antígeno de membrana epitelial asociada a tumor), (EMA) (H23AG), (mucina urinaria reactiva de mani), (PUM), (antígeno asociado a carcinoma de mama DF3), antígeno tumoral de CTCL se1-1, antígeno tumoral de CTCL se14-3, antígeno tumoral de CTCL se20-4, antígeno tumoral de CTCL se20-9, antígeno tumoral de CTCL se33-1, antígeno tumoral de CTCL 37-2, antígeno tumoral de CTCL se57-1, antígeno tumoral de CTCL se89-1, antígeno de membrana específico de próstata, glicoproteína trofoblástica oncofetal 5T4, virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi Orf73, MAGE-C1 (antígeno de cáncer/testículo CT7), antígeno de MAGE-B1 (antígeno MAGE-XP) (DAM10), antígeno de MAGE-B2 (DAM6), antígeno de MAGE-2, antígeno de MAGE-4a, antígeno de MAGE-4b, antígeno de cáncer de colon NY-CO-45, antígeno de cáncer de pulmón NY-LU-12 variante A, antígeno de superficie asociado al cáncer, antígeno de adenocarcinoma ART1, antígeno de cáncer de testículo cerebral asociado paraneoplásico (antígeno onconeuronal MA2; antígeno neuronal paraneoplásico), antígeno ventral neurooncológico 2 (NOVA2), gen de antígeno de carcinoma hepatocelular 520, antígeno asociado a tumor CO-029, antígeno asociado a tumor MAGE-X2, sarcoma sinovial, punto de ruptura X 2, antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por células T, antígeno de cáncer de colon definido serológicamente 1, antígeno de cáncer de mama definido serológicamente NY-BR-15, antígeno de cáncer de mama definido serológicamente NY-BR-16, cromogranina A; proteína secretora paratioridea 1, DUPAN-2, CA 19-9, CA 72-4, CA 195, antígeno carcinoembrionario (CEA). Los antígenos tumorales purificados se utilizan solos o en combinación entre sí.

El sistema también es útil para generar una respuesta inmune a otros antígenos tales como patógenos microbianos (por ejemplo, bacterias, virus, hongos).

Los siguientes materiales y métodos se utilizaron para generar los datos descritos en la presente memoria.

Fabricación del andamio de MPS

El tensioactivo Pluronic P-123 (Sigma-Aldrich) se disolvió en HCl 1,6M a temperatura ambiente y se calentó a 40°C. Se añadieron 42 mmoles de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) (Sigma-Aldrich) y se calentó durante 20 horas a 40°C bajo agitación (600 rpm). La composición se calentó después a 100°C durante 24 horas. Las partículas de las varillas se recogieron por filtración y se secaron al aire a temperatura ambiente. Las partículas se extrajeron en etanol/HCl (5 partes de HCl a 500 partes de EtOH) durante la noche a 80°C. Alternativamente, las partículas se calcinaron a 550°C durante 4 horas en etanol al 100%. La composición de MPS puede almacenarse y enviarse para su uso antes o después de añadir compuestos de reclutamiento y/o activación y antes o después de añadir el antígeno. Por ejemplo, si el antígeno es un lisado de células tumorales hecho de una muestra de biopsia tomada de un paciente, puede procesarse y añadirse a las partículas de MPS poco antes de la administración al paciente.

Para la composición completa de la vacuna, se incubaron 1 µg/ratón de GM-CSF, 100 µg/ratón de CpG-ODN y 130 µg/ratón de la proteína de ovoalbúmina con 5 mg/ratón de MPS en dH₂O durante 12 horas, se liofilizaron durante 12 horas, se resuspendieron en 150 µl/ratón de PBS y se inyectó por vía subcutánea utilizando una aguja de calibre 18.

Para determinar la cinética de liberación de GM-CSF y CpG-ODN de las varillas de MPS, se utilizó GM-CSF humano recombinante marcado con I radiactivo como un marcador, y se llevaron a cabo estudios de liberación estándar. De manera similar, la cantidad de CpG-ODN liberada en PBS se determinó mediante las lecturas de absorbancia utilizando un instrumento Nanodrop (ND1000, Nanodrop Technologies).

Modificación de las micropartículas de MPS

5 La química estándar de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) se utiliza para activar un ácido carboxílico en ácido glicólico o ácido láctico. Las partículas de MPS se modifican con amina utilizando amino propil silano. Los dos componentes se mezclan después a temperatura ambiente durante la noche para reaccionar. Las partículas se dejan secar al aire. Las partículas modificadas con ácido glicólico y/o ácido láctico resultantes se ponen en contacto con GM-CSF u otros compuestos como se describió anteriormente.

Ensayo de activación de DC *in vitro*

10 Las células dendríticas murinas (DCs) se diferenciaron de las células de la médula ósea utilizando 20 ng/ml de GM-CSF. Las DCs diferenciadas, a 10^6 /ml, se incubaron con 100 μ g/ml de las partículas de MPS durante 18 horas, y se analizaron para la expresión de CD11c (ebiosciences, San Diego, CA), CD86 (ebiosciences, San Diego, CA) y MHC de clase II (ebiosciences, San Diego, CA) utilizando citometría de flujo.

Análisis del reclutamiento de DCs en andamios de MPS y emigración a ganglios linfáticos

15 El andamio de MPS se recuperó del animal y se dirigió separando mecánicamente las células de las varillas. Se utilizaron CD11c conjugado con APC (marcador de células dendríticas), MHC de clase II conjugado con FITC y tinciones con CD86 conjugado con PE (B7, molécula coestimuladora) para el análisis de reclutamiento de DCs y leucocitos. Las células se cerraron de acuerdo con el isotiocianato de fluoresceína positivo (FITC), la alofocianina (APC) y la ficoeritrina (PE) utilizando controles de isotipo, y se registró el porcentaje de células que se tiñeron positivamente para cada antígeno de superficie.

20 Para determinar la presencia de DCs específicas de antígenos en los ganglios linfáticos, el ganglio linfático de drenaje (dLN) se recogió y analizó utilizando CD11c conjugado con APC y SIINFEKL-MHC de clase I conjugado con PE (ebiosciences, San Diego, California).

Análisis de células T CD8+ de bazo específicas de antígeno

25 El bazo se recogió y digirió. Después de lisar los glóbulos rojos, los esplenocitos se analizaron utilizando CD3 conjugado con PE-CY7 (ebiosciences, San Diego, California), CD8 conjugado con APC (ebiosciences, San Diego, California) y el SIINFEKL conjugado con PE (SEQ ID NO:) tetrámero MHC clase I (Beckman Coulter). SIINFEKL es un péptido derivado de la ovoalbúmina [OVA (257-264)].

Análisis de la expansión clonal de células T CD4+ o CD8+

30 Los bazos de los ratones transgénicos C57b1/6 OT-II (para CD4) o OT-I (para CD8) se recogieron, se digirieron, se agruparon y se tiñeron con el trazador celular éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE). Se inyectaron por vía intravenosa 20×10^6 esplenocitos/ratón teñidos en los ratones C57b1/6 (Jackson Laboratories) dos días después de la inmunización. Los dLN y los bazos se recuperaron después de cuatro días después de la inyección IV y se analizaron utilizando un marcador de CD8 o CD4 conjugado con PE.

Caracterización de la respuesta humoral anti-OVA

35 Se analizaron sueros de sangre para anticuerpos IgG1 e IgG2a mediante ELISA utilizando placas recubiertas con ovoalbúmina. La titulación de anticuerpos se definió como la dilución de suero más baja a la que la lectura de ELISA OD es $> 0,3$ (blanco).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende varillas de sílice mesoporosa que comprende un compuesto de reclutamiento celular inmune, en donde dicho compuesto de reclutamiento comprende un factor estimulante de la colonia de granulocito-macrófagos (GM-CSF), ligando 21 de quimiocina (motivo C-C) (CCL-21), ligando 19 de quimiocina (motivo C-C) (CCL-19), o ligando de tirosina quinasa 3 similar a FMS (Fit-3); y
- 5 un compuesto de activación celular inmune que comprende un agonista de TLR, en donde el agonista de TLR comprende monofosforil lípido A (MPLA), un oligonucleótido de citosina-guanosina (CpG-ODN), CpG-ODN condensado con poli(etilenimina) (PEI), ácido policitídílico (poli I:C), PEI-poli (I:C), ácido poliadenílico-poliuridílico (poli (A:U)), PEI-poli (A:U), o lipopolisacárido (LPS),
- 10 en donde dichas varillas comprenden una longitud de 5 μm a 500 μm .
2. La composición de la reivindicación 1, en donde dichas varillas comprenden poros de entre 2-50 nm de diámetro, 5-25 nm de diámetro, o 5-10 nm de diámetro.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde dichas varillas comprenden poros de aproximadamente 8 nm de diámetro.
- 15 4. La composición de la reivindicación 1, en donde dichas varillas comprenden una longitud de 5 μm a 25 μm .
5. La composición de la reivindicación 1, en donde dichas varillas comprenden una longitud de 80 μm a 120 μm .
6. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto de reclutamiento comprende GM-CSF.
7. La composición de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende además un antígeno.
- 20 8. La composición de la reivindicación 7, en donde dicho antígeno comprende un antígeno tumoral.
9. La composición de la reivindicación 7, en donde dicho antígeno comprende un lisado de células tumorales.
10. La composición de la reivindicación 1 para su uso en un método para inducir una respuesta inmune específica de antígeno sistémico a un antígeno de la vacuna.
11. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un antígeno de vacuna.
- 25 12. La composición de la reivindicación 11, para su uso en la inducción de una respuesta inmune específica de antígeno sistémico a dicho antígeno de vacuna o para su uso en la inducción de referencia de células inmunes específicas de antígeno de vacuna a un ganglio linfático.
13. Un método para preparar la composición de la reivindicación 11, que comprende proporcionar una suspensión de varillas de sílice mesoporosa en donde dichas varillas comprenden una longitud de 5 μm a 500 μm , y poner en contacto dichas varillas con dicho antígeno de vacuna, dicho compuesto de reclutamiento celular inmune, y dicho compuesto de activación celular inmune.
- 30 14. El método de la reivindicación 12, en donde dicho antígeno de vacuna comprende un lisado de células tumorales, en donde dicho compuesto de reclutamiento comprende GM-CSF, y en donde dicho compuesto de activación comprende CpG-ODN.
- 35 15. El método de la reivindicación 12, en donde dichas varillas se modifican con ácido glicólico o ácido láctico antes de poner en contacto dichas varillas con dicho antígeno de vacuna, compuesto de reclutamiento, o compuesto de activación.
16. La composición de la reivindicación 1, en donde dichas varillas comprenden una longitud de 30 μm a 100 μm .
- 40 17. La composición de la reivindicación 1, en donde dichas varillas comprenden una longitud de 50 μm a 250 μm .
18. La composición de la reivindicación 1 para la inyección y el auto ensamblaje *in vivo* de una estructura 3D, en donde dicha estructura comprende micro espacios que permiten la infiltración o el tráfico celular.
- 45 19. La composición de la reivindicación 1, en donde dichas varillas se apilan en una estructura 3D, y en donde dicha estructura comprende micro espacios que permiten la infiltración o el tráfico celular.
20. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto de reclutamiento celular inmune comprende GM-CSF y dicho agonista de TLR comprende CpG-ODN o PEI-CpG-ODN.

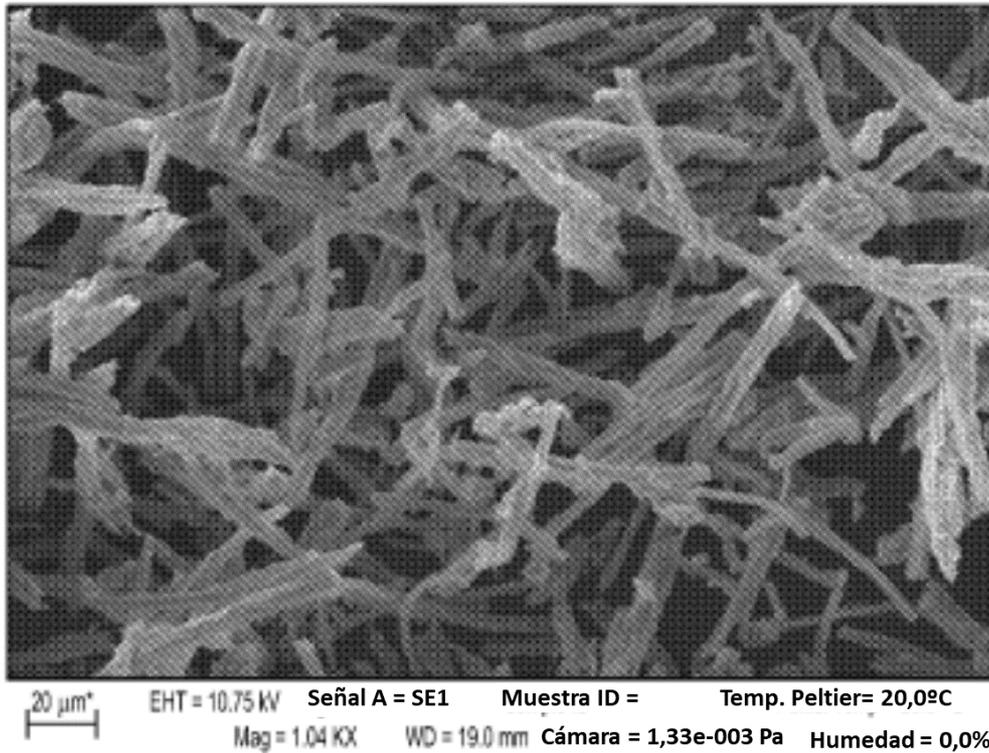


FIG. 1

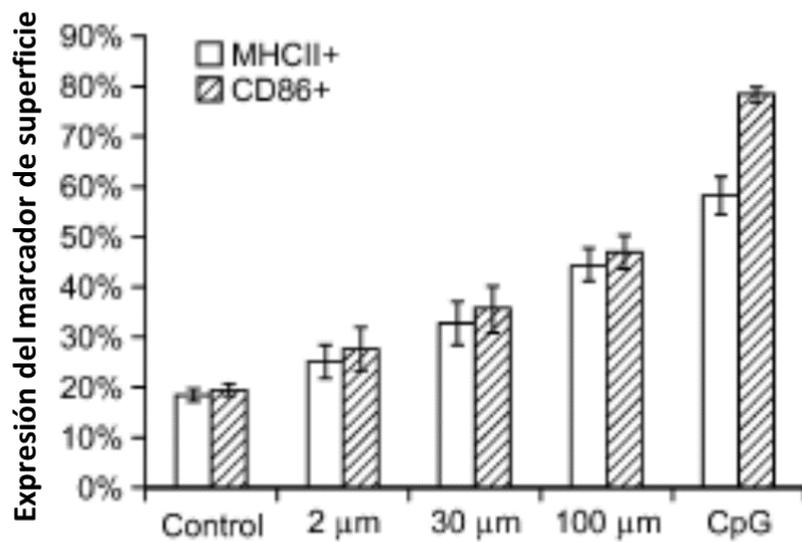


FIG. 2

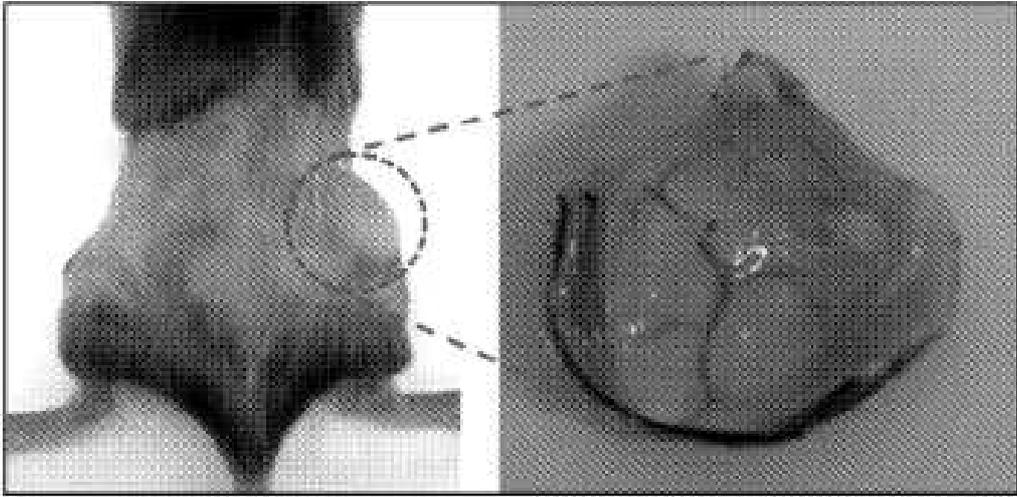
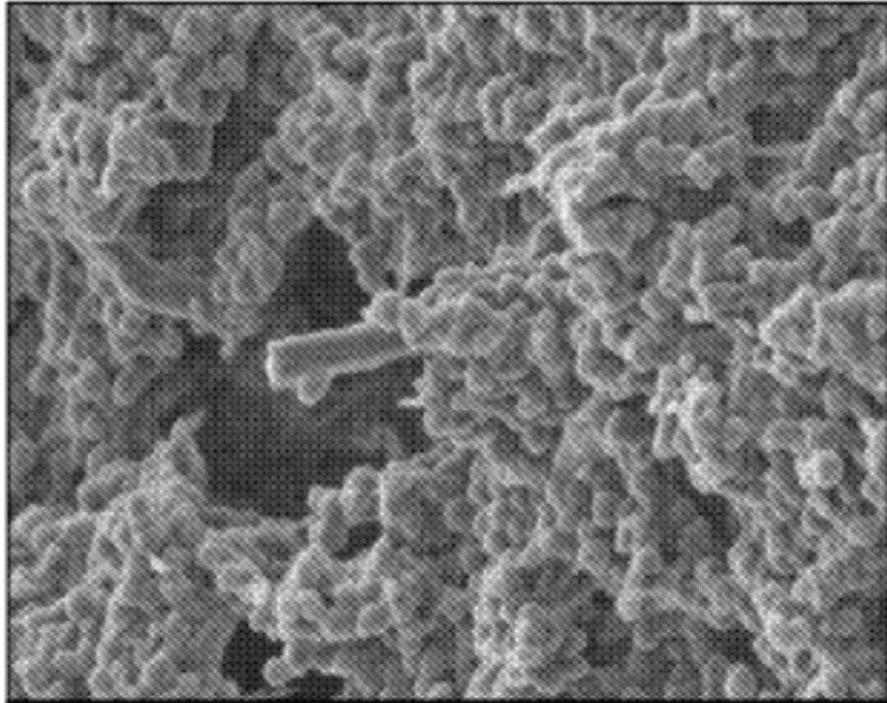


FIG. 3A



10 μ m EHT = 10.75 KV Señal A = SE1 Muestra ID = Temp. Peltier = 20,0°C
Mag = 2.18 KX WD = 30.5 mm Cámara = 2,34e-003 Pa Humedad = 0,0%

FIG. 3B



FIG. 3C

Liberación de GM-CSF de las MPS

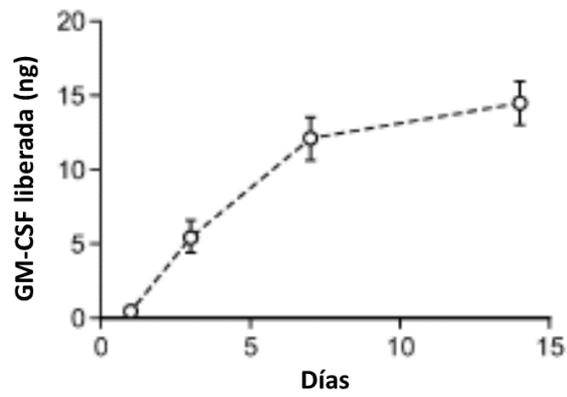


FIG. 4A

Co-cultivo de BMDC con MPS in vitro

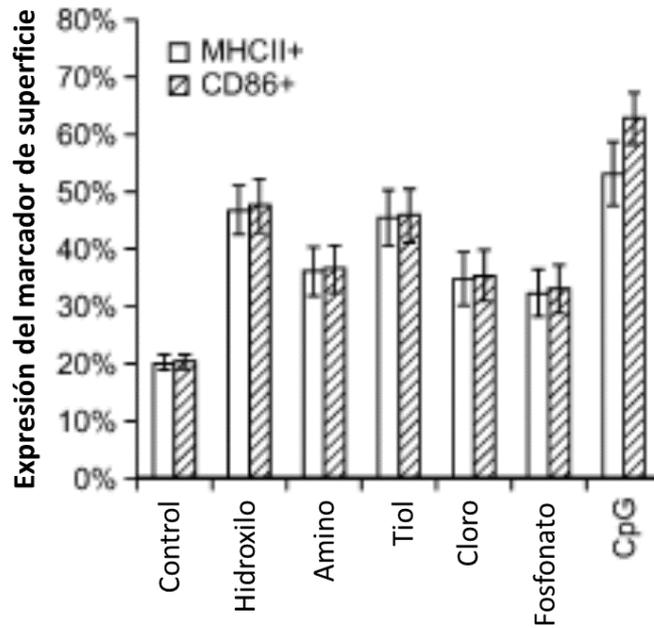


FIG. 4B

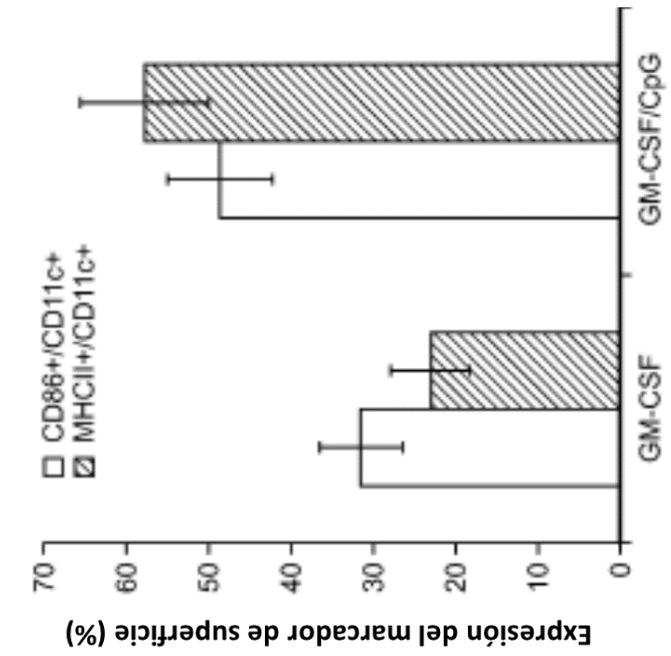


FIG. 5B

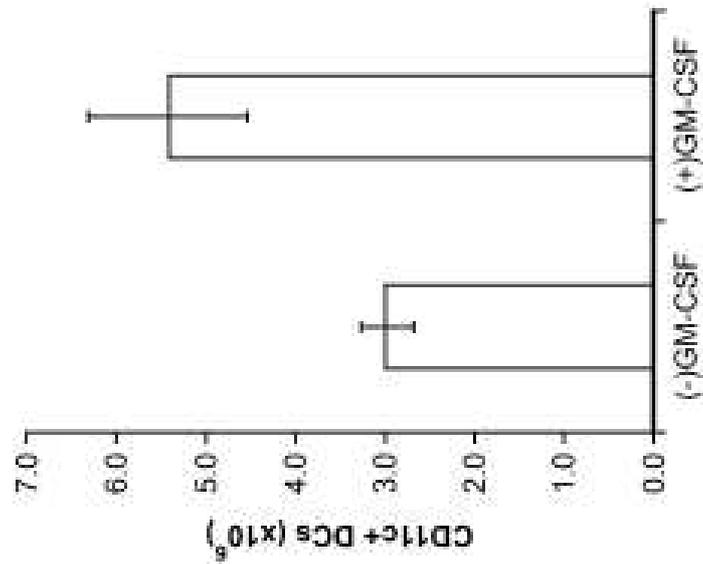


FIG. 5A

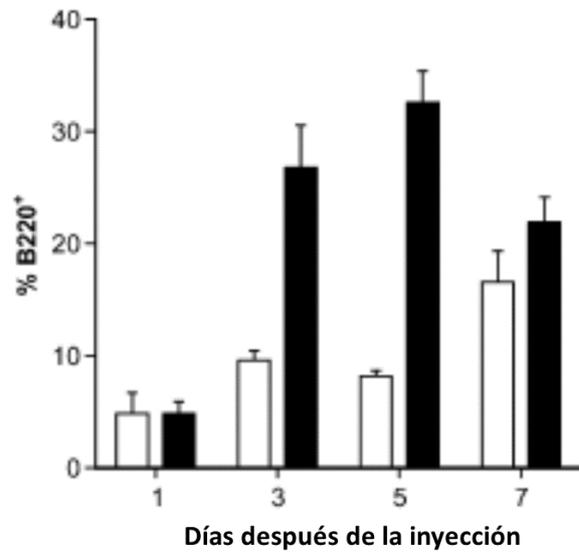


FIG. 6A

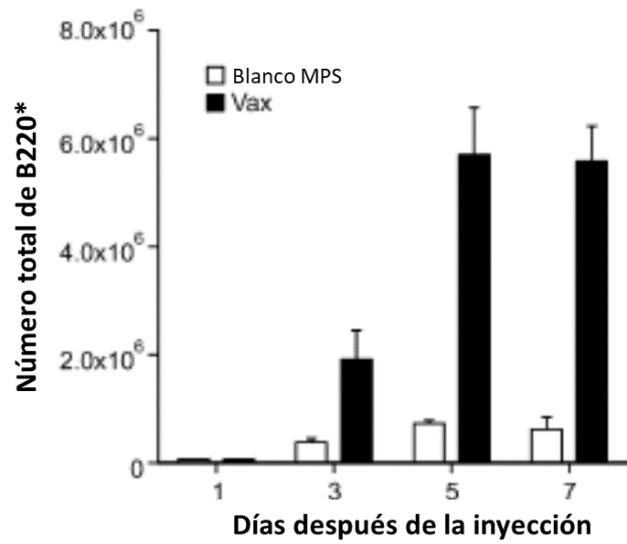


FIG. 6B

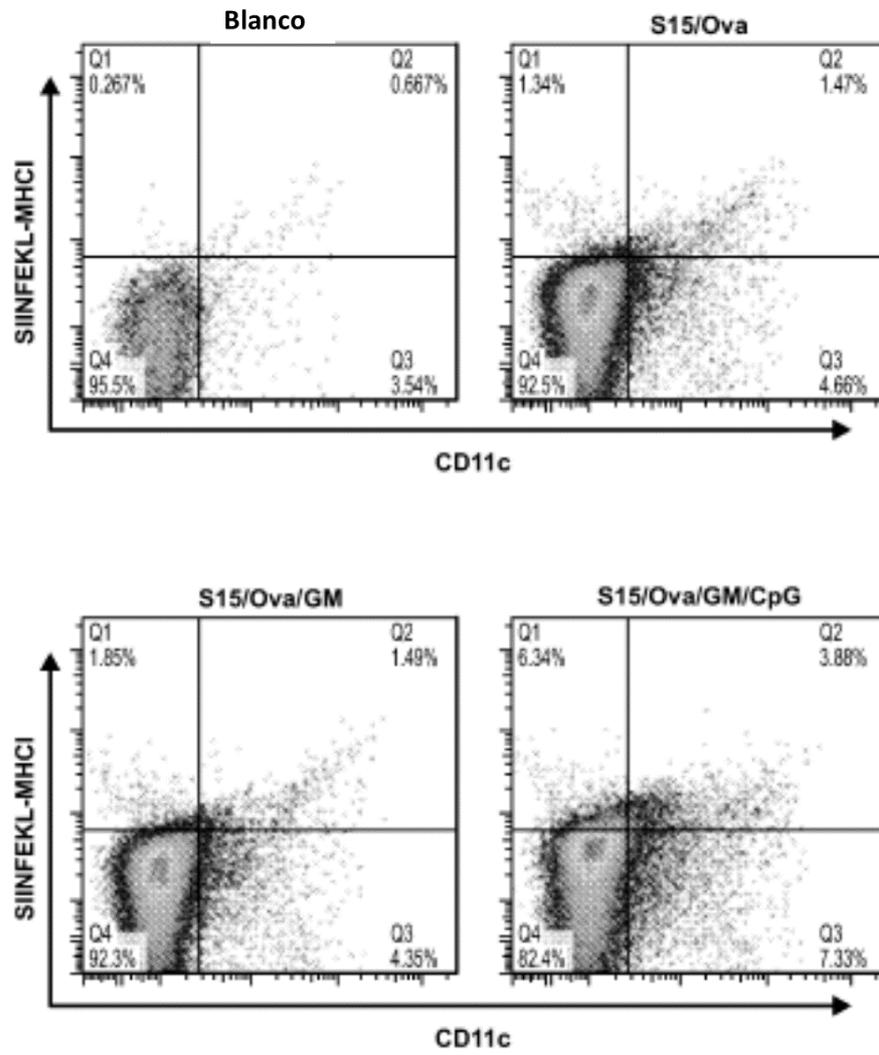


FIG. 7A

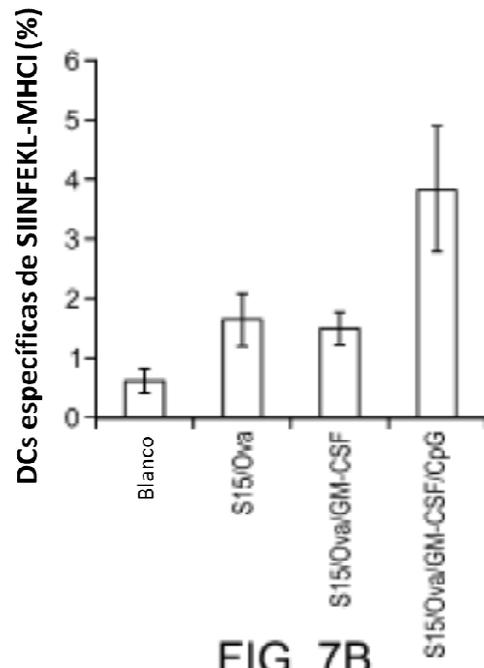


FIG. 7B

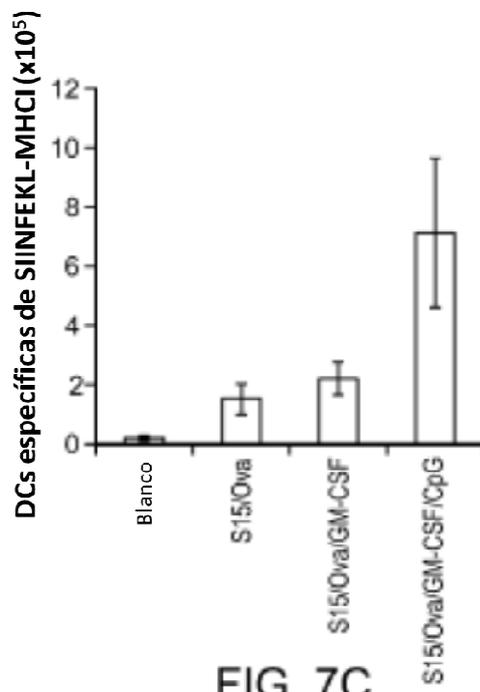


FIG. 7C

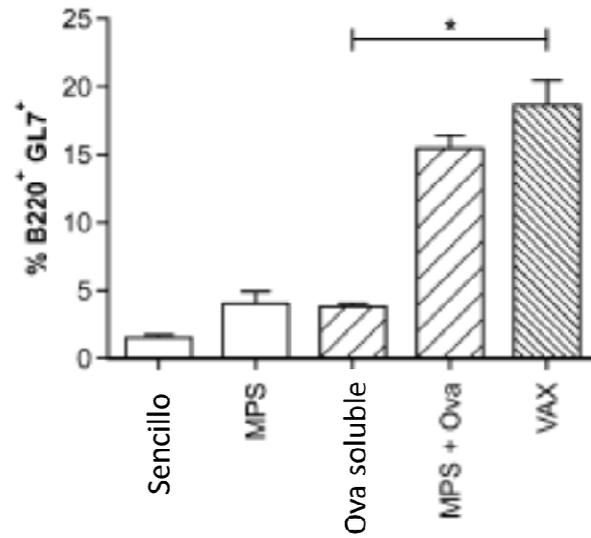


FIG. 8A

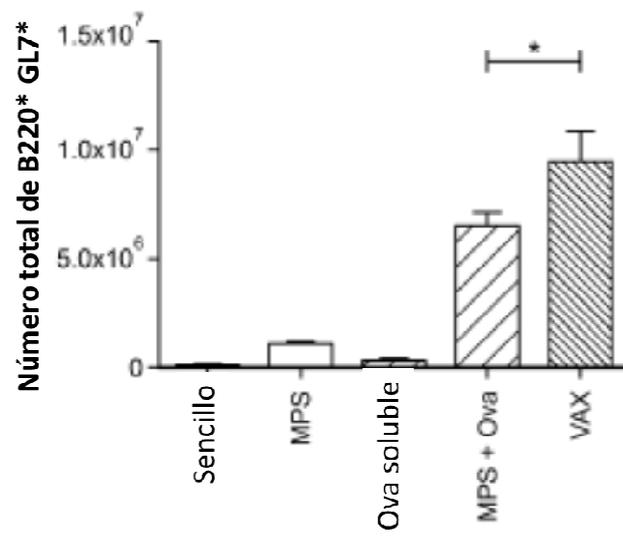


FIG. 8B

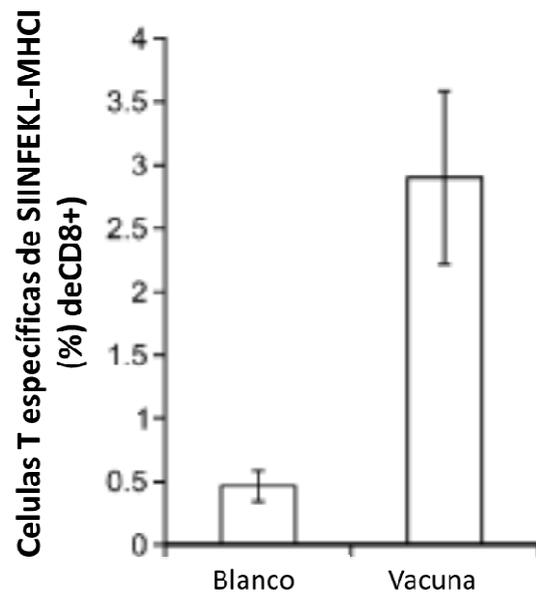


FIG. 9A

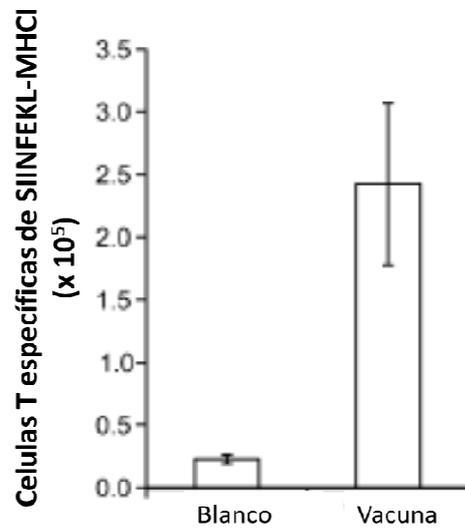


FIG. 9B

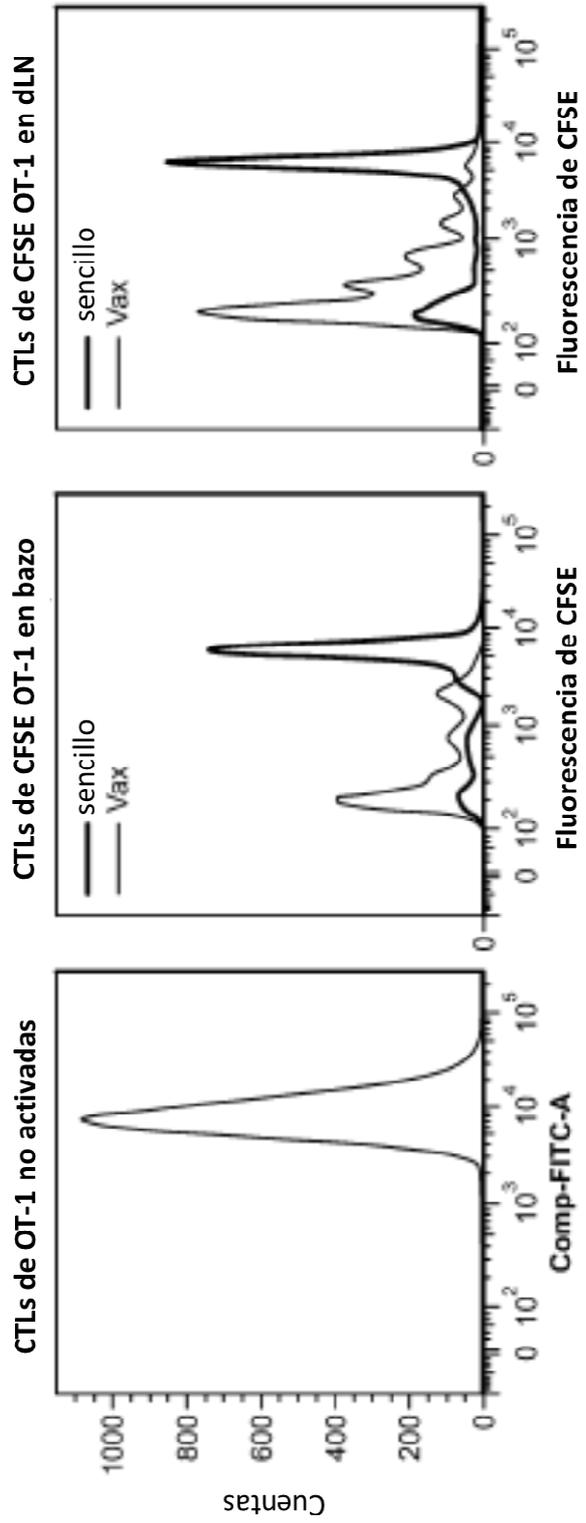


FIG. 10A

FIG. 10B

FIG. 10C

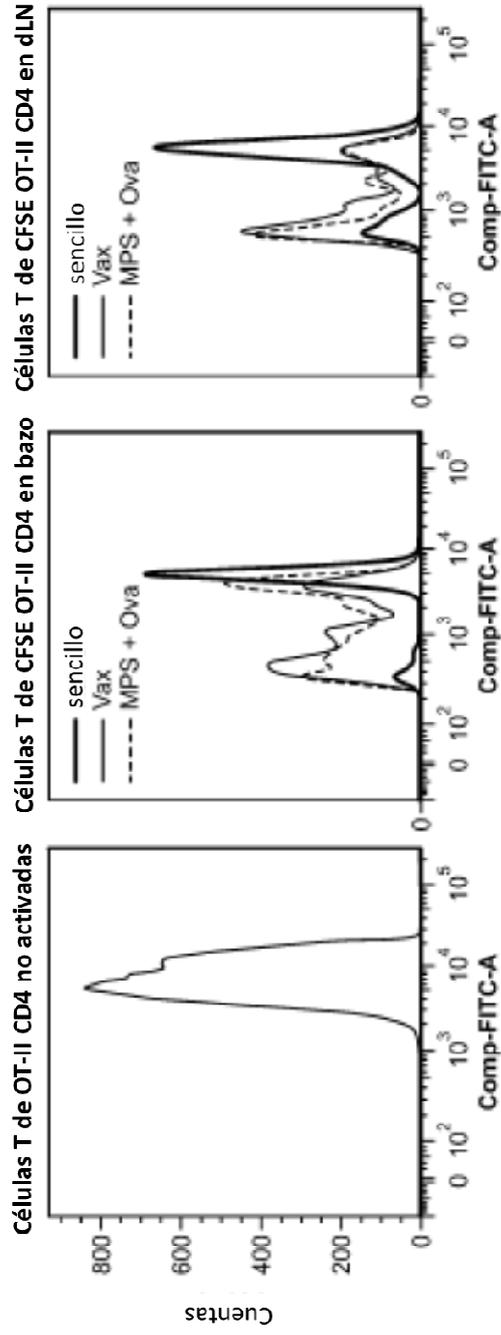


FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C

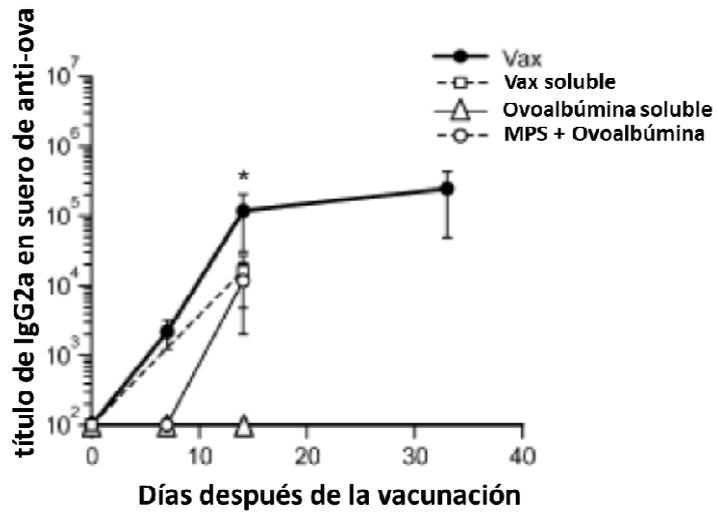


FIG. 12A

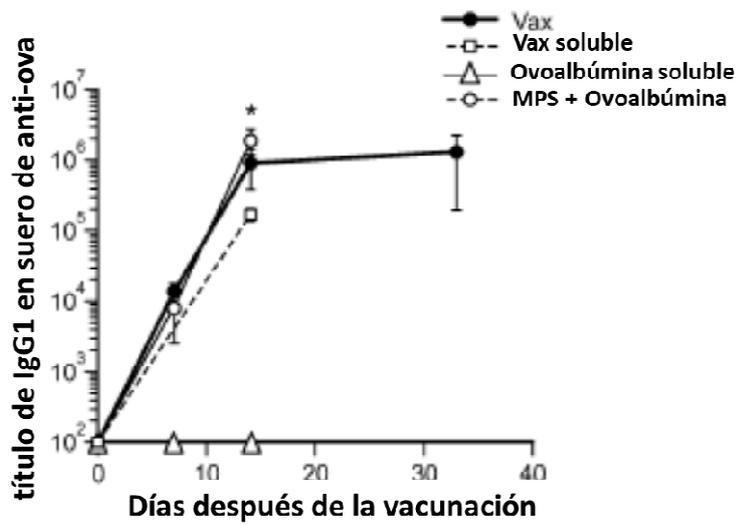


FIG. 12B

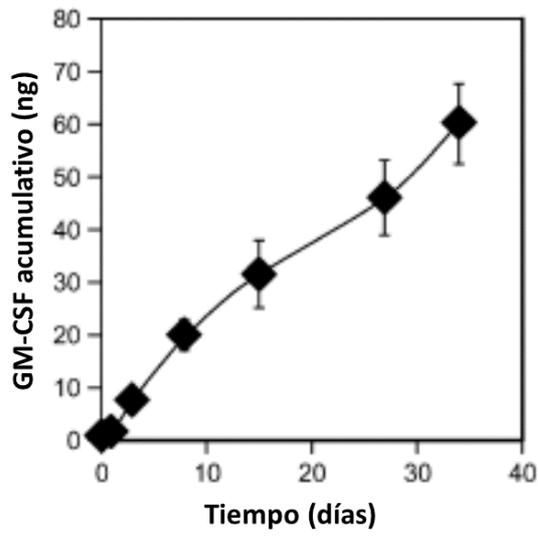


FIG. 13A

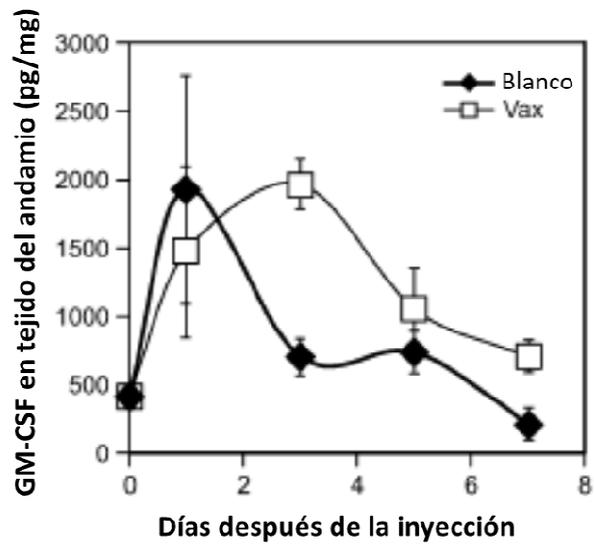


FIG. 13B

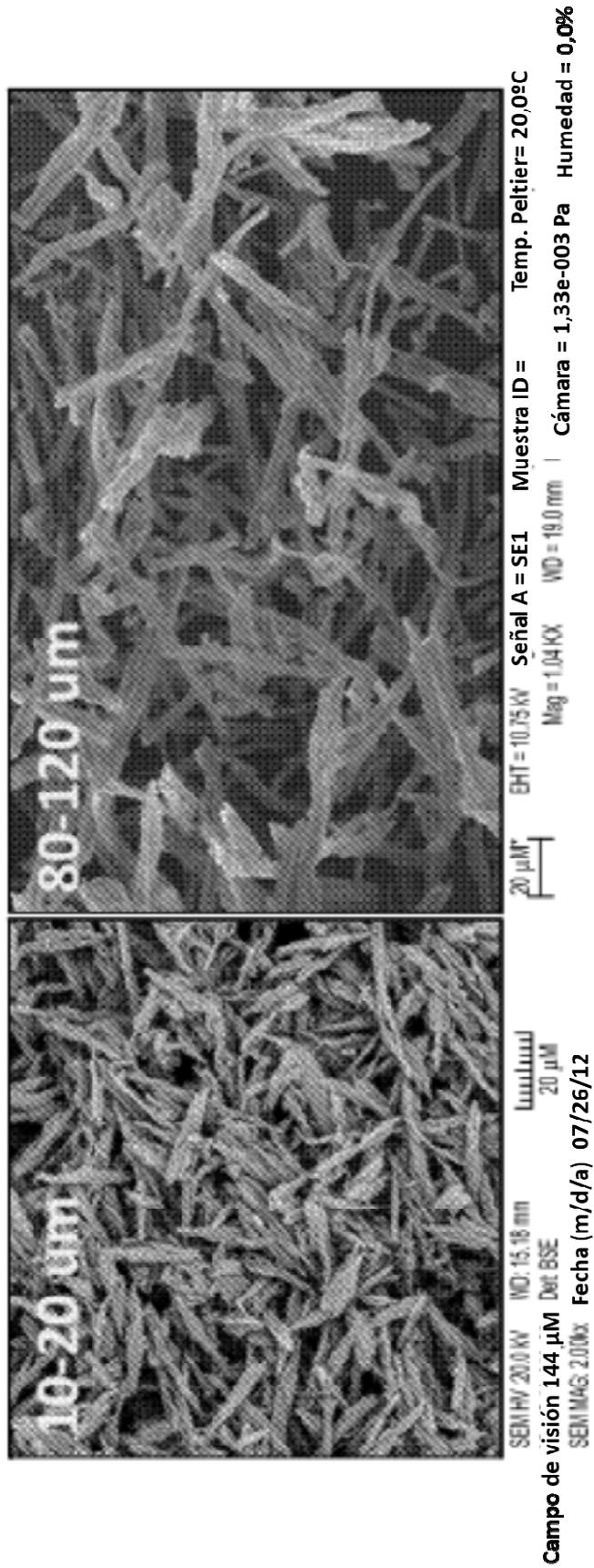


FIG. 14A

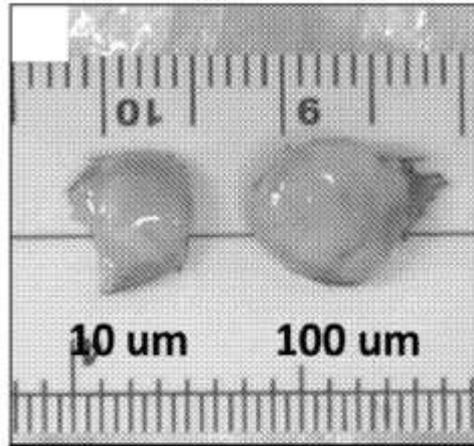


FIG. 14B

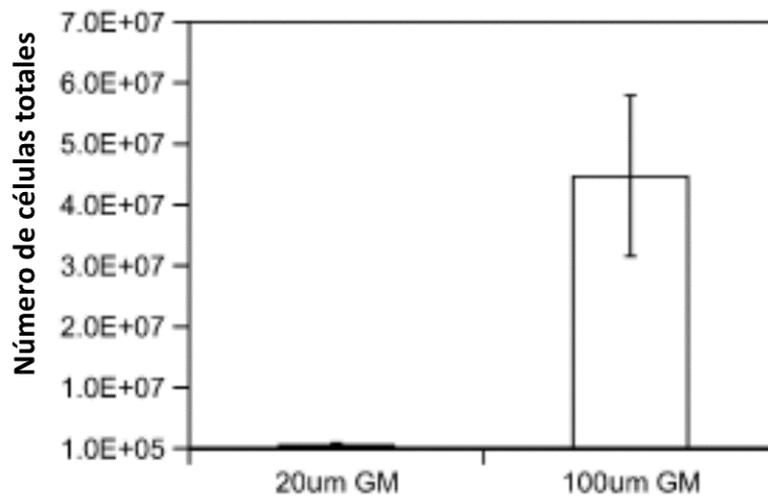


FIG. 14C

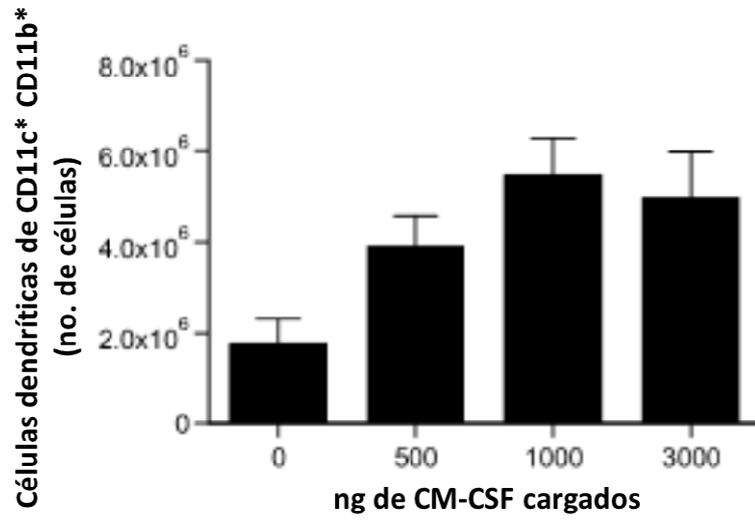


FIG. 15A

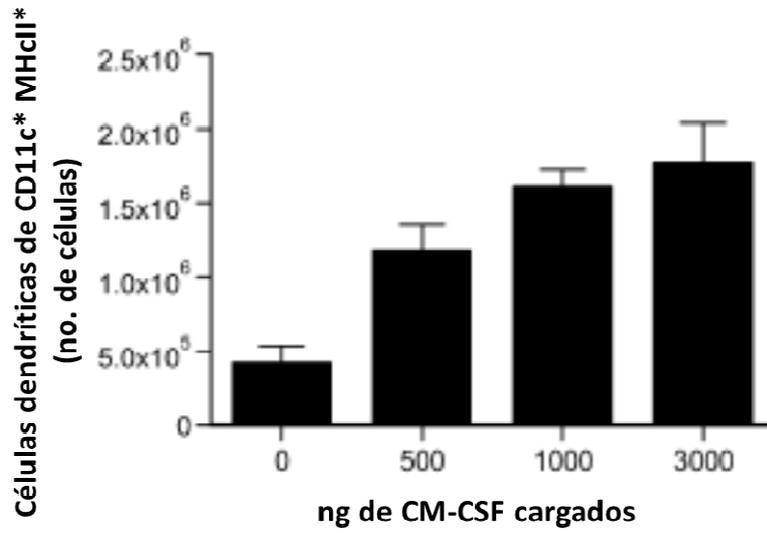


FIG. 15B

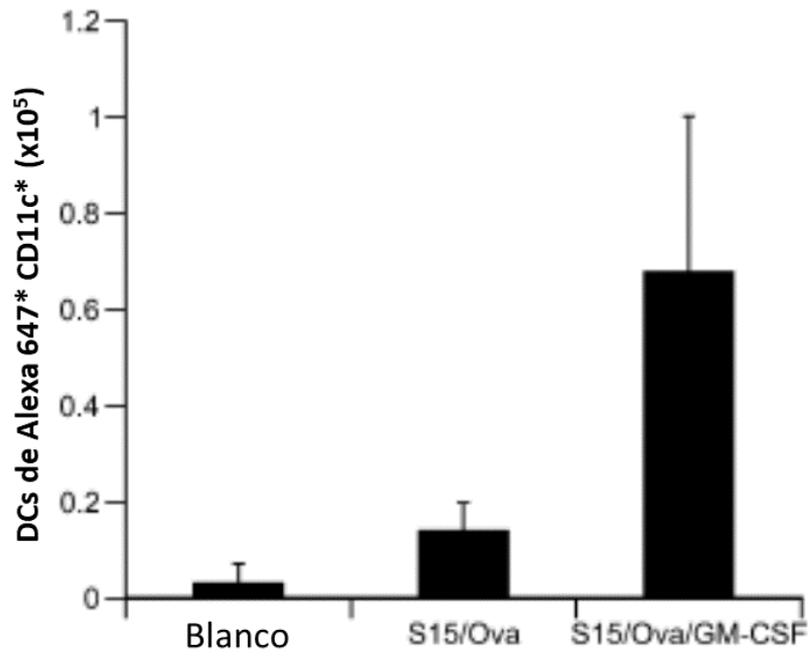


FIG. 16

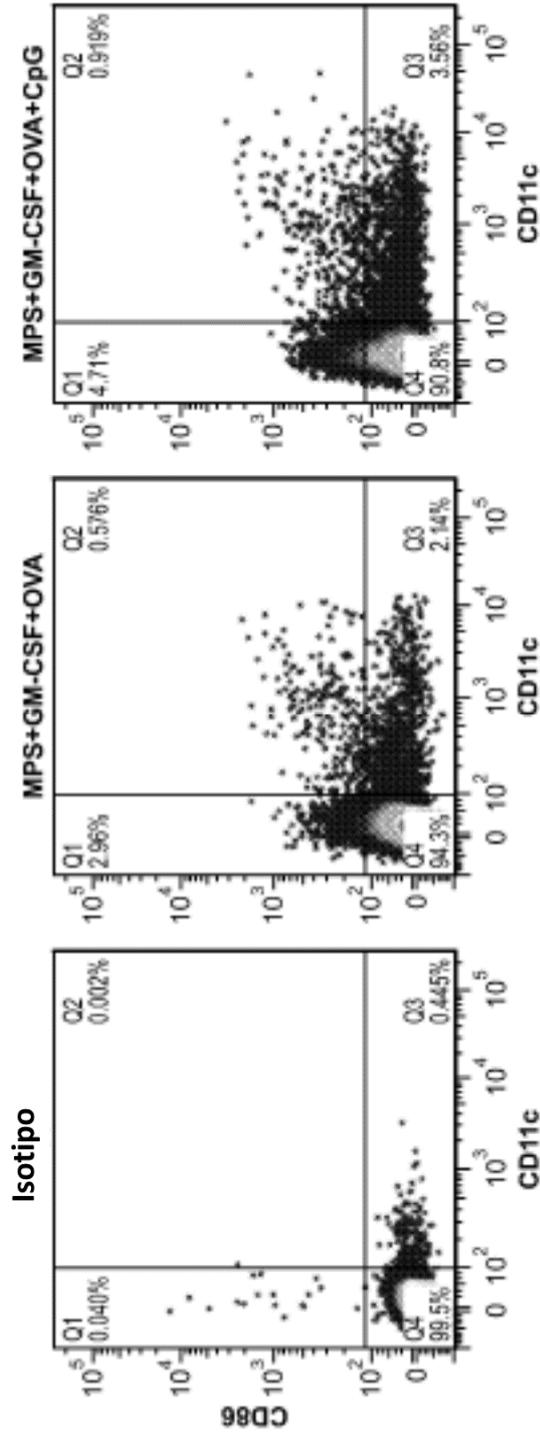


FIG. 17C

FIG. 17B

FIG. 17A

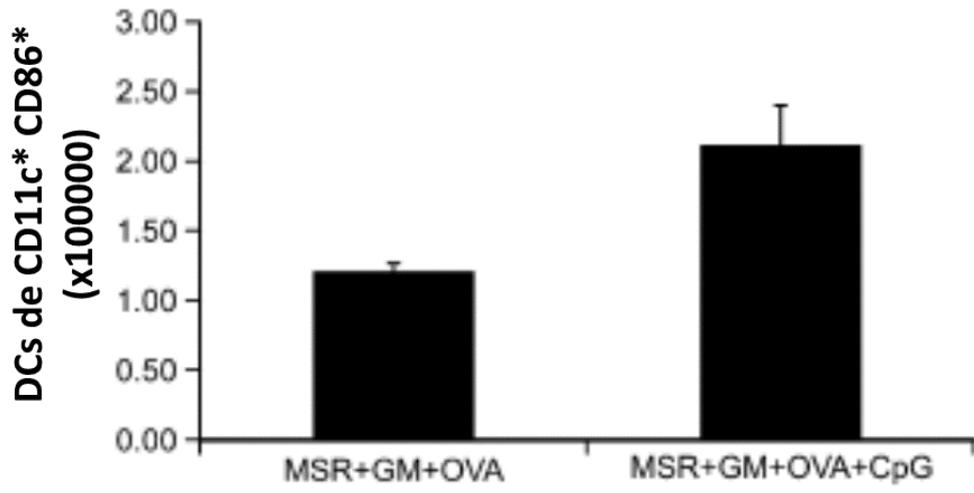
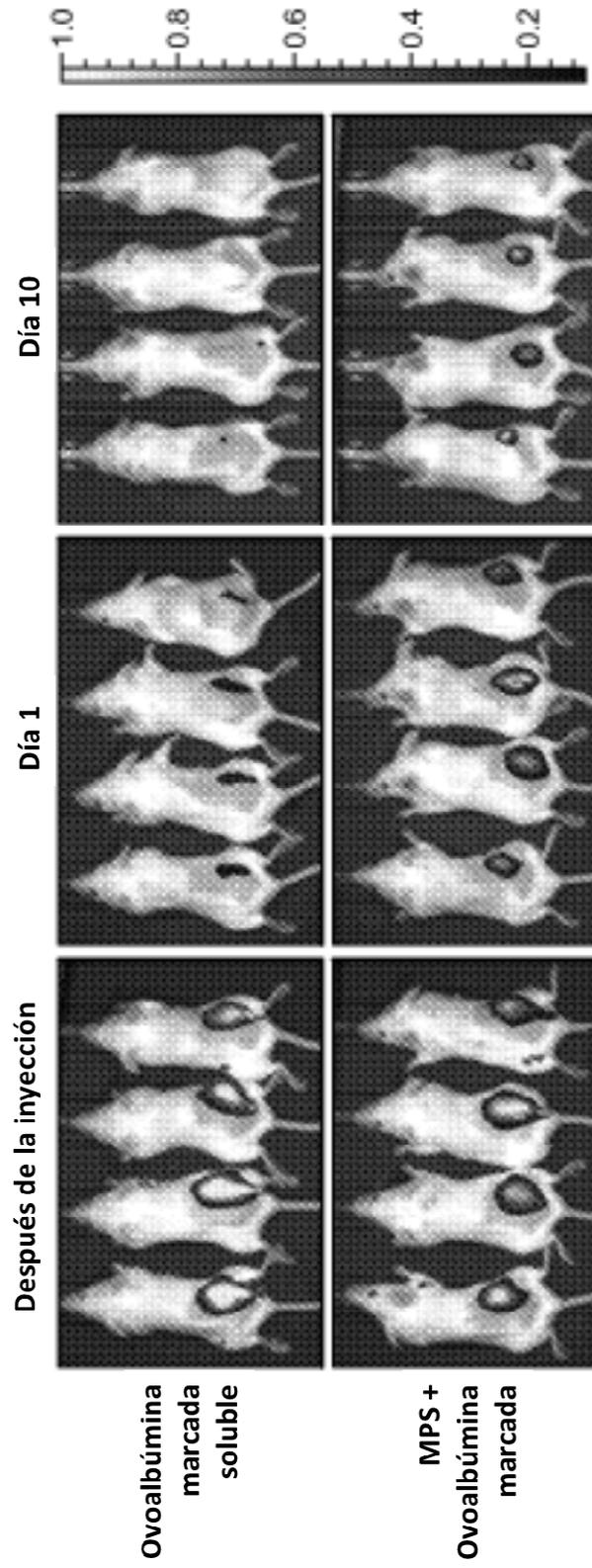


FIG. 17D



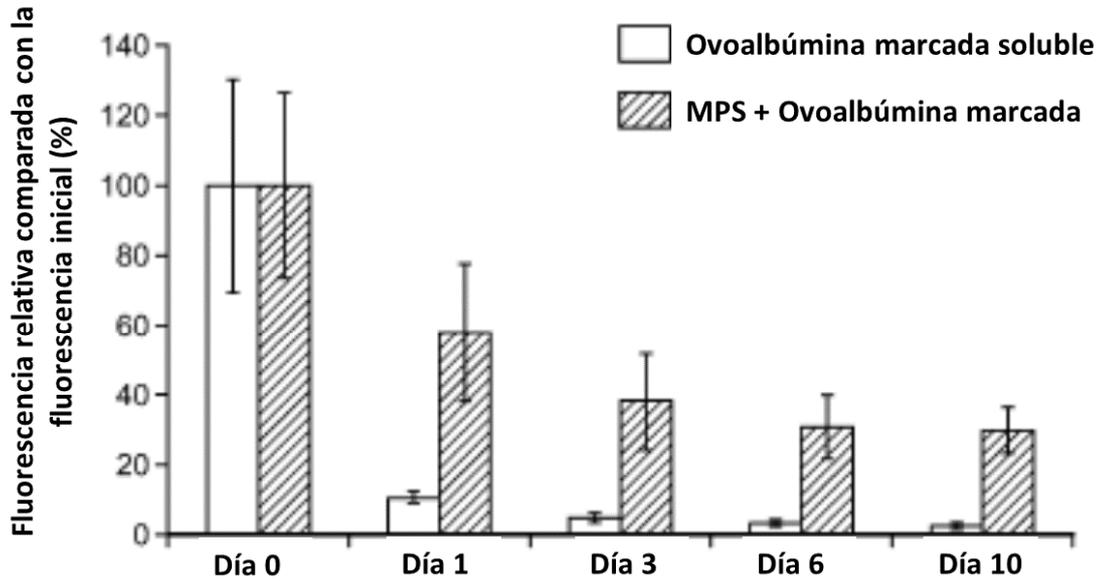
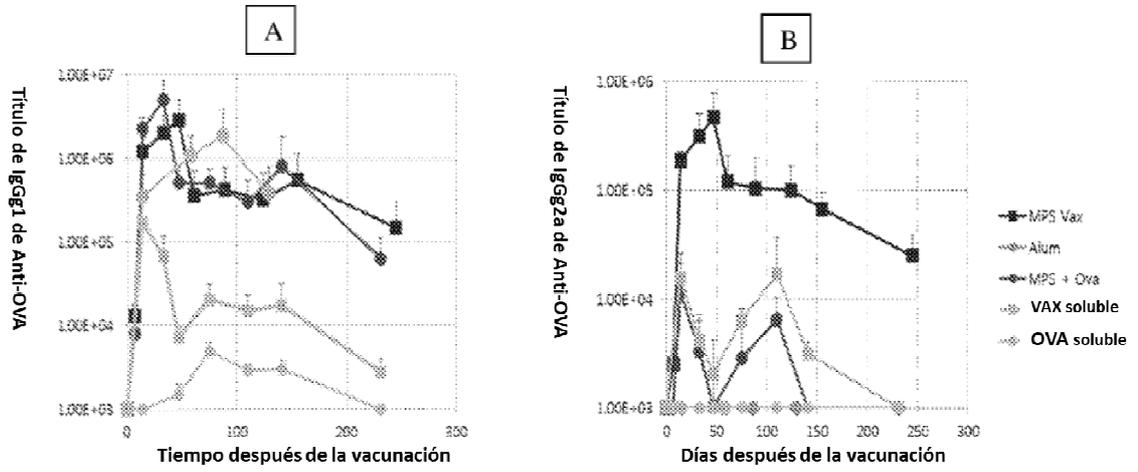


FIG. 18D

Figuras 19 A - B



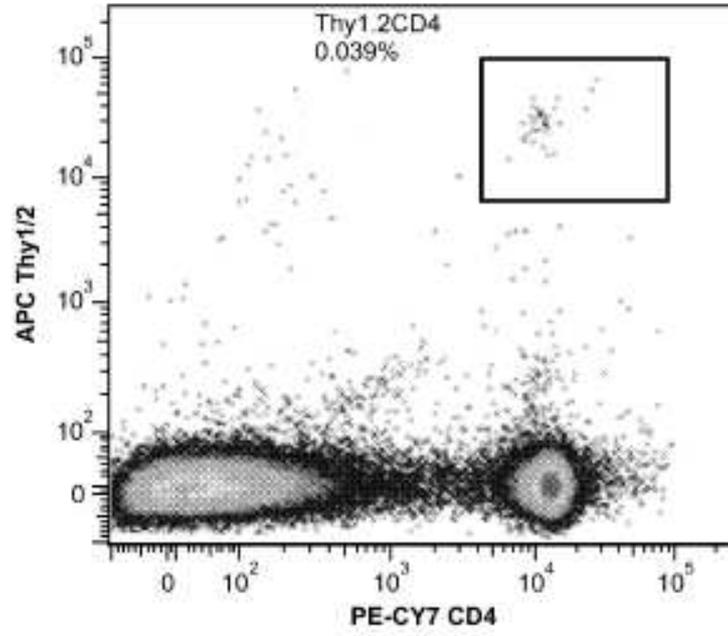
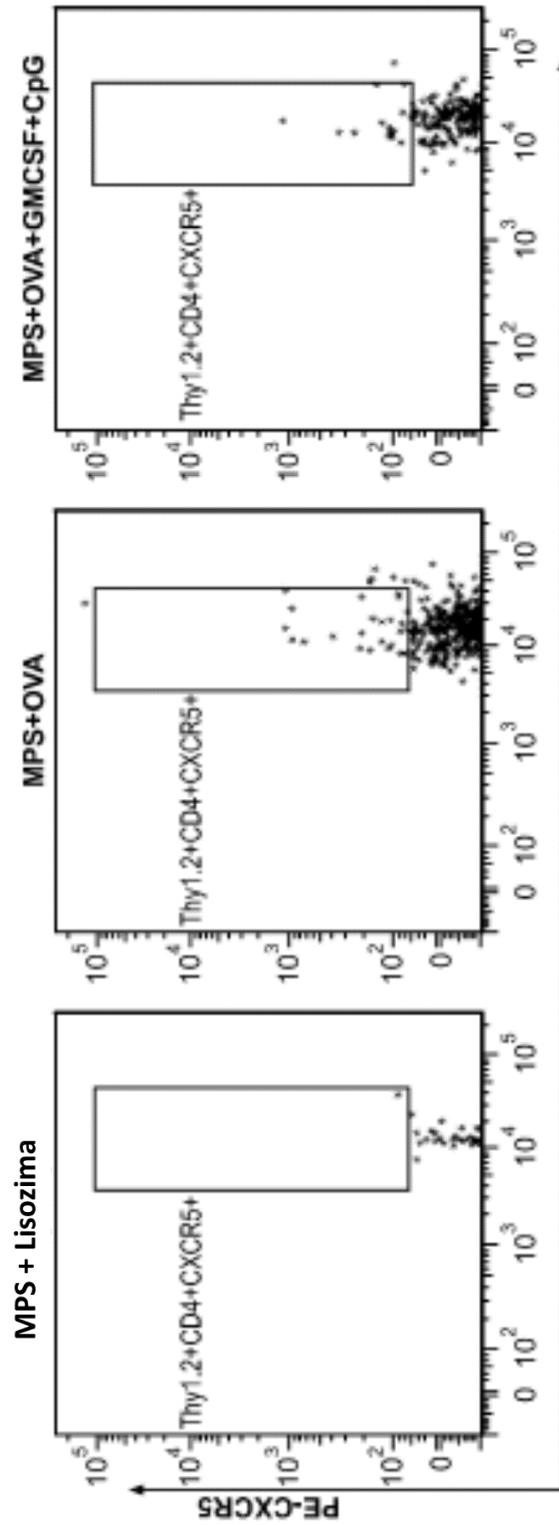


FIG. 20A



FITC-CD4

FIG. 20B

FIG. 20C

FIG. 20D

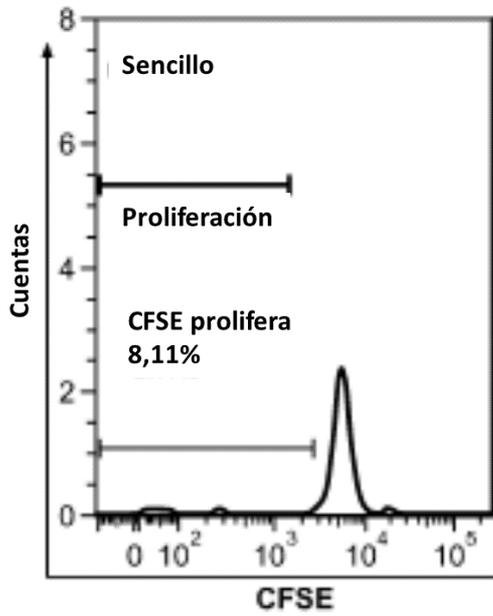


FIG. 21A

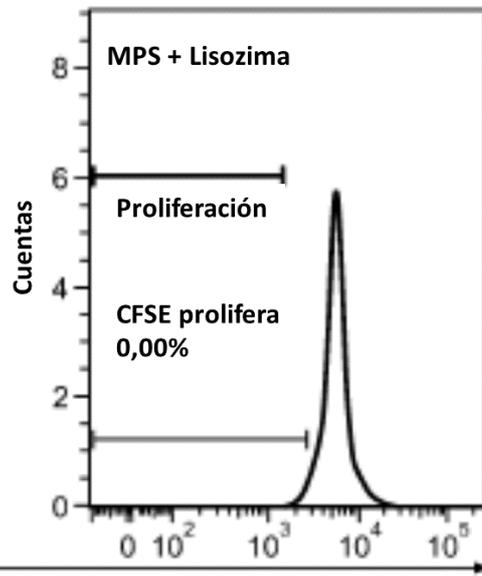


FIG. 21B

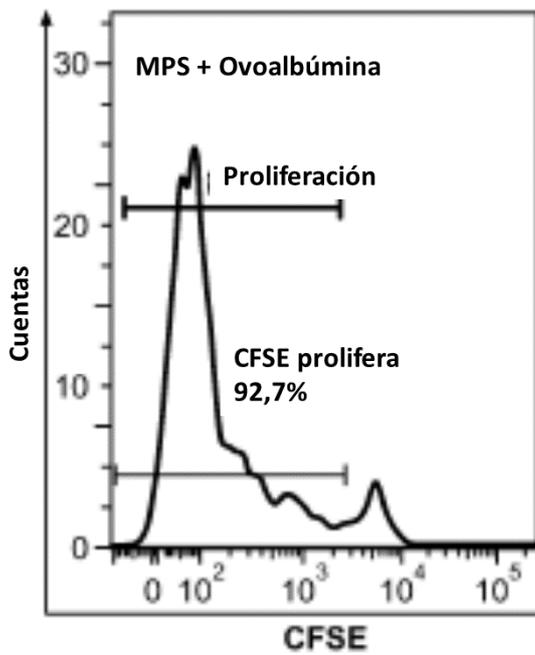


FIG. 21C

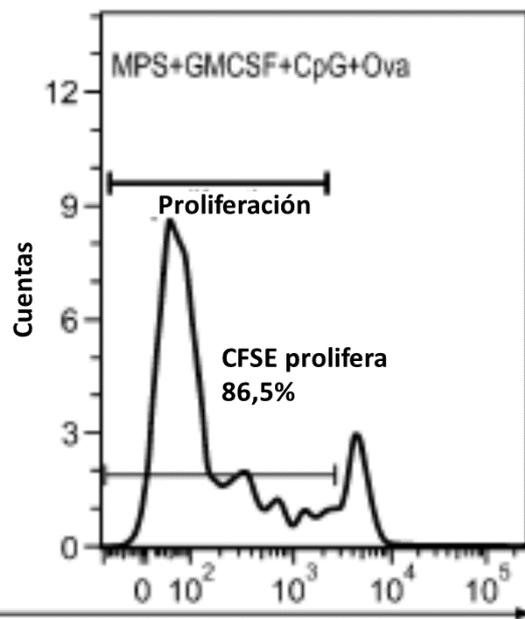


FIG. 21D

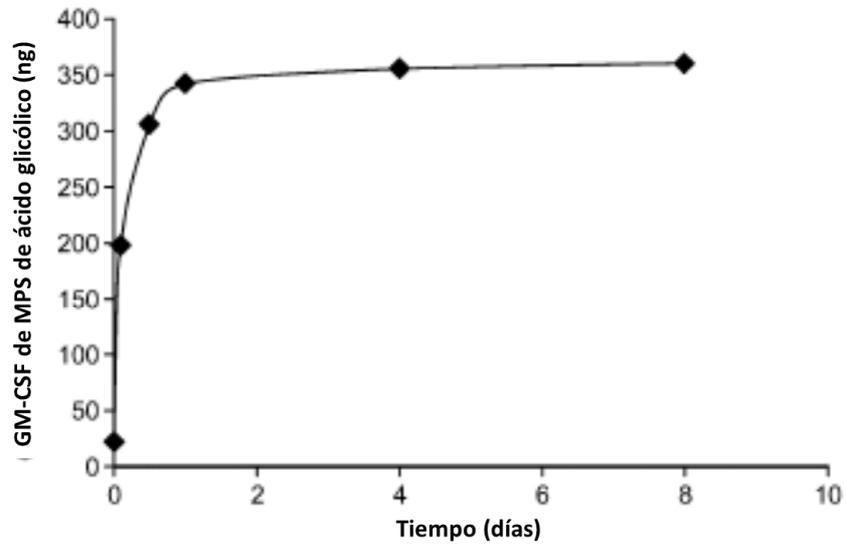


FIG. 22A

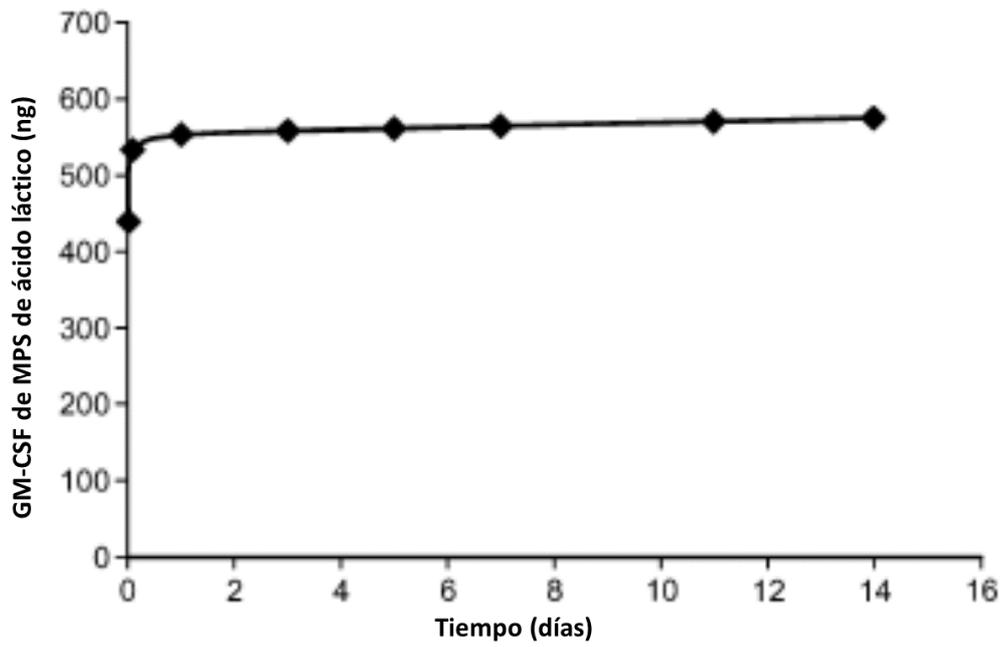


FIG. 22B

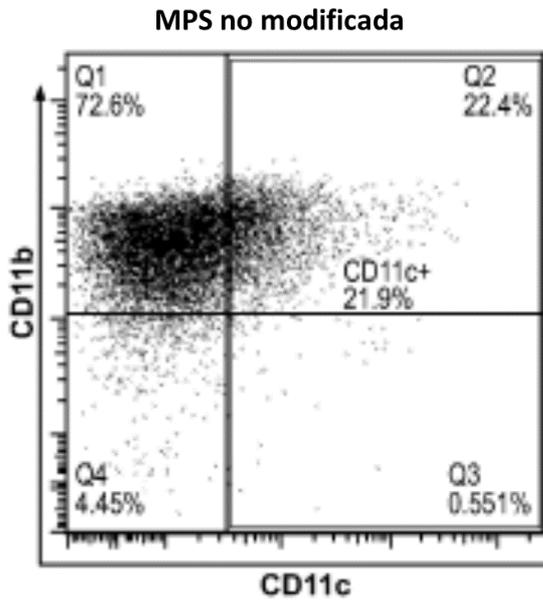


FIG. 23A

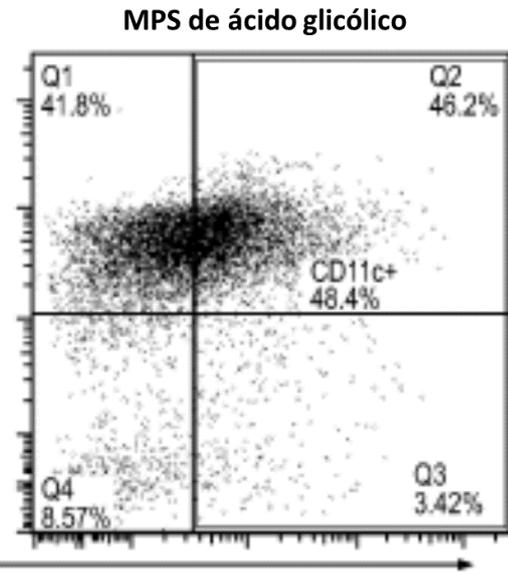


FIG. 23B

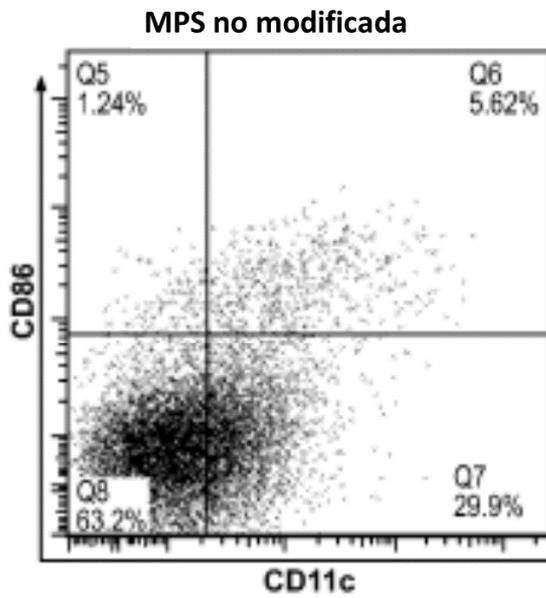


FIG. 23C

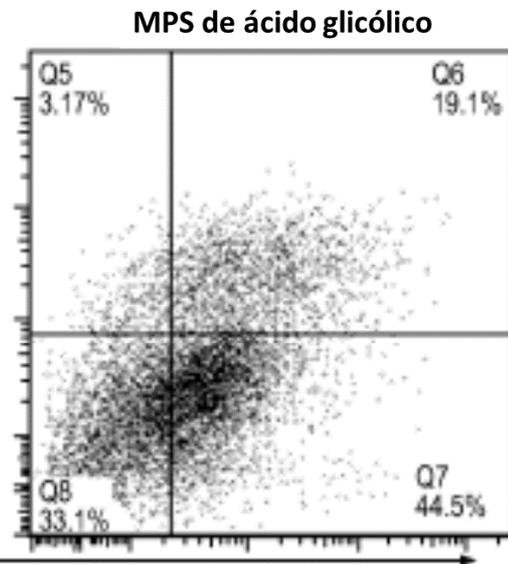


FIG. 23D