COMPOSICIONES VACUNALES A BASE DE STICHOLISINA ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS.

SECTOR TÉCNICO:

La presente invención se relaciona con el campo de la Biotecnología aplicada a la salud humana. Particularmente, la presente invención se refiere a un vehículo vacunal para uso tanto subcutáneo como intramuscular basado en liposomas que contienen sticholisina y que potencian una respuesta inmune celular específica a antígenos, útil en la inmunoterapia del cáncer y en el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos intracelulares.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR:

Se conoce desde hace tiempo la capacidad inmunoadyuvante de las vesículas liposomales. La racionalidad que existe en el empleo de los liposomas en inmunizaciones y en el diseño de vacunas se basa en su capacidad para liberar la molécula antigénica en las células presentadoras de antígenos (APC) y estimular una respuesta inmune. Las ventajas fundamentales de los liposomas como inmunoadyuvantes se resumen en: (i) la capacidad de mimetizar patógenos al transportar grandes cantidades de antígenos a las APC, (ii) la posibilidad de co-encapsular antígenos junto con moléculas inmunoestimuladoras, (iii) la flexibilidad en cuanto a la modificación de sus propiedades físico-químicas con el propósito de una mayor efectividad, y (iv) el hecho de ser biodegradables y no tóxicas (Leserman en Journal of Liposome Research, 2004, 14 (3 & 4),175–189).

Un reto en el campo de la vacunología es la potenciación de una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) específica a antígenos, con relevancia para la prevención y tratamiento de enfermedades inducidas por patógenos intracelulares y células tumorales. Las vesículas liposomales pueden potenciar una respuesta CTL pero no siempre de manera efectiva. Se han diseñado diferentes estrategias basadas en vesículas liposomales con la intención de hacer más eficiente esta función; ejemplo de ello son los liposomas sensibles al pH acídico endosomal, liposomas catiónicos, la inclusión de inmunomoduladores tales como CpG y toxinas formadoras de poro de origen bacteriano. A pesar de la diversidad de

publicaciones, alguna de estas estrategias han tenido un limitado éxito en la inducción de una respuesta inmune celular efectiva o presentan desventajas por lo que requieren un mejor diseño antes de su aplicación.

La integración de proteínas de membranas virales en la membrana liposomal con el propósito de favorecer la fusión de membranas bajo condiciones de pH ácido o de procesamiento proteolítico, ha sido otra alternativa para el desarrollo de vehículos vacunales. Estas vesículas conocidas como virosomas no sólo han sido empleadas como vacunas del virus parental, sino que también han sido explotadas como vehículos para antígenos vacunales, enlazados o encapsulados al virosoma (Zurbriggen en Vaccine, 2003 14; 21(9-10):921-4). Las partículas virosomales conocidas con las siglas IRIV (*immunopotentiating reconstituted influenza virosomes*), que contienen las proteínas y lípidos de la envoltura del virus influenza, son el mejor representante de esta estrategia y constituyen la base de la patente de la vacuna contra la hepatitis A (patente núm. US 5, 565,203). Sin embargo, este preparado vacunal se diseñó para potenciar una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la hepatitis A. La inmovilización de virus de hepatitis A inactivados y altamente puros en la membrana del virosoma favoreció el procesamiento y la presentación de los péptidos derivados por la vía clásica MHCII, como resultado del proceso de fusión de las membranas virosomal y endosomal en las APCs (Glück y Wälti en Dev Biol (Basel), 2000, 103,189-97). Las evidencias descritas indican que la asociación física antígenos-virosomas es importante en la inmunoadyuvanticidad (Zurbriggen *y otros*, Progr., en Lipid Res., 2000, 39(1), 3-18; Amacker *y otros*, en Int Immunol., 2005, 17(6), 695-704).

Schumacher *y* otros, en Vaccine 22:714-723, 2004, informaron que los IRIVs son también capaces de potenciar la respuesta inmune mediada por células. En particular, Schumacher y otros demostraron su actividad adyuvante en la inducción de CTL *in vitro.* Esta capacidad dependió principalmente de la estimulación de la reactividad de las células T CD4+ específica a las proteínas virales. Sin embargo, aunque el uso de los virosomas como adyuvante tiene numerosas ventajas como es la baja toxicidad y la elevada inmunogenicidad, uno de los problemas en la actual tecnología virosomal es la no existencia de procedimientos para el encapsulamiento eficiente de solutos, tales como proteínas, necesaria para la inducción de una respuesta CTL. A la

concentración de lípidos a la cual los virosomas se producen (1 mM de lípidos aproximadamente), y dado su diámetro de aproximadamente 200 nm, menos del 1 % de la fase acuosa resulta encapsulada dentro de los virosomas (Schoen *y otros,* en J. Liposome Res., 3: 767-792, 1993). Estas características reducen notablemente la eficiencia de los virosomas de liberar antígenos o genes a las células. Una estrategia para superar esta limitación y generar una preparación inmunogénica para células T CD8+, recientemente publicada en la solicitud de patente núm. US 20100015214, se basa en la combinación de virosomas vacíos con vehículos, preferiblemente liposomas, que encapsulan el o los antígenos. US 20100015214, describe un efecto trans-adyuvante para los virosomas, aunque estas partículas y los liposomas no exhiban ninguna interacción física entre ellos.

En el artículo de Lanio y otros, publicado en J Liposome Res.,2008, 18(1),1-19 se describe, para el EGFhr, la mayor eficiencia de encapsulación-retención de liposomas obtenidos por el procedimiento de deshidratación-rehidratación (DRVs) y constituidos por fosfatidil colina (PC) saturada (dipalmitoil fosfatidil colina, DPPC) y colesterol (Cho) en una relación molar 1:1 en comparación con aquellos que contienen PC insaturada y Cho. De hecho, el procedimiento de obtención de DRVs rinde vesículas de múltiples bicapas con elevada eficiencia de encapsulación/retención para una gran diversidad de solutos solubles. Lanio y otros, demostraron las propiedades inmunoadyuvantes de estas vesículas para potenciar una respuesta de anticuerpos cuantitativa y cualitativamente superior contra el EGFhr.

En la revisión realizada por Álvarez y otros, y publicada en Toxicon, 2009, 54(8):1135-47, se resumen las características estructurales y funcionales de dos proteínas producidas por un invertebrado marino, la anémona del Mar Caribe *Stichodactyla helianthus,* y nombradas por los autores sticholisinas (Sts) I y II (StI/II). Estas son toxinas formadoras de poros (PFTs) pertenecientes a la familia de proteínas *Actinoporinas*, única clase de PFTs de origen eucarionte encontradas exclusivamente en anémonas marinas. Al igual que el resto de los miembros de esta familia, las Sts son proteínas básicas con elevado punto isoeléctrico (>9.5), con masa molecular de aproximadamente 20 kDa, carentes de residuos de cisteína en su secuencia aminoacídica y una preferencia por membranas que contienen esfingomielina (SM). Las Sts son

producidas en forma soluble pero fácilmente se asocian a diferentes sistemas de membranas celulares y modelos formando poros de un diámetro de 2 nm, probablemente por la interacción de las α hélices del N-terminal de cuatro monómeros. Ambos eventos, la asociación y la formación del poro, dependen de las propiedades físico-químicas de las membranas.

En el artículo de Martínez y otros, publicado en Toxicon, 2007, 49: 68-81 se describe la relevancia de la presencia de la SM y del Cho para el enlace-formación de poros en las membranas por StII. El estado de fase de la membrana influye sobre la asociación de StII con estas estructuras. Según lo publicado por Martínez y otros, en la Revista Biología, 2002, 16, 2: 85-93, esta toxina se asocia reversiblemente a membranas de DPPC y SM y con una muy baja capacidad de permeabilización.

Si bien se ha informado ampliamente las propiedades inmunomoduladoras de las toxinas formadoras de poros de origen bacteriano para la inducción de una respuesta CTL específica a antígenos, empleando diferentes estrategias que incluye su vehiculización en liposomas, tal y como se resumen en las revisiones realizadas por Dietrich y otros, y Morón y otros, en TRENDS in Microbiology, 2001, Vol.9 No.1, 23-28 y TRENDS in Immunology, 2004, Vol.25 No.2, 92-97, respectivamente; nada se ha referido a las toxinas funcionalmente homólogas y provenientes de organismos eucariontes marinos.

Desde el punto de vista de sus aplicaciones en el tratamiento inmunológico de enfermedades tumorales, resulta deseable disponer de nuevas composiciones vacunales que sean capaces de inducir una respuesta inmune celular específica al antígeno y que sean menos agresivas que aquellas composiciones que contienen toxinas bactarianas.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION:

De manera sorprendente, los autores de la presente invención han encontrado que cuando un antígeno se administra por vía subcutánea (sc) o intramuscular (im) encapsulado en la formulación vacunal Liposoma-St, con cualquiera de las variantes de toxinas descritas e incluyen las que no exhiben actividad formadora de poros o lítica, se inducen porcentajes de lisis de las células diana muy superiores a las que se observan en el grupo control positivo que usa ácido polinosinoico-policitidílico (PIC) que se considera en el estado del arte

como el potenciador por excelencia de la respuesta CTL, sin modificar los niveles de anticuerpos y la respuesta mixta Th1/Th2 que induce el antígeno liposomal. Esto indica la potencialidad del sistema liposoma-St para generar una respuesta tanto celular como humoral contra un antígeno proteico, lo cual es relevante para el empleo de esta formulación con fines vacunales.

Es objeto de la presente invención un vehículo vacunal basado en preparaciones liposomales de DPPC y Cho en las que se co-encapsulan las toxinas conocidas como Sts junto con un antígeno proteico. También son objeto de la presente invención aquellas preparaciones liposomales de DPPC y Cho en las que se co-encapsulan mutantes de las toxinas conocidas como Sts (ej: StIW111C y StIW111C_{irrev}) junto con el antígeno proteico.

En otro aspecto, también son objeto de la presente invención las composiciones vacunales basadas en este vehículo vacunal y que contienen las toxinas conjuntamente con un antígeno y se administran por la vía sc o im, para la inducción de una potente respuesta CTL especifica al antígeno en cuestión.

Es también objeto de la presente invención el uso de las composiciones vacunales descritas, basadas en este vehículo vacunal y que contienen las toxinas conjuntamente con un antígeno y se administran por la vía sc o im para el reforzamiento de la respuesta inmune de un paciente que sufra una patología seleccionada del grupo que consiste en cáncer y enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares.

En otro aspecto también es objeto de la presente invención un método para el tratamiento de un paciente que requiera un reforzamiento de su respuesta inmunológica, la administración por la vía sc o im, de composiciones vacunales basadas en este vehículo vacunal y que contienen las toxinas Sts o sus mutantes conjuntamente con un antígeno relevante para la patología.

Adicionalmente, la presente invención también se relaciona con la protección que proporcionan dichas composiciones vacunales ante el reto con células tumorales que expresan el antígeno, se reduce el porcentaje de aparición de tumores y se incrementa la sobrevida de los sujetos portadores. Por tanto es también objeto de la presente invención un método profiláctico de aparición de la enfermedad relacionada con el antígeno.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El vehículo vacunal objeto de la invención se basa en dispersiones acuosas de los liposomas DRVs de DPPC:Cho en una relación molar 1:1 que encapsulan St conjuntamente con el antígeno, y que eventualmente pueden contener otros co-disolventes miscibles con el agua, no tóxicos, no irritantes y que no provoquen desestabilización de las vesículas, tales como aquellos habitualmente empleados en composiciones farmacéuticas inyectables, por ejemplo azúcares, polietilenglicol, etc.

Las preparaciones liposomales de la presente invención son obtenidas por el procedimiento de deshidratación-rehidratación y constituidas por DPPC y Cho en una relación molar 1:1 y que co-encapsulan algunas de las variantes de Sts o de sus mutantes reversiblemente inactivas junto con un antígeno; en donde dichas composiciones vacunales son capaces de potenciar una respuesta inmune CTL específica al antígeno y protectiva frente a retos con células tumorales.

En una modalidad de la invención la composición vacunal comprende como antígeno la proteína OVA, pero donde dicho antígeno puede ser cualquier proteína o polipéptido asociado a una patología para la cual, desde el punto de vista terapéutico, sea relevante inducir una respuesta inmune CTL específica contra dicho antígeno proteico. Por ejemplo, el antígeno podría ser una proteína o un polipéptido asociado al cáncer, una proteína o un polipéptido asociado al SIDA o una proteína o un polipéptido asociado a la tuberculosis.

Los liposomas descritos en la presente invención, son obtenidos por la tecnología deshidratación-rehidratación, descrita por Kirby y Gregoriadis en Biotechnology, 1984, 2, 979-984, estos son vesículas con una fase acuosa interna rodeada por varias bicapas lipídicas que se caracterizan por una elevada eficiencia de encapsulación y retención de moléculas lábiles como antígenos e inmunomoduladores de naturaleza proteica. Las soluciones clorofórmicas de DPPC y Cho en una relación molar de 1:1 se rotoevaporan y se mantienen al vacío durante 30 minutos. Los lípidos se hidratan con agua desionizada a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase (Tc) del DPPC (T>45°C). Las suspensiones de vesículas multilaminares (MLVs) resultantes se transforman en SUV o LUV (del inglés: *Small Unilamellar Vesicles* and *Large Unilamellar Vesicles*, respectivamente) mediante ciclos de

ultrasonido y reposo o extrusión a través de membranas de policarbonato de tamaño de poros 100 nm. Las vesículas obtenidas se mezclan con las soluciones proteicas, siguiendo una relación lípido: proteína de 16 - 64 μmol de lípidos: 1.8 -7 nmol de antígeno y 0.5 - 2 nmol de St y se liofilizan durante 20-24 horas. La rehidratación se realiza con agua desionizada y agitación durante 30 minutos a una temperatura igual o superior a 45°C. El material no encapsulado en los liposomas se elimina mediante lavados con tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 (NaCl 136 mmol/l, KH2PO4 1,47 mmol/l, Na2HPO4 9,55 mmol/l, KCl 2,68 mmol/l) seguido de centrifugación a 10 000 g durante 15 minutos. Dichas preparaciones alcanzan una eficiencia de encapsulación para las diferentes variantes de Sts que oscila alrededor de un 50 % con una retención de un 70 % después de un mes de almacenamiento a 4°C en suspensión en PBS.

Las toxinas StI y StII se aíslan y purifican a partir de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus*, mediante el uso del procedimiento descrito por Lanio y otros, en Toxicon. 2001, 39, 187-94. Las Sticholisina I recombinante (StIr) y el mutante de StIr, StI W111C, se obtienen según los procedimientos descritos por Pazos y otros, en Toxicon, 2006, 48,1083-1094. y Pentón y otros, (Artículo en prensa), respectivamente.

En el vehiculo vacunal de la presente invención, la concentración de Sts empleada es está en el rango de 0.25 – 1 μM y es co-encapulada con el antígeno en un rango de concentración de 1 – 3.5 μM en una suspensión liposomal con un rango de concentración de lípidos totales de 16 – 64 mM.

Preferiblemente el vehículo vacunal de la presente invención contiene una cantidad de Sts de 0.3 – 0.4 nmol co-encapulada con 1 – 2 nmol del antígeno en una suspensión liposomal de 20 μmol de lípidos totales en un volumen de 200 μL.

El rango de dosis empleado para las vacunas referidas en la presente invención, por la vía sc o im, es entre 1 nmol – 2 nmol (50-100 μg) del antígeno.

Una característica esencial de las composiciones vacunales objeto de la invención es que carecen de otros adyuvantes inmunológicos excepto los descritos.

Como ya se había explicado anteriormente, es conocido del estado del arte que las toxinas formadoras de poros de origen bacteriano encapsuladas en vesículas liposomales son capaces de potenciar una respuesta CTL, pero se sabe de los efectos adversos que tiene el uso en humanos de composiciones vacunales basadas en toxinas de origen bacteriano; sin embargo, los autores de la presente invención han encontrado de manera inesperada que toxinas no bacterianas son capaces de tener el mismo efecto inmunoestimulante. Más aun, los autores de esta invención han logrado desvincular la actividad formadora de poro de las toxinas de sus efectos estimuladores de la respuesta CTL, lo cual ofrece grandes ventajas para el uso clínico en humanos de este vehículo vacunal. Los resultados obtenidos usando en el vehículo vacunal de la presente invención las entidades moleculares StIW111C$_{irrev}$ o StII inactivada por calor, co-encapsulada con el antígeno en liposomas, permiten demostrar que no existe una dependencia absoluta entre la potenciación de una respuesta inmune CTL específica al antígeno por las formulaciones liposomas-St y la capacidad de estas proteínas de formar poros en las membranas. El ensayo de maduración de células dendríticas (CDs), aisladas de la médula ósea de ratones C57BL/6 y expuestas a StII *in vitro,* demuestra la capacidad de esta proteína, no sólo en su variante activa, sino también en la inactivada por calor, de inducir la activación de las CDs, equivalente a la observada con el LPS (control positivo) en similares condiciones.

La capacidad de Sts de formar poros en membranas se evaluó mediante ensayos de actividad hemolítica y de permeabilización de LUVs cargados de carboxifluoresceína (CF) tal y como se describe por Martínez y otros, en Toxicon, 2001, 39,1547–1560. Se demostró que Sts no exhiben actividad permeabilizante mediante un ensayo de permeabilización de vesículas liposomales de DPPC:Cho (1:1) que encapsulan CF, en comparación con la observada en vesículas constituidas por fosfatidil colina de yema de huevo y SM (1:1) (Control positivo).

Se verificó que el mutante StIW111C forma un dímero inactivo estabilizado por un enlace disulfuro mediante el ensayo de actividad hemolítica y electroforesis en PAGE-SDS en presencia y ausencia de 2-mercaptoetanol (2-ME) como agente reductor, tal y como se describe por Pentón *y otros,* en Protein Eng Des Sel. 2011, 24, 485-493. La incapacidad de la estructura dimérica de formar

poros en el eritrocito, como célula modelo, fue el resultado de su no asociación con la membrana.

Se estableció un procedimiento para la obtención de una especie dimérica irreversible de StIW111C (StIW111C$_{irrev}$) basado en la reducción de StIW111C por incubación con 2-ME (0,1 mol/l), la eliminación de este agente reductor mediante filtración en una columna PD-10 y la incubación inmediata de StIW111C$_{monómero}$ con el reactivo homobifuncional bis (maleimido) hexano (BMH) en una relación molar StIW111C$_{monómero}$: BMH 1:1 ó 2:1, durante 2 horas a 4 °C. StIW111C$_{irrev}$ se purificó mediante cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 75 HR 10/30 en presencia de un agente reductor. La obtención del dímero irreversible y su grado de pureza se verificó mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. El dímero irreversible se obtuvo con un 94% de pureza y solo un 6% de dímero reversible contaminante. La ausencia de actividad funcional se verificó mediante el ensayo de actividad hemolítica.

La inactivación irreversible de StII se realizó mediante tratamiento térmico, según el procedimiento descrito por Martínez y otros, en Toxicon, 2001, 39,1547–1560 y la pérdida total de la capacidad de formar poros en membrana se comprobó mediante el ensayo de actividad hemolítica.

Las propiedades inmunomoduladoras de las diferentes especies moleculares Sts en el sistema particulado liposoma-St, relacionadas con su capacidad de potenciar una respuesta inmune citotóxica antígeno-específica *in vivo* e inmunidad antitumoral en un escenario preventivo, se puede medir en el modelo experimental de ratones de la cepa C57BL/6 empleando el antígeno y la línea tumoral E.G7, un subclon del timoma murino EL-4 (Kusmartsev y Gabrilovich, en J Leukoc Biol., 2003, 74: 186-96), transfectado con el DNA complementario de OVA pAc-neo-OVA (Moore, y otros, en Cell, 1988, 54: 777-85) y obtenida de la "*American Type Cultures Collection*" (ATCC, VA).

Los autores de la presente invención también han encontrado que la inoculación preventiva con el vehículo vacunal liposomas-St que contienen el antígeno, induce protección antitumoral y superior a la generada por liposomas que no contienen StII. Estos resultados demuestran que el sistema liposomas-St es efectivo para inducir una respuesta antitumoral funcionalmente robusta y protectora, cuando se emplea un antígeno proteico, sin la necesidad de otros

adyuvantes. A su vez, el uso de esta preparación en terapias combinadas pudiera potenciar aún más su efecto antitumoral.

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

EJEMPLOS:

Ejemplo 1:_Evaluación de citotoxicidad y respuesta CTL del vehículo vacunal usando StI o STII nativas y como antígeno la proteína OVA.

El vehículo vacunal basado en liposomas se preparó según lo descrito previamente. En vesículas DRVs compuestas de DPPC y Cho (relación molar 1:1) se co-encapsuló la OVA como antígeno modelo y Sts (StI o StII) en una relación 10 µmol de lípidos totales: 1.1 nmol OVA y 0.3 nmol de St en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4. De esta manera se obtuvieron dos composiciones vacunales:

Composición vacunal A: Liposomas DRVs de DPPC:Cho (60 µmol de lípidos totales) que encapsulan 6.6 nmol (50 µg) de OVA.

Composición vacunal B: Liposomas DRVs de DPPC:Cho (60 µmol de lípidos totales) que co-encapsulan 6.6 nmol (50 µg) OVA y 1.88 nmol de StI o StII.

Se seleccionaron 15 ratones hembra C57BL/6 con un peso corporal comprendido entre 18-20 g, y se separaron en 5 grupos de ensayo de 3 animales cada uno.

El Grupo 1 (control negativo) se inoculó por vía sc, a los días 0, 12, 13 y 14, con 0.2 ml de tampón fosfato salino (PBS).

El Grupo 2 (control positivo) se inoculó por vía sc, el día 12, con 22.2 nmoles (1 mg) de OVA y mezcló con 100 µg de ácido polinosinoico-policitidílico (PIC), un ligando sintético de TLR3 y un inductor clásico de respuesta CTL (Hamilton-Williams *y otros,* en J. Immunol., 2005, 174: 1159-63), los días 13 y 14 los animales recibieron nuevamente 100 µg de PIC.

El Grupo 3 se inoculó por vía sc, a los días 0 y 12, con 0.2 ml de la composición vacunal A (equivalente a 1.1 nmol ó 50 µg de OVA).

El Grupo 4 se inoculó por vía subcutánea, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de la composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol ó 50 µg de OVA y 0.3 nmol ó 6,25 µg de StI).

El Grupo 5 se inoculó por vía subcutánea, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de la composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol ó 50 µg de OVA y 0.3 nmol ó 6.25 µg de StII).

El día 20 del experimento, células de bazo de ratones C57BL/6 sin inmunizar se incubaron con dos concentraciones de diacetato succinimidil ester de carboxifluoresceína (CFSE) (0,33 y 5 µmol/l, respectivamente); las células marcadas con mayor intensidad de fluorescencia también se incubaron con 1 µmol/l del péptido de OVA (257-SIINFEKL-264) inmunodominante en el contexto del haplotipo de MHC I de la cepa de ratón C57BL/6. Luego, las células marcadas se mezclaron 1:1 y los grupos experimentales 1-5 se inocularon por la vena de la cola con $30x10^6$ células de la mezcla en un volumen de 0,2 ml. Los ratones se sacrificaron a las 16 horas y se determinó el porcentaje de lisis de células blanco en el ganglio inguinal más cercano al sitio de inmunización mediante citometría de flujo (FACS).

En la Figura 1 se presenta la citotoxicidad producida *in vivo* por la inmunización de ratones con liposomas que co-encapsulaban OVA y Sts. Los animales inmunizados con liposomas que encapsulaban Sts (StI o StII) mostraron una respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) específicos a OVA estadísticamente superior al grupo control positivo. Adicionalmente, los liposomas que sólo contenían OVA también indujeron una respuesta CTL estadísticamente similar al control positivo clásico de este ensayo (PIC).

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

A las vacunas basadas en liposomas se les estudió su capacidad de inducir protección antitumoral. Para ello se seleccionaron 60 ratones hembra C57BL/6 con un peso corporal comprendido entre 18-20 g, y se separaron en 3 grupos de ensayo de 20 animales cada uno.

El Grupo 1 (control negativo) se inoculó por vía intramuscular, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de tampón fosfato salino (PBS).

El Grupo 2 se inoculó por vía intramuscular, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de la composición vacunal A descrita en el ejemplo 1 (equivalente a 1.1 nmol ó 50 µg de OVA).

El Grupo 3 se inoculó por vía intramuscular, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de la composición vacunal B descrita en el ejemplo 1 (equivalente a 1.1 nmol ó 50 µg de OVA y 0.3 nmol ó 6,25 µg de StII).

Todos los Grupos 1 a 3 se retaron el día 19 con $3x10^5$ células de la línea tumoral E.G7 por vía subcutánea (0.2 ml).

Los animales se individualizaron a partir del día 0 y se determinaron tres veces por semana los siguientes parámetros: volumen tumoral, tiempo a la progresión y sobrevida.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tiempo a la progresión

El tiempo a la progresión es un parámetro que valora el tiempo que tarda en aparecer el tumor en cada animal individual, medido a partir del momento del inóculo. Para los ratones que no habían desarrollado tumor al cierre del experimento se consideró que el tiempo a la progresión era de 60 días. El impacto en la prolongación del tiempo a la progresión es un parámetro muy deseable para una vacuna contra el cáncer. Según se observa en la Figura 2A los animales del grupo 3, vacunados con la formulación composición vacunal B descrita en el Ejemplo 1 y objeto de la invención, mostraron los resultados más relevantes.

Sobrevida

Este parámetro evalúa la capacidad de la vacunación para aumentar el tiempo que viven los animales inmunizados después del reto con las células tumorales que expresan OVA (E.G7). El parámetro se mide en días y tiene carácter relativo, ya que se compara con la sobrevida de los animales no tratados. La prueba de elección para ver la significación estadística de las comparaciones de sobrevida es el Log-Rank.

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

Ejemplo 3: Actividad hemolítica de las mutantes de Sts.

La formación de poros en la membrana del eritrocito genera un choque coloido-osmótico que trae como consecuencia la lisis de la célula. La actividad formadora de poros de una porina puede ser por lo tanto evaluada por su actividad hemolítica (AH), la cual se determina experimentalmente por la disminución de la absorbancia aparente (λ = 600 nm) de una suspensión de eritrocitos producto de la lisis celular.

En el ensayo se comparó la AH del dímero irreversiblemente inactivo de StIW111C (StI $W111C_{irrev}$) con la de la variante dimérica reversible StIW111C, en condiciones reductoras (2-ME 0,1 mol/l) y no reductoras, para una concentración relativamente elevada de proteínas en el ensayo (0,15 µmol/l), si se compara con la AH de StI/StII informada por Álvarez *y otros,* en Toxicon, 2009, 54(8):1135-47. Las cinéticas de hemólisis que se muestran en la figura 3 indican que StIW111C$_{irrev}$ resultó inactiva bajo condiciones no reductoras. En condiciones reductoras StIW111C$_{irrev}$ mostró menor actividad lítica que StIW111C completamente reducido y no reducido.

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

La pérdida de la capacidad de formar poros en membrana de StII, inactivada de manera irreversible por el calentamiento a 80°C durante 2 horas, se evaluó mediante el ensayo de actividad hemolítica. En la figura 4 se aprecia la ausencia total de la actividad hemolítica de la StII inactivada, al compararla con la proteína activa.

Ejemplo 5: Efecto del vehículo vacunal sobre la maduración de CDs.

La maduración de las CDs inducida por StII se evaluó en células obtenidas de la médula ósea de ratones C57BL/6 expuestas a StII activa (0.1 nmole ó 2 µg) o inactivada por tratamiento térmico (4 µg) en presencia o no de 20 µg de polimixina B (pmxB, neutralizante de la actividad biológica de las endotoxinas por unirse a la porción de lípido A del LPS), durante 24 horas a 37°C en cámara con CO_2 al 5%. Como control positivo se empleó LPS (2 µg) y como control negativo medio RPMI más pmxB. Las células extraídas de la médula ósea del ratón, se sembraron en un número de 600 000 precursores de CDs en

medio RPMI por pozo en placas de 6 pozos. A cada pozo se le adicionó suero fetal bovino (SFB) al 10%, 400 ul de GMCSF y RPMI hasta completar un volumen por pozo de 3ml. En la figura 5 se muestra el incremento en porcentaje de los marcadores moleculares (CD80, CD86 y CD40) indicativos de la activación de las CDs como resultado de la exposición de estas células *in vitro* a StII, tanto en su variante activa como inactivada por tratamiento térmico y comparables a los resultados del control positivo.

Ejemplo 6: Evaluación de citotoxicidad y respuesta CTL del vehículo vacunal usando las mutantes de St y como antígeno la proteína OVA.

Las variantes diméricas de StI de baja actividad formadora de poros reversible (StIW111C) o irreversible ($StIW111C_{irrev}$) y la variante de StII inactivada por tratamiento térmico, se co-encapsularon con el antígeno OVA en los liposomas de DPPC:Cho (1:1), en una relación 10 µmol de lípidos totales: 1.1 nmol de OVA: 0.3 nmol de StIW111C, $StIW111C_{irrev}$ o StII inactivada por tratamiento térmico, en PBS pH 7,4 y se evaluó la capacidad de estas preparaciones vacunales de inducir actividad citotóxica OVA-específica *in vivo*. En estos ensayos se emplearon esencialmente las composiciones vacunales descritas en el ejemplo 1, en el caso de la composición B se emplearon las diferentes variantes de St

Composición vacunal A: Liposomas DRVs de DPPC:Cho (60 µmol de lípidos totales) que encapsulan 6.6 nmol de OVA.

Composición vacunal B: Liposomas DRVs de DPPC:Cho (60 µmol de lípidos totales) que co-encapsulan 6.6 nmol de OVA y 1.875 nmol de St (StIW111C, $StIW111C_{irrev}$, St II nativa o StII inactivada por tratamiento térmico)

En un primer ensayo se seleccionaron 12 ratones hembra C57BL/6 con un peso corporal comprendido entre 18-20 g, y se separaron en 4 grupos de ensayo de 3 animales cada uno.

El Grupo 1 (control negativo) se inoculó por vía sc, a los días 0 y 12, con 0.2 ml de PBS.

El Grupo 2 (control positivo) se inoculó por vía sc, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de la composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol ó 50 µg de OVA y 0.3 nmol ó 6,25 µg de StII nativa).

El Grupo 3 se inoculó por vía sc, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de la composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol ó 50 µg de OVA y 0.3 nmol ó 6,25 µg de StIW111C).

El Grupo 4 se inoculó por vía sc, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de la composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol ó 50 µg de OVA y 0.3 nmol ó 6,25 µg de $StIW111C_{irrev}$).

En la figura 6A se muestra que en los animales inmunizados con liposomas que contienen las variantes de St de baja actividad formadora de poros (LP/OVA+StIW111C o LP/OVA+$StIW111C_{irrev}$) se induce una respuesta citotóxica estadísticamente similar a la obtenida por StII cuando se co-encapsula con OVA en liposomas (LP/OVA+StII).

Para otro ensayo se seleccionaron 9 ratones hembra C57BL/6 con un peso corporal comprendido entre 18-20 g, y se separaron en 3 grupos de ensayo de 3 animales cada uno.

El Grupo 1 (control negativo) se inoculó por vía sc, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de tampón fosfato salino (PBS).

El Grupo 2 se inoculó por vía subcutánea, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de la composición vacunal A (equivalente a 1.1 nmol ó 50 µg de OVA).

El Grupo 3 se inoculó por vía subcutánea, a los días 0 y 12, con 0,2 ml de la composición vacunal B (equivalente a 1.1 nmol ó 50 µg de OVA y 0.3 nmol ó 6,25 µg de StII inactiva).

La figura 6B evidencia que la inmunización con liposomas que co-encapsulan OVA y la variante de StII inactivada completamente por tratamiento térmico generó una actividad citotóxica OVA-específica significativamente superior a la inducida por liposomas que sólo contenían el antígeno y similar a aquella observada con la formulación liposomal que contiene StI/StII nativa.

Los resultados experimentales demostraron que la vacuna liposomal objeto de esta invención y que co-encapsulan un antígeno con cualquiera de las variantes de sticholisinas, aún con aquellas que no exhiben actividad formadora de poros, indujo una potente respuesta CTL específica al antígeno, robusta y funcional y muy superior que el clásico control positivo (PIC) en un ensayo de CTL *in vivo*. La formulación liposoma-St en un escenario preventivo, incrementó el curso temporal del prendimiento del tumor e incrementó significativamente la sobrevida en los grupos evaluados en relación con

aquellos que sólo se trataron con PBS. En resumen, la vacunación con liposomas-St mostró mejores resultados que aquellos observados con vesículas liposomales que sólo contenían el antígeno.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS FIGURAS

Figura 1: representa una gráfica con el porcentaje de lisis de las células blanco cargadas con el péptido inmunodominante de OVA (SIINFEKL) y marcadas con CFSE en animales de experimentación sometidos a diferentes tratamientos vacunales en un ensayo de citotoxicidad *in vivo*. Cada punto corresponde a los datos de un animal y la línea al valor promedio de al menos dos experimentos independientes. Las letras diferentes indican significación estadística entre los grupos inmunizados según la prueba Dunnett T3 ($p < 0,05$).

Figura 2A: representa el porcentaje de animales sin tumor en tres grupos de animales de experimentación sometidos a diferentes tratamientos vacunales y retados con células tumorales que expresan OVA.

Figura 2B: representa una gráfica que permite apreciar en los 3 grupos mencionados el parámetro de sobrevida después de la inoculación de células tumorales que expresan OVA. Letras diferentes indican significación estadística según la prueba Log-Rank ($p < 0,05$).

Figura 3: muestra la variación en la turbidez de una suspensión eritrocitaria producto de la acción de las variantes diméricas de StI (StIW111C o StIW111C$_{irrev}$) en condiciones reductoras (presencia de 2-ME) y no reductoras.

Figura 4: representa la pérdida de la turbidez de una suspensión de eritrocitos por la acción de StII nativa (proteína activa) o inactivada por tratamiento térmico.

Figura 5: muestra la variación de la expresión de marcadores moleculares en células dendríticas (CDs) por la exposición *in vitro* a St II en sus variantes activa e inactivada por tratamiento térmico en presencia o no de un neutralizante de las endotoxinas (pmxB).

Gráfica A: Porcentaje de CD80

Gráfica B: Porcentaje de CD86

Gráfica C: Porcentaje de CD40

Figura 6: representa dos gráficas con el porcentaje de lisis de las células blanco cargadas con el péptido inmunodominante de OVA (SIINFEKL) y

marcadas con CFSE en animales de experimentación sometidos a diferentes tratamientos vacunales en un ensayo de citotoxicidad *in vivo*. Cada punto corresponde a los datos de un animal y la línea al valor promedio. Las letras diferentes indican significación estadística entre los grupos inmunizados según la prueba Tukey ($p < 0,05$).

Gráfica A: Respuesta obtenida por la inmunización con liposomas que co-encapsulan OVA, StII nativa o variantes diméricas de StI reversible (StIW111C) o irreversiblemente ($StIW111C_{irrev}$) inactivas.

Gráfica B: Respuesta obtenida por la inmunización con liposomas que co-encapsulan OVA y StII inactivada por tratamiento térmico.

COMPOSICIONES VACUNALES A BASE DE STICHOLISINA ENCAPSULADA EN LIPOSOMAS

REIVINDICACIONES:

1.- Un vehículo vacunal para inducir respuesta inmune celular caracterizado porque comprende la encapsulación en vesículas lipídicas de proteínas obtenidas de la anémona *Stichodactyla helianthus* junto con un antígeno.

2.- El vehículo vacunal de la reivindicación 1 caracterizado porque la vesícula lipídica contiene DPPC y Cho en una relación equimolar.

3.- El vehículo vacunal de la reivindicación 1 caracterizado porque las proteínas de la anémona *Stichodactyla helianthus* son seleccionadas del grupo que comprende StII, StI y variantes de ellas.

4.- El vehículo vacunal de la reivindicación 3 caracterizado porque las variantes de las toxinas St, son seleccionadas del grupo que comprende StIW111C, $StIW111C_{irrev}$ o St II inactivada por tratamiento térmico.

5.- El vehículo vacunal de la reivindicación 1 caracterizado porque el antígeno es una proteína o un polipéptido asociado a una patología seleccionada del grupo que comprende cáncer y enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares.

6. El vehículo vacunal de la reivindicación 5 caracterizado porque el antígeno es una proteína o un polipéptido asociado al cáncer.

7.- El vehículo vacunal de la reivindicación 5 caracterizado porque el antígeno es una proteína o un polipéptido asociado al SIDA.

8- El vehículo vacunal de la reivindicación 5 caracterizado porque el antígeno es una proteína o un polipéptido asociado a la tuberculosis.

9- Una composición vacunal caracterizada porque comprende el vehiculo vacunal de cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9 y porque carece de adyuvantes inmunológicos.

10.- El uso de la composición vacunal de la reivindicación 10 para el reforzamiento de la respuesta inmune de un paciente que sufra una patología seleccionada del grupo que comprende cáncer y enfermedades infecciosas causadas por patógenos intracelulares.