NANO-PARTÍCULAS QUE CONTIENEN VARIANTES SINTÉTICAS DEL GANGLIÓSIDO GM3 COMO ADYUVANTES EN VACUNAS

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con los campos de la inmuno-nanotecnología y de la inmuno-oncología, especialmente con las vacunas terapéuticas para tratamiento de individuos con cáncer y/o infecciones crónicas con virus oncogénicos. Particularmente describe adyuvantes nano-particulados especializados en estimular específicamente los efectores inmunes celulares o humorales en estos pacientes y además provee las correspondientes composiciones vacunales.

ANTECEDENTES

Después de décadas de fallidos resultados en ensayos clínicos, el campo de las vacunas terapéuticas de cáncer no ha podido cumplir las esperanzas de convertirse en un tratamiento eficaz y de baja toxicidad con beneficio para los pacientes. Recientes éxitos clínicos obtenidos con los anticuerpos (Acs) *immune checkpoint inhibitors* han incentivado el interés comercial y científico en la inmuno-oncología, incluyendo a las vacunas de cáncer. Desde esta perspectiva los fracasos de estas vacunas terapéuticas se pueden haber debido a factores tales como una selección incorrecta de los antígenos, el empleo de vehículos/adyuvantes relativamente ineficientes y al empleo de dichas vacunas de forma aislada, en ausencia de una combinación con otros inmunomoduladores que permitan corregir el efecto negativo ejercido por el microambiente tumoral (Branca M.A. y cols. (2016) Nat Biotech 34(10): 1019-24).

Tradicionalmente las vacunas de cáncer han empleado en su formulación proteínas que clasifican como antígenos tumor asociados propios que aunque se expresan de forma aberrada en las células tumorales, están presentes también en los tejidos normales. La falta de evidencias solidas de la efectividad en la clínica de estas vacunas puede deberse en parte al proceso de tolerancia central mediante el cual ocurre la eliminación de las células T que tienen receptores de alta avidez contra la mayoría de estos antígenos propios (Tran E. y cols. (2017) Nat Immunol 18(3): 255-62). Por tanto el éxito de vacunas de cáncer basadas en este tipo de antígenos dependerá del uso de novedosos adyuvantes especializados capaces de potenciar una respuesta específica de células T efectoras, relativamente débil al inicio, de forma tal que conviertan al tumor en una fuente de neo-antígenos de manera natural. Esto permite movilizar una poderosa acción de linfocitos T citotóxicos (LTC) multiespecífica y personalizada, capaz de erradicar lesiones malignas.

Recientemente el estado del arte refleja un cambio en la valoración de los antígenos para el diseño de vacunas de cáncer exitosas que consiste en la selección de neo-antígenos tumorales. Una fuente atractiva de estos neo-antígenos surge de la detección personalizada de las mutaciones tumorales individuales. Otra fuente más limitada de este tipo de antígeno proviene de las secuencias de proteínas virales oncogénicas. Aunque la ventaja de estos péptidos mutados seria que son nuevos para el sistema inmune (no están presentes en los tejidos normales) y por tanto más inmunogénicos, el éxito de las nuevas vacunas diseñadas con estos neo-antígenos también dependería de novedosos adyuvantes que sean capaces de maximizar las respuestas de LTC, procurando una disponibilidad óptima del antígeno mediante una persistencia local que permita su presentación por las células presentadoras de antígeno (APC) en un contexto de maduración acertado y adicionalmente corregir el efecto inmunosupresor del microambiente tumoral. Por otra parte la identificación de verdaderos neo-epítopes es un proceder inefectivo en la práctica. Los estudios de secuenciación identifican miles de mutaciones somáticas en tumores individuales y los programas bioinformáticos predicen cientos de péptidos mutados capaces de unirse a MHC específicos. Pero la gran mayoría de estos neo-epitopes no se encuentran en los tumores reales cuando estos se aislan y estudian por espectrometría de masa, y peor aún, solo unos pocos son capaces de estimular una respuesta LTC. Esto significa que la metodología vigente de predicción y validación de neo-epítopes está lejos de poder usarse rutinariamente para llevar la inmunoterapia personalizada a la práctica clínica (Editorial, (2017) Nat Biotech 35(2): 97).

En todo tipo de vacunas la selección del adyuvante apropiado es un elemento crucial para lograr el éxito deseado. El objetivo esencial de una vacuna terapéutica de cáncer es inducir la activación y proliferación de linfocitos B, T y mediadores de la inmunidad innata de forma tal que aparezcan efectores inmunes humorales y celulares capaces de reconocer y destruir las células tumorales, aportando un aumento en la supervivencia y calidad de vida de los pacientes. En este sentido un adyuvante ideal debe primeramente optimizar la disponibilidad de los antígenos para las APC. En segundo lugar debe lograr una estimulación efectiva de estas APC para que expresen las señales co-estimulatorias necesarias y secreten citocinas y quimioquinas específicas. En tercer lugar debe poder modular el MAT de manera tal que los efectos inmunosupresores sean neutralizados. Hoy no existe en la práctica un adyuvante con todas estas características

Como explican Khong H. y cols. (Khong H. y cols. (2016) J Immunother Cancer 4: 56), dentro de las variantes de adyuvantes para vacunas de cáncer que se prueban con mayor interés están las micro y nano-partículas debido a que pueden tener varias de las

propiedades deseadas, entre ellas también actuar como vehículos vacunales. Estos preparados particulados se pueden diseñar de forma tal que se puede dirigir efectivamente el antígeno acompañante a APC específicas, mediante la regulación de los tamaños de partícula, la rigidez y la carga neta. Vacunas particuladas con diámetros en el rango de 500 - 2000 nm preferencialmente son capturadas por APC en el sitio de inyección y movidas a los linfonodos (LN), mientras que las partículas de entre 20 y 200 nm drenan pasivamente a los LN donde son tomadas por las APC residentes. Las micro y nanopartículas más utilizadas para estos fines son liposomas, proteoliposomas, polímeros sintéticos y polímeros naturales. Las ventajas y limitaciones de cada uno de estos sistemas han sido descritas en detalle en el arte.

Particularmente pertinente para esta invención es la descripción por Xu F. y cols. (Xu F. y cols. (2016) ACS Nano Vol. 10: 1189-1200) de un adyuvante nano-particulado sintético que contiene el ganglíosido GM3 en su composición. Este adyuvante se obtuvo recubriendo nano-partículas de oro de diámetros entre 40 y 80 nm con una membrana lipídica donde se insertó el ganglíosido GM3. De esta forma se puede usar ventajosamente el principio de la interacción específica glicolípido-receptor para hacer direccionalización, paticularmente la interacción de sialil-lactosa con Siglec1 (CD169), marcador que está sobre expresado en células dendríticas (DC) activadas, protagonistas de la sinapsis con las células T $CD4^+$ en los LN. Aunque estas nano-partículas revestidas con GM3 se logran acumular *in vivo* selectivamente en las DC $CD169^+$ presentes en LN poplíteos, no hay evidencias de sus posibilidades como adyuvante en experimentos de inmunización con antígenos de referencia ni tampoco ninguna evidencia de eficacia en modelos tumorales. Por otro lado, este principio es solo funcional en nano-partículas del rango de diámetros entre 40 y 80 nm.

Molina y cols. describen en la patente US 7,776,346 formas de preparar inmunógenos efectivos mediante la asociación de proteoliposomas de muy pequeña talla (VSSP), formados mediante la conjugación hidrofóbica al complejo de proteínas de la membrana externa (CPME) de la bacteria *Neisseria meningitidis* con el ganglíosido GM3 con determinados antígenos poco inmunogénicos, lo cual puede ser considerado como la solución técnica más cercana a la presente invención. A su vez la forma de obtener estas VSSP se ha descrito con cierto detalle por Rodríguez y cols. en US 6,149,921, enfatizando que el ganglíosido GM3 que se emplea para obtener estos proteoliposomas debe ser obtenido de fuentes biológicas, principalmente de la masa de hibridomas resultante de la producción industrial de Acs monoclonales. Del mismo modo Estévez y cols. (Estévez y cols. (2000) Vaccine Vol. 18: 90-197), enseñan que se pueden producir también estos VSSP empleando GM3 obtenido a partir de eritrocitos caninos. Es

conocido en el arte, como por ejemplo enseñan Lee H y cols. (Lee H y cols. (2011) Int J Mass Spectr Vol 305: 138-150) que el ganglιósido GM3 obtenido de cualquier fuente natural está constituido por una mezcla variable de distintas especies moleculares donde la composición del oligosacárido es fija pero varía el ceramido, apareciendo distintos tipos de ácido graso. Aparte de la inconveniencia de emplear componentes de origen animal o tumoral para producir preparados farmacéuticos, el empleo de GM3 de origen biológico impide razonablemente obtener VSSP con las características altamente reproducibles necesarias.

Es procedente establecer respecto a la presente invención que ninguna solución técnica anterior o publicación científica describe variantes de VSSP, obtenidos en un proceso de fabricación que emplea distintos GM3 totalmente sintéticos con estructura químicamente definida, que tienen la sorprendente propiedad de que su uso especializado como adyuvante de vacunas terapéuticas depende, en última instancia, del ganglιósido GM3 molecularmente homogéneo empleado en su obtención y como dicha especialización aporta adyuvantes con propiedades ventajosas respecto al VSSP producido con GM3 proveniente de fuentes biológicas. Por tanto, la novedad de esta invención consiste en proporcionar dos nuevos adyuvantes nano-particulados del tipo VSSP. Uno de ellos emplea el ganglιósido GM3 totalmente sintético cuyo ceramido contiene ácido esteárico GM3 (18:0) y es útil principalmente para inducir potentes respuestas de Acs contra antígenos acompañantes. El otro adyuvante se obtiene empleando el ganglιósido GM3 totalmente sintético cuyo ceramido contiene ácido oleico GM3 (18:1) y es particularmente efectivo en la inducción de respuestas efectoras específicas de células LTC.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En una realización son objeto de la presente invención, adyuvantes que comprenden nano-partículas formadas mediante la asociación de variantes totalmente sintéticas del ganglιósido GM3 a proteínas hidrofóbicas del complejo de membrana externa de la bacteria *N. meningitidis,* particularmente estos adyuvantes poseen en el ceramido del ganglιósido GM3 el ácido esteárico o el ácido oleico.

En un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con composiciones vacunales que comprenden los adyuvantes nano-particulados antes mencionados y péptidos, polipéptidos o proteínas como antígeno y eventualmente otro adyuvante que puede ser alúmina o un adyuvante oleoso sin limitarse a estos. Particularmente, los antígenos que forman parte de estas composiciones vacunales son los dominios

extracelulares de los receptores de factores de crecimiento o porciones de estos como el HER1, HER2 o HER3 solos o combinados; o el péptido PyrGnRHm1-TT, generado a partir de la hormona GnRH. Dichas composiciones vacunales se pueden emplear en la manufactura de un medicamento para el tratamiento del cáncer o de infecciones virales crónicas con virus oncogénicos.

En una realización particular, la presente invención se relaciona con el uso de las composiciones vacunales que comprenden los adyuvantes nano-particulados objeto de la presente invención, ya sea solos o combinados, en la estimulación de la respuesta inmune humoral o celular antígeno específica de un paciente.

Adicionalmente, es objeto de la presente invención un método de tratamiento para administrar a un sujeto que lo necesite las composiciones vacunales de la presente invención por vía subcutánea (SC), intradérmica, intramuscular, intratumoral o por aplicación directa sobre mucosas, con una frecuencia quincenal durante al menos un total de cinco dosis de inducción y posteriormente dosis mensuales de mantenimiento por al menos seis meses. Dichas composiciones se pueden administrar de manera simultánea, escalonada o alterna.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Composiciones vacunales

Las composiciones vacunales que se emplean en la presente invención se forman mediante la unión del adyuvante nano-particulado formado mediante la dispersión de proteínas hidrofóbicas del CPME de la bacteria *N. meningitidis* con variantes totalmente sintéticas del ganglíosido GM3 a péptidos, polipéptidos o proteínas como antígenos, particularmente los dominios extracelulares completos de los receptores de factores de crecimiento o porciones de estos, hormonas asociadas en determinadas etapas con la progresión tumoral, como la GnRH, sin limitarse a esta.

El tipo de ácido graso que contiene el ceramido del ganglíosido GM3 que forma parte de los VSSP de la presente invención estará en dependencia de la intencionalidad de la vacuna; en caso de que se desee favorecer una respuesta de Acs se utilizará el ácido esteárico (GM3 18:0) mientras que si se desea una respuesta LTC se empleará el ácido oleico (GM3 18:1). También es posible inducir en el hospedero una respuesta dual de Acs y LTC contra el mismo antígeno combinando de manera conveniente las inmunizaciones con ambas formulaciones vacunales. Tanto las VSSP que contienen GM3 (18:0) como las que tienen GM3 (18:1) pueden ser usadas solas o formando parte

de adyuvantes combinados con otros agentes como la alúmina o adyuvantes oleoso, sin limitarse solo a estos últimos.

Las composiciones vacunales de la presente invención que utilizan el GM3 (18:0) como adyuvante, inducen una mayor calidad en comparación con las formulaciones vacunales que emplean como adyuvante el ganglióside obtenido de una fuente natural en términos de: la respuesta humoral, reconocimiento de líneas tumorales, inhibición de la activación de los receptores en las células tumorales así como disminución de la viabilidad de éstas.

Las composiciones vacunales de la presente invención que utilizan el GM3 (18:1) como adyuvante, inducen una mayor calidad en comparación con las formulaciones vacunales que emplean como adyuvante el ganglióside obtenido de una fuente natural en términos de: la respuesta LTC.

Aplicación terapéutica y métodos de tratamiento

La presente invención proporciona composiciones vacunales especializadas en inducir respuestas de Acs o LTC, contra la familia de los receptores de factores de crecimiento, lo cual constituye una solución peculiarmente útil para este sistema antigénico de interés en inmuno-oncología, donde se sabe que tanto la respuesta de Acs y las respuestas LTC especificas son eficaces pero difíciles de optimizar en una sola formulación vacunal y con un solo esquema de administración.

También es propósito de esta invención introducir formulaciones vacunales especializadas en generar altos títulos de Acs neutralizantes contra hormonas asociadas en determinadas etapas, con la progresión tumoral, particularmente la GnRH, aunque no limitada a esta hormona.

Otro objeto de la presente invención es aportar composiciones vacunales terapéuticas capaces de generar potentes respuestas de Acs o LTC específicas, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos que sufren cáncer o infecciones virales crónicas con virus oncogénicos.

Las composiciones vacunales de la presente invención se pueden introducir en el paciente por vía: SC, intradérmica, intramuscular, intratumoral o por aplicación directa sobre mucosas.

Entre los tipos de cáncer que se pueden tratar con las composiciones vacunales objeto de la presente invención se incluyen los carcinomas de origen epitelial. Más particularmente, entre los ejemplos de estos cánceres se incluyen cáncer de células

epiteliales escamosas, cáncer de pulmón incluidos el de células pequeñas, el de células no-pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico incluido el gastrointestinal, cáncer de páncreas, cabeza y cuello, gliobastoma, cáncer cervical, de ovario, hígado, vejiga, mama, colon, recto, cáncer colorectal, útero, mama, próstata, carcinoma de glándulas salivales, riñón, próstata, vulva, tiroides, carcinoma anal y carcinoma del pene.

El rango de dosis a emplear en humanos de los dominios extracelulares de los receptores de factores de crecimiento o porciones de estos en las composiciones vacunales de la presente invención está entre 200 µg a 1 mg, preferiblemente 400 µg a 900 µg. El rango de dosis a emplear de la GnRH en las composiciones vacunales de la presente invención está entre 500 µg a 3 mg, preferiblemente 1 mg a 2.5 mg. Los VSSP se administran en un rango entre 100 µg y 1 mg, preferiblemente 200 µg a 600 µg (según contenido del CPME).

Dichas composiciones se administran en los sujetos con una frecuencia quincenal durante al menos un total de cinco dosis de inducción y posteriormente dosis mensuales de mantenimiento por al menos seis meses. Si se desea inducir en el hospedero una respuesta dual de Acs y LTC contra el mismo antígeno se pueden combinar las inmunizaciones con ambas formulaciones vacunales de manera simultánea, escalonada o alterna.

Obtención del adyuvante nanoparticulado VSSP GM3 (18:0)

Primeramente se dispersa el CPME de *N. meningitidis* en una solución buffer Tris-HCL que contiene una mezcla de desoxicolato de sodio (10-40 mM) y dodecil sulfato de sodio (1-10 mM) en un reactor con agitación por un plazo de entre 1 y 36 horas. A continuación se añade una masa del ganglióside sintético (GM3 18:0) entre 0,1 y 3 veces la masa añadida de CPME y se prolonga la agitación. Posteriormente, los detergentes se eliminan a través de un sistema de un sistema de ultrafiltración o diálisis. La solución remanente ultrafiltrada se concentra para ajustar su concentración a la dosificación deseada entre 0,1 y 1 mg/ml de CPME y se esteriliza por filtración en cápsula estéril de 0,2 µm de tamaño de poro.

Obtención del adyuvante nanoparticulado VSSP GM3 (18:1)

Primeramente se dispersa el CPME de *N. meningitidis* en una solución buffer Tris-HCL que contiene una mezcla de desoxicolato de sodio (10-40 mM) y dodecil sulfato de sodio (1-10 mM) en un reactor con agitación por un plazo de entre 1 y 36 horas. A

continuación se añade una masa del ganglióside sintético (GM3 18:1) entre 0,1 y 3 veces la masa añadida de CPME y se prolonga la agitación. Posteriormente, los detergentes se eliminan a través de un sistema de un sistema de ultrafiltración o diálisis. La solución remanente ultrafiltrada se concentra para ajustar su concentración a la dosificación deseada entre 0,1 y 1 mg/ml de CPME y se esteriliza por filtración en cápsula estéril de 0,2 µm de tamaño de poro.

Preparación de las composiciones vacunales de HER1, HER1+HER2 y HER3 con VSSP GM3 (18:0)

La composiciones vacunales preferidas en esta invención que contienen HER1 o HER1+HER2 o HER3 como receptores de factores de crecimiento y VSSP GM3 (18:0) como adyuvante y cuya finalidad es lograr la inducción de una potente respuesta inmune humoral específica se pueden preparar de la forma siguiente: el contenido de los viales individuales del antígeno HER1 o de HER1+HER2 o HER3 en solución o liofilizados, y del VSSP GM3 18:0, conservados entre 4 y 20°C, se mezclan por separado durante 10-30 minutos al lado de la cama del paciente antes de inyectarlo, de forma tal que la proporción final de la masa de antígeno y de la del VSSP GM3 (18:0) (según contenido del CPME) esté en el rango de 300 µg a 2 mg.

Preparación de las composiciones vacunales de HER1, HER1+HER2 y HER3 con VSSP GM3 (18:1)

Las composiciones vacunales preferidas en esta invención que contienen HER1 o HER1+HER2 o HER3 como receptores de factores de crecimiento y del VSSP GM3 (18:1) como adyuvante y cuya finalidad es lograr la inducción de una potente respuesta inmune celular específica se pueden preparar de la forma siguiente: el contenido de los viales individuales del antígeno HER1 o de HER1+HER2 y HER3, en solución o liofilizados, y del VSSP GM3 (18:1), conservados entre 4 y 20°C, se mezclan por separado durante 10-30 minutos al lado de la cama del paciente antes de inyectarlo, de forma tal que la proporción final de la masa del antígeno y de la de VSSP GM3 (18:1) (según contenido del CPME) esté en el rango 300 µg a 2 mg.

Preparación de las composiciones vacunales de GnRHm1-TT VSSP GM3 (18:0)

El péptido GnRHm1-TT se generó sustituyendo en el proceso biosintético el aminoácido L-Glicina de la sexta posición que normalmente ocupa en la secuencia de la GnRH natural (EHWSYGLRPG), por una L-Prolina (EHWSYPLRPG). Para completar su construcción se le añadió en el propio proceso de síntesis el epítope QYIKANSKFIGITEL del toxoide tetánico (Junco J.A. y cols. (2007) Vaccine 25: 8460–

68), de acuerdo al método de fase sólida (Hougten y cols, (1986) Biotecniques 4: 522-6); a los efectos de la presente invención de ahora en lo adelante denominaremos a dicho péptido PyrGnRHm1-TT.

La composiciones vacunales preferidas en esta invención que contienen el PyrGnRHm1-TT y del VSSP GM3 (18:0) como adyuvante y cuya finalidad es lograr la inducción de una potente respuesta inmune humoral específica se pueden preparar de la forma siguiente: el contenido de los viales individuales del antígeno PyrGnRHm1-TT en solución o liofilizado, y del VSSP 18:0, conservados entre 4 y 20°C, se mezclan por separado durante 10-30 minutos al lado de la cama del paciente antes de inyectarlo, de forma tal que la proporción final de la masa de antígeno y de la del VSSP GM3 (18:0) (según contenido del CPME) esté en el rango de 600 µg a 4 mg.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Acumulación de células $CD11b^{+}GR1^{+}$ en el bazo de ratones portadores del tumor MCA203 y tratados con nanopartículas VSSP conteniendo distintas especies moleculares de GM3, medida por citometría de flujo.

Figura 2. Respuesta CTL antígeno específica *in vivo* inducida en ratones inmunizados con OVA/VSSP GM3 (18:1), OVA/VSSP GM3 (18:0) y OVA/VSSP natural medida por citometría de flujo.

Figura 3. Efecto antitumoral en el modelo EG7 del tratamiento con vacunas de OVA y nanopartículas adyuvantes VSSP conteniendo distintas especies moleculares de GM3. La gráfica muestra los valores individuales de volumen tumoral de cada grupo y su media, el día 20 del experimento. La línea discontinua representa el valor por debajo del cual se consideró que los tumores no progresaron. A la derecha se muestra la frecuencia de animales en cada grupo que no tuvieron progresión tumoral con los tratamientos.

Figura 4. Títulos de Acs IgG inducidos por la preparación vacunal HER3 adyuvada en VSSP GM3 (18:0), medidos por ELISA.

Figura 5a. Comparación de títulos de Acs específicos contra HER1 y HER2 inducidos por la preparación vacunal bivalente HER1+HER2 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con la adyuvada en VSSP natural, medidos por ELISA.

Figura 5b. Comparación de títulos de Acs específicos contra los subdominios del DEC-HER2 inducidos por la preparación vacunal bivalente HER1+HER2 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con la adyuvada en VSSP natural, medidos por ELISA.

Figura 6. Comparación del reconocimiento de líneas tumorales HER1+/HER2+ por Acs inducidos por la preparación vacunal bivalente HER1+HER2 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con la adyuvada en VSSP natural, medidos por citometría de flujo.

Figura 7. Comparación del efecto de los Acs inducidos por la preparación vacunal bivalente HER1+HER2 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con la adyuvada en VSSP natural sobre la viabilidad de la línea tumoral H125 HER1+/HER2+, medidos por ensayo colorimétrico de MTT.

Figura 8. Comparación del reconocimiento de la línea tumoral MDA-MB468 (HER1+) por los Acs inducidos por la preparación vacunal HER1 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con respecto a la adyuvada en VSSP natural, medidos por citometría de flujo.

Figura 9. Comparación de la inhibición de la activación de HER1 por los Acs inducidos por la preparación vacunal HER1 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con respecto a la adyuvada en VSSP natural medida por Western Blot.

Figura 10. Efecto de la inmunización con el péptido PyrGnRHm1-TT con y sin VSSP GM3 (18:0) en el peso de la próstata de ratas Copenhagen.

Figura 11. Evaluación de la velocidad de crecimiento tumoral en ratas Copenhagen implantadas con la línea tumoral Dunning R3327-H.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. La administración de VSSP GM3 (18:1) en ratones portadores del tumor MCA203 no aumenta el número de células CD11b+GR1+ en el bazo.

Cuatro grupos de ratones C57BL/6 hembras (3 animales por grupo) fueron inoculados por vía SC el día 0 con $1x10^6$ células de MCA203. Posteriormente los días 11, 12 y 18 se inyectaron por vía SC, el VSSP natural, el VSSP GM3 (18:1) y el VSSP GM3 (18:0) (200 µg de CPME) a los ratones de tres de esos grupos, quedando el cuarto grupo como control no tratado al cual se le administró tampón fosfato. El día 22 los animales se sacrificaron y los bazos extraídos se procesaron individualmente para determinar por citometría de flujo el número de células $CD11b^+Gr1^+$. Se pudo apreciar (Figura 1) como en los animales tratados con VSSP GM3 (18:1) la media de la cantidad de estas células esplénicas no aumentó respecto a la media de la cantidad inducida por el tumor en los

animales del grupo control. En cambio los valores medios de las cantidades de estas células $CD11b^{+}Gr1^{+}$ aumentaron significativamente en los bazos de los animales inyectados con VSSP natural y VSSP GM3 (18:0) (letras iguales p>0,05; letras distintas p< 0,05, Pruebas ANOVA y Tukey).

Ejemplo 2. La vacunación con OVA/VSSP GM3 (18:1) induce tres veces más citotoxicidad especifica de las células T $CD8^{+}$, comparado con OVA/VSSP natural y OVA/VSSP GM3 (18:0).

La respuesta LTC antígeno específica *in vivo* fue evaluada comparativamente en ratones hembras C57BL/6 (3 animales por grupo) inmunizadas con tres formulaciones distintas del antígeno OVA, empleando como adyuvantes nano-partículas de VSSP natural, VSSP GM3 (18:1) o VSSP GM3 (18:0). Las vacunas se administraron por vía SC los días 0, 1 y 7 (200 µg de CPME). Paralelamente se obtuvieron esplenocitos de animales vírgenes que se marcaron diferencialmente con CFSE (5 min a 37° C). Las células de marcaje alto (5 µM) se usaron como células blanco al pulsarlas con el péptido SIINFEKL (1 µM; 90 min a 37°C y 5% CO_2), mientras que las células de marcaje bajo (0.33 µM) se usaron como control sin carga peptídica. Después de la última inmunización, se realizó un lavado para remover el péptido libre y ambos tipos de esplenocitos se mezclaron en iguales proporciones y se inyectaron en los animales vacunados. Al transcurrir 16 horas se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales de los ratones vacunados y se midió por citometría de flujo el total de eventos correspondientes a las dos intensidades de fluorescencia. El porciento de lisis específica se calculó según la fórmula: 100 − [(CFSEalto/CFSEbajo) × 100]. Como se ve en la Figura 2 la vacuna OVA/VSSP GM3 (18:1) induce cerca de 60 % de lisis específica, un valor casi tres veces mayor que el alcanzado por las vacunas OVA/VSSP natural y OVA/VSSP GM3 (18:0).

Ejemplo 3. El empleo de nanopartículas adyuvantes VSSP GM3 (18:1) en vacunas terapéuticas de cáncer tiene mayor efecto antitumoral que las que emplean VSSP natural.

Tres grupos de ratones C57BL/6 hembras (10 animales por grupo) se inocularon por vía SC el día 0 con $3x10^{5}$ células de EG.7 (variante de timoma EL4 modificado genéticamente para expresar OVA como neo-antígeno tumoral). Posteriormente los días 4, 5 y 11 se realizaron 3 inmunizaciones SCs sucesivas con dos formulaciones vacunales distintas de OVA (50 µg/dosis) adyuvada en VSSP natural y la segunda formulación adyuvada en VSSP GM3 (18:1) (200 µg/dosis). El tercer grupo de ratones se inyectó con tampón fosfato con la misma frecuencia y se usó como control del experimento. A partir de los 7 días de inoculado el tumor se midió el volumen tumoral

(VT) 2 veces por semana. Los animales se sacrificaron cuando el tumor evidenció necrosis o cuando el tamaño tumoral excedió 17mm de diámetro. El día 20 del experimento (Figura 3) se apreció la ventaja de la vacuna terapéutica OVA/VSSP GM3 (18:1) respecto a la formulación OVA/VSSP natural (medias de VT: VSSP GM3 (18:1) 560 mm^3; VSSP natural 740 mm^3; control 1640 mm^3) (p= 0,037 pruebas de ANOVA y Tukey). Más importante resultó ver como en el grupo tratado con el preparado OVA/VSSP GM3 (18:1) el 50 % de los animales no evidenciaron progresión tumoral en un modelo agresivo como EG7 (grupo control con 100 % de animales en progresión). De los animales vacunados con OVA/VSSP natural solo el 20 % logró evitar la progresión (p= 0,012, test de Chi cuadrado).

Ejemplo 4. Inducción de altos títulos de Acs específicos por HER3, por la preparación vacunal HER3/VSSP GM3 (18:0).

Ratones de la línea BALB/c (n=5) se inmunizaron por vía SC con una preparación vacunal que contenía 200 μg de DEC-HER3 mezclados con 200 μg de VSSP GM3 (18:0). Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 14, 28 y 42. Se extrajo sangre para procesar el suero el día 35 (1ra extracción) y el día 56 (2da extracción) y mediante ELISA se determinaron los títulos de Acs específicos contra el DEC-HER3. Para ello las placas se recubrieron con 10μg/mL de DEC-HER3, y se incubaron a 37°C. Después del correspondiente bloqueo, se añadieron diluciones del suero (1/100, 1/1000, 1/5000, 1/10000). La reacción se visualizó utilizando un conjugado de Acs anti-IgG murina/peroxidasa (Sigma), y el correspondiente sustrato de la enzima.

Los ratones inmunizados desarrollaron Acs específicos de isotipo IgG, que alcanzaron títulos de hasta 1/5000 (Figura 4). Este resultado demuestra la potencialidad del VSSP GM3 (18:0) de activar la rama humoral del sistema inmune contra antígenos muy poco inmunogénicos como los antígenos tumorales autólogos.

Ejemplo 5. Inducción de mayores títulos de Acs IgG específicos de la preparación vacunal bivalente HER1+HER2 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con respecto a la adyuvada en VSSP natural.

Ratones de la línea BALB/c (n=5) se inmunizaron con las preparaciones vacunales que contenían la mezcla de 100 μg de DEC-HER1 y 100 μg de DEC-HER2 adyuvada en 200 μg de VSSP natural (Grupo 1) o 200 μg de VSSP GM3 (18:0) (Grupo 2). Las inmunizaciones se realizaron por vía SC los días 0, 14 y 28. Se extrajo sangre para procesar el suero el día 35. Mediante la técnica de ELISA se determinaron los títulos de Acs específicos contra los DECs de HER1 y HER2. Para ello las placas se recubrieron con 5 μg/mL de DEC-HER1 o 5 μg/mL de DEC-HER2, y se incubaron a 37°C. Después

del bloqueo correspondiente, se añadieron diluciones del suero (1/100, 1/1000, 1/10 000, 1/50 000, 1/100 000). La reacción se visualizó utilizando un conjugado anti-IgG murina/fosfatasa alcalina (Sigma), y el correspondiente sustrato de la enzima. El suero pre-inmune se utilizó como control negativo.

Todos los ratones inmunizados desarrollaron Acs específicos de isotipo IgG. Los títulos de Acs específicos por el DEC-HER1 fueron superiores en el Grupo 2, donde el adyuvante utilizado fue el VSSP GM3 (18:0), con respecto a los títulos de Acs desarrollados en el Grupo 1, en el que el adyuvante fue el VSSP natural (Figura 5a). Por otra parte, si bien para los Acs específicos contra el DEC-HER2 no se obtuvieron diferencias significativas entre los títulos de Acs inducidos en los Grupos 1 y 2, sí hubo una tendencia a un aumento de los títulos en el Grupo 2, en el que la preparación vacunal utilizó el VSSP GM3 (18:0) como adyuvante. Dada la tendencia observada en el reconocimiento del DEC-HER2, se realizó una titulación de los anticuerpos policlonales purificados (AcPs) a partir de los sueros inmunes contra los subdominios del DEC-HER2: subdominios I, II, III y IV, expresados sobre fagos filamentosos. Para ello las placas de ELISA se recubrieron con 10 µg/mL de los AcPs y se incubaron a 37°C. Luego se añadieron las muestras de fagos que expresan los diferentes subdominios de HER2 y la señal colorimétrica se desarrolló con un anticuerpo anti-fago conjugado a peroxidasa (GE-Healthcare). Puede apreciarse en la (Figura 5b) que los AcPs provenientes de animales en los que se empleó como adyuvante el VSSP GM3 (18:0), tuvieron más reactividad contra los subdominios I, III y IV del DEC-HER2, que los anticuerpos provenientes de animales en los que se empleó como adyuvante el VSSP natural.

Ejemplo 6. Mayor reconocimiento de líneas tumorales HER1+/HER2+ por los Acs inducidos por la preparación vacunal bivalente HER1+HER2 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con respecto a la adyuvada en VSSP natural.

Ratones de la línea BALB/c (n=5) se inmunizaron por vía SC con preparaciones vacunales que contenían la mezcla de 100 µg de DEC-HER1 y 100 µg de DEC-HER2 adyuvada en 200 µg de VSSP natural o adyuvada en 200 µg de VSSP GM3 (18:0). Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 14 y 28 y el suero correspondiente al día 35 se utilizó para evaluar el reconocimiento de líneas tumorales que expresan HER1 y HER2. Las líneas utilizadas fueron: carcinoma epitelial de vulva A431 (ATCC-CRL 1555), carcinoma de pulmón de células no pequeñas H125 (ATCC-CRC 5801) y carcinoma de mama SKBR3 (ATCC-HTB 30). La medición se realizó mediante citometría de flujo. Para esto 10^5 células de cada línea celular se bloquearon con suero fetal de ternera al 2% en solución salina tampón fosfato y posteriormente se incubaron con una dilución

1/200 de una mezcla de sueros de cada grupo tratado. La unión de los Acs específicos a los receptores HER1 y HER2 en las células tumorales se visualizó utilizando un conjugado de Ac anti-IgGmurina/isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) y mediante la adquisición de 5000 células como mínimo en el citómetro de flujo. Como control negativo se utilizó una mezcla de sueros pre-inmunes para cada grupo evaluado. Los sueros inducidos por la preparación vacunal adyuvada en VSSP GM3 (18:0) reconocieron con mayor intensidad las células de las líneas tumorales evaluadas (Figura 6).

Ejemplo 7. Mayor disminución de la viabilidad de la línea tumoral H125 causada por los Acs inducidos por la preparación vacunal bivalente HER1+HER2 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con respecto a la adyuvada en VSSP natural.

Células de la línea H125 se incubaron durante 72 horas 10^5, con mezclas de suero diluidos 1/20 provenientes de ratones BALB/c inmunizados con tres dosis cada quince días de las preparaciones vacunales bivalentes de la mezcla de 100 μg de DEC-HER1 y 100 μg de DEC-HER2, adyuvada en VSSP GM3 (18:0) o en VSSP natural. Como control negativo se utilizó una mezcla de sueros pre-inmunes a la misma dilución de los sueros inmunes. Como control positivo se utilizó 10 μM del inhibidor tirosina cinasa AG1478. La determinación del efecto de los sueros inmunes sobre la viabilidad celular se realizó mediante el ensayo colorimétrico de MTT, y la lectura de las absorbancias se realizó a 540nm y 630nm. La viabilidad celular se determinó mediante la fórmula:

$$\textit{Viabilidad celular (\%)} = \frac{(A540nm - A630nm)\ suero\ inmune}{(A540nm - A630nm)\ suero\ pre-inmune} x100$$

La Figura 7 muestra que los sueros inducidos por la preparación vacunal adyuvada en VSSP GM3 (18:0) disminuyeron significativamente la viabilidad celular con respecto a la preparación vacunal adyuvada en VSSP natural.

Ejemplo 8. Mayor reconocimiento de líneas tumorales HER1+ por los Acs inducidos por la preparación vacunal HER1 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con respecto a la adyuvada en VSSP natural.

Ratones de la línea C57BL/6 (n=5) se inmunizaron por vía SC con las preparaciones vacunales que contenían 200 μg de DEC-HER1 adyuvado en 400 μg de VSSP natural o adyuvado en 400 μg de VSSP GM3 (18:0). Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 14 y 28 y 42, el suero correspondiente al día 56 se utilizó para evaluar el reconocimiento de la línea de carcinoma de mama MDA-MB468 (ATCC-HTB 132), que presenta una alta expresión de HER1 en su membrana. La medición se realizó mediante la tecnología de citometría de flujo. Para esto 10^5 células de la línea celular se bloquearon con suero fetal de ternera al 2% en solución salina tampón fosfato y

posteriormente se incubaron con una dilución 1/100 de la mezcla de sueros de cada grupo tratado. La unión de los Acs específicos a los receptores HER1 en las células tumorales se visualizó utilizando un conjugado de Ac anti-IgG murina/FITC (Sigma) y mediante la adquisición de 5000 células como mínimo en el citómetro de flujo. Como control negativo se utilizó una mezcla de sueros pre-inmunes para cada grupo evaluado. Los sueros inducidos por la preparación vacunal adyuvada en VSSP GM3 (18:0) reconocieron con mayor intensidad las células de la línea tumoral evaluada (Figura 8).

Ejemplo 9. Mayor inhibición de la activación de HER1 por los Acs inducidos por la preparación vacunal HER1 adyuvada en VSSP GM3 (18:0) con respecto a la adyuvada en VSSP natural.

Se emplearon ratones de la línea C57BL/6 que se dividieron en cuatro grupos (n=5) y se inmunizaron por vía SC con los preparaciones vacunales siguientes:

Grupo 1: 200 μg de DEC-HER1 adyuvado en 200 μg de VSSP natural
Grupo 2: 200 μg de DEC-HER1 adyuvado en 200 μg de VSSP GM3 (18:0)
Grupo 3: 200 μg de DEC-HER1 adyuvado en 400 μg de VSSP natural
Grupo 4: 200 μg de DEC-HER1 adyuvado en 400 μg de VSSP GM3 (18:0)

Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 14 y 28, 42 y el suero correspondiente al día 56 se utilizó para evaluar la capacidad de los Acs generados de inhibir la fosforilación de HER1 en presencia de EGF. Para ello, las células de la línea de carcinoma pulmonar H292 (CRL 1848) se incubaron durante 2 horas con una mezcla de sueros, a una dilución 1/100. Posteriormente las células se estimularon con 100 ng/mL de EGF durante 10 minutos para inducir la activación de HER1. El efecto de los sueros sobre la fosforilación de HER1 se midió mediante la técnica de Western Blot, utilizando Acs específicos para la detección de HER1 fosforilado y β-actina. Se utilizó como control de activación de HER1, células tratadas con EGF. Como control negativo de inhibición de HER1 se empleó una mezcla de sueros pre-inmunes, a una dilución 1/100 y como control positivo de inhibición se utilizó 10 μM del inhibidor tirosina cinasa AG1478. La fotografía obtenida se utilizó para realizar densitometría que permitió normalizar los datos.

Los sueros de los grupos que se inmunizaron con las preparaciones vacunales que utilizaron como adyuvante el VSSP GM3 (18:0) inhibieron más la activación del receptor HER1 en términos de fosforilación que los sueros de los grupos que emplearon el VSSP natural como adyuvante tanto a la dosis de 200 μg como la de 400 μg, siendo más marcada esta inhibición en la dosis de 400 μg (Figura 9). Este resultado demuestra la

superioridad de la preparación vacunal que contiene como adyuvante el VSSP GM3 (18:0) en términos de calidad de la respuesta inmune humoral inducida.

Ejemplo 10. Efecto sobre la próstata de la formulación vacunal PyrGnRHm1-TT/VSSP GM3 (18:0) en ratas Copenhagen.

Se utilizaron ratas Copenhagen machos de 8-12 semanas de edad. Los animales se dividieron en 3 grupos de 10 animales cada uno.

Grupo 1: Placebo (Montanide ISA 51 VG/VSSP GM3 18:0
Grupo 2: Inmunizado con PyrGnRHm1-TT/Montanide ISA 51 VG
Grupo 3: Inmunizado con PyrGnRHm1-TT/Montanide ISA 51 VG/VSSP GM3 18:0

Para la preparación del inmunógeno, el péptido PyrGnRHm1-TT se re-suspendió en agua destilada y VSSP hasta alcanzar una concentración final de 750 µg de péptido y 120 µg de VSSP/250 µL. Luego esta mezcla se formuló proporcionalmente 50:50 (v/v) con Montanide ISA 51 VG. Los animales recibieron 4 inmunizaciones con una frecuencia quincenal.

La inmunización con el péptido PyrGnRHm1-TT emulsionado en Montanide ISA 51 VG, produjo una disminución significativa del tamaño de la próstata, en comparación con el placebo ($p<0,05$). Esta diferencia sin embargo fue mucho mayor cuando el péptido PyrGnRHm1-TT fue emulsionado con VSSP ($p<0,01$) (Figura 10).

Ejemplo 11. Inducción de respuesta antitumoral en el modelo Dunning R3327-H empleando el péptido PyrGnRHm1-TT

Ratas Copenhagen adultas se transplantaron SCmente en la zona distal de la extremidad posterior derecha con fragmentos de tumor de (2x2x2 mm) del modelo tumoral murino Dunning R3327-H. Los animales se dividieron en cuatro grupos que recibieron diferentes tratamientos:

Grupo 1: Placebo: Montanide ISA 51 VG/VSSP GM3 18:0
Grupo 2: Castrados
Grupo 3: Inmunizados con el péptido PyrGnRHm1-TT/Montanide ISA 51 VG
Grupo 4: Inmunizados con el péptido PyrGnRHm1-TT/Montanide ISA 51 VG/VSSP GM3 18:0

Cuando los tumores alcanzaron un diámetro de aproximadamente 10 mm se comenzó con las inmunizaciones según el tratamiento correspondiente para cada grupo. Se realizaron un total de 7 inmunizaciones cada 15 días.

En la Figura 11 se observa en el grupo placebo (Grupo 1) un crecimiento abrupto del tumor, a diferencia de los grupos castrados e inmunizado (Grupos 2, 3 y 4), donde se ve una marcada inhibición del crecimiento tumoral ($p<0,01$). Esta diferencia se hizo más significativa en la variante PyrGnRHm1-TT emulsionadas con VSSP GM3 18:0 ($p= 0,005$)

NANO-PARTÍCULAS QUE CONTIENEN VARIANTES SINTÉTICAS DEL GANGLIÓSIDO GM3 COMO ADYUVANTES EN VACUNAS

REIVINDICACIONES

1. Un adyuvante que comprende nano-partículas formadas mediante la asociación de variantes totalmente sintéticas del ganglióside GM3 a proteínas hidrofóbicas del complejo de membrana externa de la bacteria *Neisseria meningitidis*.
2. El adyuvante según la reivindicación 1 donde el ácido graso presente en el ceramido del ganglióside GM3 es el ácido esteárico (18:0).
3. El adyuvante según la reivindicación 1 donde el ácido graso presente en el ceramido del ganglióside GM3 es el ácido oleico (18:1).
4. Una composición vacunal que comprende un adyuvante nano-particulado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y como antígeno péptidos, polipéptidos o proteínas.
5. La composición vacunal de la reivindicación 4 que eventualmente comprende otro adyuvante seleccionado del grupo que comprende:
   - alúmina y
   - un adyuvante oleoso.
6. La composición vacunal de las reivindicaciones 4-5 donde el antígeno son los dominios extracelulares de los receptores de factores de crecimiento o porciones de estos.
7. La composición vacunal de las reivindicaciones 4-6 donde los receptores de factores de crecimiento son el HER1, HER2, HER3 solos o combinados.
8. La composición vacunal de la reivindicación 4-6 donde el antígeno es el péptido PyrGnRHm1-TT.
9. La composición vacunal según las reivindicaciones 4-8 para la manufactura de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
10. La composición vacunal según las reivindicaciones 4-8 para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de infecciones virales crónicas con virus oncogénicos.
11. Uso del adyuvante según la reivindicación 2 para estimular la respuesta inmune humoral antígeno específica.
12. Uso del adyuvante según la reivindicación 3 para estimular la respuesta inmune celular antígeno específica.

13. Uso de la combinación de los adyuvantes de las reivindicaciones 2 y 3 para optimizar la respuesta inmune humoral y celular antígeno específica en un paciente.
14. Un método de tratamiento a un sujeto que lo necesite que comprende la administración por vía SC, intradérmica, intramuscular, intratumoral o por aplicación directa sobre mucosas de las composiciones vacunales de las reivindicaciones 4-8 con una frecuencia quincenal durante al menos un total de cinco dosis de inducción y posteriormente dosis mensuales de mantenimiento por al menos seis meses.
15. El método según la reivindicación 14 donde las composiciones vacunales se administran de manera simultánea, escalonada o alterna.