



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 971**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00967482 .1**

96 Fecha de presentación : **12.10.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1223978**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.07.2002**

54 Título: **Arqueosomas como adyuvantes y vehículos para vacunas acelulares para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos.**

30 Prioridad: **12.10.1999 US 158944 P**
08.06.2000 US 209988 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2009

73 Titular/es:
NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
Building M-58, RM EG-12, 1200 Montreal Road
Ottawa, Ontario K1A 0R6, CA

72 Inventor/es: **Sprott, G., Dennis;**
Krishnan, Lakshmi;
Conlan, J., Wayne;
Patel, Girishchandra, B. y
Willick, Gordon E.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Arqueosomas como adyuvantes y vehículos para vacunas acelulares para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos.

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de la inmunología y, en particular, al uso de arqueosomas como vehículos inmunomoduladores para composiciones de vacuna acelulares y a métodos para proteger al hospedador vacunado contra patógenos intracelulares y cánceres. Más específicamente, la invención se refiere al desarrollo de vacunas para aumentar la inmunidad de linfocitos T citotóxicos en el hospedador vacunado y a métodos para tratar enfermedades producidas por patógenos intracelulares tales como patógenos de origen microbiano, protozario y viral, y cánceres.

Antecedentes de la invención

La vacunación satisfactoria depende de dos criterios clave: la identificación de una o más dianas antigénicas relevantes para el patógeno o la enfermedad, y la capacidad de inducir una respuesta inmune fuerte y apropiada contra dichas dianas en el hospedador vacunado. La inmunidad protectora contra patógenos intracelulares (por ejemplo, VIH, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia*, el parásito de la malaria) y cánceres requiere el desarrollo de respuestas inmunes mediadas por células con especificidad de antígeno, especialmente de respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) que implican la participación de células T CD8⁺ que pueden destruir células hospedadoras infectadas o neoplásicas (Henkart, 1997). El tipo de inmunidad necesario para combatir agentes infecciosos intracelulares normalmente puede inducirse fácilmente únicamente por vacunación con formas vivas pero debilitadas (atenuadas) del patógeno. Sin embargo, no se dispone de formas atenuadas para muchos patógenos y, si están disponibles, pueden producir efectos secundarios inaceptables, estar contraindicadas para uso en el entorno o tener problemas de inestabilidad y reversión a la virulencia (Bowersock y Martin, 1999). Para evitar algunos de estos problemas, un objetivo importante de la vacunología moderna es emular la eficacia de dichas vacunas vivas con vacunas acelulares definidas (sintéticas, purificadas, de subunidad o no replicativas). Durante la última década se han hecho progresos considerables hacia la identificación, purificación y/o síntesis de determinantes antigénicos clave de patógenos y tumores. Sin embargo, estas proteínas y/o péptidos altamente purificados son inmunógenos relativamente débiles, lo cual limita su capacidad de inducir una respuesta inmune protectora fuerte. Aunque la coadministración de antígenos con adyuvantes inmunostimuladores a menudo facilita la obtención de una respuesta inmune fuerte, muchos adyuvantes tienen efectos secundarios indeseables tales como respuestas inflamatorias severas, y algunas formulaciones son extremadamente complejas para incorporar antígenos, lo cual impide su uso en vacunas. De hecho, el único adyuvante aprobado actualmente de forma universal para uso en seres humanos es el alumbre (hidróxido de aluminio), que es un potenciador relativamente débil de la inmunidad mediada por células (Gupta *et al.*, 1995). Por lo tanto, existe una necesidad crítica y un esfuerzo intenso a nivel mundial para desarrollar adyuvantes seguros y eficaces para vacunas acelulares para patógenos intracelulares y cánceres.

El mecanismo o mecanismos inmunes para controlar enfermedades infecciosas requiere la inducción de anticuerpos neutralizadores (inmunidad humoral) y la generación de inmunidad mediada por células (CMI), incluyendo linfocitos T auxiliares (Th) CD4⁺ y linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺. Las células T auxiliares a menudo se dividen en fenotipos dicótomos de secreción de citoquinas: células T Th1 que secretan IFN- γ , IL-2 y linfoxina que ayudan a la inmunidad mediada por células, mientras que las células T Th2 que producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 facilitan la producción de anticuerpos de células B (Krishnan y Mosmann, 1998). Las células T CD8⁺ vírgenes se estimulan cuando se presentan péptidos procedentes de antígenos obtenidos endógenamente en el contexto de moléculas del MHC de clase I. Aunque este proceso puede producirse prácticamente en todas las células, sólo los autopéptidos o péptidos derivados de proteínas virales o bacterianas que se ensamblan dentro de la célula hospedadora se presentan en el MHC de clase I. Tras la activación, las células T CD8⁺ vírgenes se diferencian en efectores y células T de memoria que poseen la capacidad de destruir células diana infectadas o células tumorales. Por otra parte, los antígenos proteicos procedentes de los fluidos extracelulares que se captan por las células presentadoras de antígeno (APC) por medio de pinocitosis, o fagocitosis en el caso de antígenos en forma de partículas, se fragmentan dentro de endosomas. Los péptidos generados se presentan por las APC en el contexto de las moléculas del MHC de clase II y estimulan a las células T CD4⁺. Las células T auxiliares CD4⁺ contribuyen al control de la infección principalmente produciendo citoquinas que ayudan a las respuestas de anticuerpos, inflamación, activación de macrófagos y proliferación de células T CD8⁺ (Krishnam y Mosmann, 1998).

Las vacunas tradicionales formuladas con antígenos proteicos o microbios atenuados se introducen en el compartimento del endosoma y por consiguiente estimulan únicamente la producción de anticuerpos y, en grados variables, respuestas de células T auxiliares. Sin embargo, estas respuestas no pueden eliminar las células infectadas con patógenos o las células tumorales que requieren una respuesta fuerte de CTL. Con la identificación de proteínas inmunodominantes protectoras que pueden explotarse como vacunas contra patógenos intracelulares y tumores, existe una urgente necesidad de estrategias eficaces para la inducción de respuestas de CTL a largo plazo para esos antígenos exógenos. Además, no hay ningún sistema adyuvante aprobado clínicamente capaz de inducir todas las respuestas inmunes (Th1, Th2 y CTL), incluyendo respuestas de memoria fuertes.

Los sistemas adyuvantes pueden clasificarse como sistemas de soporte (vehículo) y/o como moduladores inmunes. Los complejos inmunostimuladores (ISCOM) son estructuras en forma de partículas, abiertas, del tipo de una jaula,

con un adyuvante modulador inmune (Quil A, saponinas) presente en la formulación (Sjolander *et al.*, 1998). Aunque los ISCOM son prometedores porque inducen una respuesta Th1, tienen que resolverse su coste de producción y la toxicidad de algunas preparaciones de saponina usadas en los ISCOM para poder utilizar su potencial (Bowersock y Martin, 1999). Además, los ISCOM no se pueden usar fácilmente con antígenos solubles.

Los liposomas son vesículas lipídicas cerradas que contienen un volumen de agua atrapado (encapsulado). Los grupos de las cabezas polares hidrófilas de los lípidos que forman los liposomas están orientados hacia el entorno acuoso presente en el interior y el exterior del liposoma, mientras que la región de “cola” hidrófoba del lípido está interpuesta entre los grupos de las cabezas polares y alejada del entorno acuoso. Los liposomas pueden variar en tamaño de <50 nm a varios micrómetros de diámetro, dependiendo de los lípidos usados y del método de preparación. Los especialistas en la técnica conocen bien métodos para encapsular materiales dentro de los compartimentos acuosos de los liposomas y/o para asociarlos con la capa lipídica hidrófoba. Estos métodos se ejemplifican, pero sin limitación, por diálisis con detergente, deshidratación-rehidratación, evaporación de fase inversa, sonicación, extrusión por presión y carga remota. Los liposomas compuestos predominantemente de fosfolípidos de éster, con o sin componentes adicionales tales como colesterol, se denominan en este documento liposomas convencionales. Se ha demostrado que los liposomas convencionales son vehículos que proporcionan un depósito antigénico, necesitando la co-administración y/o captura de adyuvantes moduladores inmunes conocidos adicionales tales como lípido A (Richards *et al.*, 1998), o toxina cólera (Harokopakis *et al.*, 1988), o citoquinas (Kedar *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.919.480, expedida el 6 de julio de 1999) para modular la reacción inmune. Específicamente, la inducción de una respuesta CTL con especificidad de antígeno contra antígenos proteicos o peptídicos encapsulados o asociados con liposomas convencionales requería que también se incorporaran en la vesícula adyuvantes adicionales tales como el lípido A (White *et al.*, 1995) o Quil A (Lipford *et al.*, 1994b). Como alternativa, el liposoma podría recubrirse con oligomannosa (Fukasawa *et al.*, 1998). Las dificultades con estas estrategias incluyen la toxicidad potencial de las citoquinas, el lípido A y los mayores costes asociados con los adyuvantes y métodos adicionales para su incorporación en los liposomas.

Las arqueobacterias se consideran distintas de las eubacterias y de los eucariotas, e incluyen microorganismos aerobios, anaerobios, termófilos, extremadamente termófilos, termoacidófilos y extremadamente halófilos. Los lípidos polares característicos de las arqueobacterias son una de las características clave que ayudan a distinguir las arqueobacterias de los otros dos grupos. Los lípidos totales extraídos a partir de miembros de las arqueobacterias consisten en lípidos polares y de un 5 a un 20% de lípidos neutros. Los lípidos polares de las arqueobacterias se componen de cadenas fitanilo ramificadas de longitud constante que están totalmente saturadas en muchas especies, y están unidas a través de enlaces éter a los carbonos del esqueleto de glicerol en las posiciones *sn*-2,3 (Kates, 1992). Por el contrario, los fosfolípidos de éster convencionales encontrados en otras bacterias y eucariotas tienen cadenas de ácido graso de longitud variable, que pueden estar insaturadas, y éstas están unidas a través de enlaces éster a los carbonos *sn*-1,2 del glicerol. Las estructuras nucleares de los lípidos polares de las arqueobacterias (los grupos de cabeza polar retirados por hidrólisis) consisten en los lípidos de diéter convencionales (2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicerol o arqueol) y/o los lípidos de tetraéter convencionales (2,2',3,3'-tetra-O-dibifitanil-*sn*-diglicerol o caldarqueol) y modificaciones de los mismos (Kates, 1992). Los lípidos de diéter son monopolares al igual que los fosfolípidos de éster convencionales, mientras que los lípidos de tetraéter son bipolares. Los grupos de la cabeza polar, unidos al carbono del glicerol *sn*-1 en los diéteres y a los carbonos del glicerol *sn*-1 y *sn*-1' en los tetraéteres, pueden variar y pueden incluir grupos fosfo, grupos glico, grupos fosfoglico, grupos polioliol o grupos hidroxilo. Sin embargo, a diferencia del lípido convencional fosfatidilcolina usado comúnmente en las formulaciones de liposomas convencionales, el grupo de cabeza de fosfocolina rara vez se encuentra en los lípidos polares de las arqueobacterias.

En estudios previos los presentes solicitantes notificaron que los arqueosomas facilitaban una respuesta de anticuerpos (Th2) fuerte contra antígenos proteicos atrapados (Sprott *et al.*, Publicación Internacional PCT N° WO97/22333, 26 de junio de 1997). La respuesta de anticuerpos (humoral) fue superior a la obtenida con liposomas convencionales y, en algunos casos, fue comparable a la obtenida con el adyuvante de Freund potente pero tóxico. Sin embargo, no hay ninguna indicación en la técnica anterior de que adyuvantes que faciliten una respuesta Th2 fuerte contra antígenos proteicos asociados también estimulen respuestas fuertes Th1 o mediadas por células CTL. De hecho, la técnica anterior indica lo contrario. Adyuvantes tales como el alumbre (Bowersock y Martin, 1999), la toxina cólera (Williams *et al.*, 1999) y los liposomas convencionales en ausencia de moduladores inmunes conocidos adicionales (Lipford *et al.*, 1994b; datos comparativos mostrados más adelante) inducen una respuesta predominantemente Th2, mientras que otros tales como ISCOM inducen una inmunidad principalmente Th1 (mediada por células) (Sjolander *et al.*, 1998). En el caso de antígenos peptídicos, en muchos casos el alumbre y los liposomas convencionales solos no pueden inducir una respuesta Th2 (White *et al.*, 1995). Además, es bien sabido que las respuestas Th1 y Th2 a menudo son dicótomas (Krishnan y Mosmann, 1998).

El fundamento para desarrollar vacunas para la prevención o inmunoterapia de cánceres es que las células cancerosas pueden expresar antígenos tumorales específicos que pueden usarse en una vacuna para inducir una respuesta CTL con especificidad tumoral. Un obstáculo principal a solucionar es el desarrollo de sistemas de administración de antígeno y adyuvante capaces de estimular al sistema inmune para crear una respuesta CTL suficientemente fuerte y con especificidad de antígeno. La utilidad de los arqueosomas como vehículo inmunomodulador de un antígeno celular se demuestra adicionalmente para antígenos tumorales, usando un modelo de tumor sólido en ratones.

La cita de las preferencias anteriores no es una admisión de que nada de lo anterior sea técnica anterior pertinente. Las afirmaciones en relación con los contenidos de estas referencias y en relación con las fechas de publicación se

basan en la información disponible para los solicitantes y no constituye ninguna admisión en relación con la corrección de los contenidos o las fechas de dichas referencias.

Sumario de la invención

La invención como se define por las reivindicaciones proporciona el uso de una composición que comprende un liposoma preparado a partir de un extracto de lípidos polares de una arqueobacteria y un antígeno que tiene un epítipo restringido para el MHC de clase I en la fabricación de un medicamento para uso profiláctico y/o terapéutico contra cánceres y/o infecciones por patógenos intracelulares, donde el liposoma sirve como adyuvante, y el medicamento induce una respuesta de células T CD8⁺ con especificidad de antígeno en un animal.

Las arqueobacterias útiles para la práctica de la invención pueden incluir *Thermoplasma acidophilum*, *Methanobrevibacter smithii*, *Halobacterium salinarum* o *Natronobacterium magadii*.

De esta forma, la invención propone el uso de arqueosomas como vehículos inmunomoduladores para antígenos en formulaciones de vacuna celulares (no replicativas), capaces de inducir respuestas de células T citotóxicas en el hospedador inmunizado.

La invención también propone arqueosomas como vehículos inmunomoduladores para antígenos en formulaciones de vacuna celulares (no replicativas) capaces de inducir respuestas inmunes en el hospedador inmunizado.

Los arqueosomas también pueden usarse como vehículos de antígenos inmunomoduladores en formulaciones de vacuna para usos profilácticos y terapéuticos contra cánceres.

La invención ofrece la oportunidad de inducir selectivamente una respuesta de células T citotóxicas con especificidad de antígeno en un animal, por medio de la administración al animal de una composición de vacuna que comprende un liposoma preparado a partir del extracto de lípidos polares totales de una arqueobacteria y un antígeno, donde el liposoma sirve como adyuvante.

El liposoma puede servir como vehículo inmunomodulador para el antígeno.

La administración a un animal de una composición de vacuna que comprende un liposoma preparado a partir del extracto de lípidos polares totales de una arqueobacteria y un antígeno puede activar a las células presentadoras de antígeno en un animal regulando positivamente las moléculas coestimuladoras 87.1 (CD80) y B7.2 (CD86) en la superficie de las células presentadoras de antígeno.

De forma similar, la invención puede proporcionar la activación de células dendríticas CD11c⁺ en un animal.

La invención también puede usarse para estimular la producción de la citoquina conocida como interferón gamma en un animal, o la producción de las citoquinas IL-4 e interferón gamma en un animal, por medio de la administración al animal de una composición de vacuna que comprende un liposoma preparado a partir de un extracto de lípidos polares de una arqueobacteria, preferiblemente *Methanobrevibacter smithii*, y un antígeno.

De forma similar, la invención también puede aplicarse en un método para estimular la producción del factor de necrosis tumoral por células presentadoras de antígeno en un animal.

Las vacunas de la invención también pueden aplicarse en el reclutamiento de Mac1 o células en un animal; o para estimular la proliferación de células T y la producción de citoquinas; o para inducir una respuesta de células T citotóxicas con especificidad de antígeno en un animal.

Una composición de vacuna puede comprender un liposoma preparado a partir de un lípido polar aislado en una forma biológicamente pura a partir de una arqueobacteria y un antígeno.

Dicha vacuna puede usarse para conferir a un animal una inmunidad protectora contra la infección por un patógeno intracelular; o para inmunizar a un animal para conferir a dicho animal una respuesta de memoria contra la infección por un patógeno intracelular.

Una vacuna de esta invención puede usarse para inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos restringida al MHC de clase I con especificidad de antígeno y una respuesta Th1, Th2 restringida al MHC de clase II con especificidad de antígeno en un animal.

Las vacunas proporcionadas por la invención pueden conferir a un animal inmunidad contra cánceres.

La composición de vacuna puede comprender un liposoma preparado a partir del extracto de lípidos polares de una arqueobacteria y un antígeno, donde el antígeno es un péptido alquilado.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 demuestra que la inmunización i.p. o s.c. de cepas BALB/c o C3H/HeJ de ratones con diversos arqueosomas que llevan antígeno encapsulado (Ag), induce el desarrollo en los ratones de células de bazo que presentan una fuerte proliferación de células de bazo con especificidad de antígeno *in vitro*. Las respuestas proliferativas (media de kCPM $\pm$ SEM de ratones en cada grupo) de células de bazo obtenidas a partir de ratones inmunizados con Ag-arqueosoma fueron superiores a las de ratones inmunizados con Ag solo (sin adyuvante) o con Ag encapsulado en liposomas convencionales (Liposomas Con). Con fines comparativos se muestran datos de ratones inmunizados con el Ag adsorbido sobre alumbre (Alum) usando BSA (Figura 1A,B), HEL (Figura 1C) u OVA (Figura 1D) como ejemplos ilustrativos para el Ag.

La Figura 2 demuestra que las células de bazo de ratones BALB/c inmunizados (día 0 y 21) con antígeno (Ag) encapsulado en los arqueosomas indicados induce la producción de citoquinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-4) (producción media de citoquinas $\pm$ SEM de ratones en cada grupo). Se inmunizaron ratones i.p. con 100 μ g de HEL en arqueosomas (Figura 2A) o s.c. con 15 μ g de OVA en arqueosomas (Figura 2B). Se incluyen datos de grupos de ratones inmunizados con antígeno solo (Sin adyuvante), Ag encapsulado en liposomas convencionales (Liposoma Con.) y Ag adsorbido en alumbre (Alum) con fines comparativos.

La Figura 3 muestra más ejemplos de la inducción específica de OVA superior de la producción de IFN- γ en cultivos esplénicos de ratones inmunizados s.c. con OVA encapsulada en arqueosomas en comparación con liposomas convencionales.

La Figura 4 demuestra que después de la re-exposición a Ag solo, se inducen respuestas de memoria fuertes en ratones previamente inmunizados con Ag-arqueosomas, como se ilustra por perfiles de ciclos de células T CD4⁺ obtenidos en ventanas seleccionadas de células CD4⁺. Los perfiles la Figura 4A indican la ventana de CD4⁺ (FL1). Los gráficos de la Figura 4B indican el porcentaje de células CD4⁺ en diversas fases del ciclo celular [basándose en el contenido de yoduro de propicio (FL3)] en cada grupo. "A" indica fase apoptótica, "G1" fase de reposo, "S" fase sintética y "G2/M" fase mitótica.

La Figura 5 demuestra que la inducción de células CTL esplénicas después de la inmunización de ratones con OVA atrapada en arqueosomas de *M. smithii* es superior a la observada en ratones inmunizados con OVA en PBS sola (Sin adyuvante), o con OVA atrapada en liposomas convencionales (Liposoma Con.) o adsorbida en alumbre. En la Figura 5A, las respuestas de CTL se muestran como porcentaje de lisis específica de cultivos por triplicado $\pm$ SD a diversas relaciones de Efector:Diana (E:T) en células EL-4 (diana no específica) y EG.7 (diana específica que expresa péptidos de OVA). Se estimularon células de bazo de ratones inmunizados con OVA-arqueosomas de *M. smithii* con APC sometidas a pulsos de péptidos OVA₂₅₇₋₂₆₄ (células IC21) y se determinó la producción de IFN- γ (ng/ml $\pm$ SD) (Figura 5B) en ausencia de la estimulación de APC (sin activación), en presencia de APC no cargadas (APC) y después de la estimulación con APC sometidas a pulsos de péptido de OVA (APC + OVA-péptido).

La Figura 6 demuestra que también se detecta una fuerte actividad de CTL (% de lisis específica) en ratones inmunizados con OVA atrapada en otros arqueosomas.

La Figura 7 demuestra que la actividad de CTL (% de lisis específica) obtenida después de una sola inyección en ratones C57BU6 de OVA-arqueosomas aumenta adicionalmente después de una inyección de refuerzo en los ratones.

La Figura 8 demuestra que la actividad de CTL (% de lisis específica) inducida en ratones inmunizados con OVA-arqueosomas está mediada por células T CD8⁺. Se inmunizaron ratones con 15 μ g de OVA atrapada en arqueosomas de *M. smithii*. La lisis de células T CD8⁺ en poblaciones de células de bazo procedentes de ratones inmunizados con arqueosomas produjo una pérdida de actividad de CTL.

La Figura 9 demuestra que la inmunización de ratones con deficiencia de células T CD4⁺ con OVA-arqueosomas de *M. smithii* produce una fuerte actividad de CTL (% de lisis específica $\pm$ SD de cultivos triplicados) comparable a la de ratones inmunizados de control normales, sometidos al ensayo el día 14 (Figura 9A) y el día 30 (Figura 9B) después de una inmunización s.c.

La Figura 10 demuestra que la inmunización de ratones C57BU6 con OVA-arqueosomas induce una respuesta de memoria de CTL fuerte y de larga duración contra el antígeno. Los datos se muestran como unidades líticas $\pm$ SD para células de bazo procedentes de ratones individuales.

La Figura 11 muestra datos de citometría de flujo que demuestran que los arqueosomas modulan la expresión de moléculas en la superficie celular en células T CD8⁺ esplénicas. Se expusieron (i.p.) ratones representativos (n=2) de experimentos descritos en la Figura 10 y ratones de control vírgenes (n=2) a macrófagos IC21 sometidos a pulsos de péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ el día 140 después de la inmunización. Los análisis de las poblaciones de células T CD8⁺ esplénicas 5 días después demostraron que se expresaban mayores cantidades de proteínas CD44, LFA-1 (CD11a) y CD28 en las células esplénicas de ratones inmunizados con Ag-arqueosoma en comparación con los controles vírgenes. Los números dentro de cada panel indican el porcentaje de células T CD8⁺ teñidas para cada marcador.

La Figura 12 muestra datos de citometría de flujo (20.000 acontecimientos) que demuestran que los arqueosomas vacíos regulan positivamente la expresión de moléculas en la superficie de las células en células J774A.1 durante el crecimiento *in vitro*. El aumento de la expresión de las moléculas del MHC de clase II, B7.1 y B7.2 en macrófagos J774A.1 tratados con arqueosomas de *M. smithii* (arqueosoma, 25 μ g de lípido/ml) fue comparable o superior a la regulación positiva observada en el control positivo (LPS, 10 μ g/ml). Los efectos con los liposomas convencionales (Liposoma Con., 25 μ g de lípido/ml) fueron mínimos y comparables con los de los controles vírgenes (Sin activación). La línea de trazos indica la tinción positiva para cada marcador de activación. Los números dentro de cada panel indican el porcentaje de células Mac 1 α^+ que se tiñen para cada marcador en los diversos grupos de tratamiento.

La Figura 13 muestra datos de citometría de flujo (análisis de 20.000 acontecimientos) que muestran la regulación positiva de moléculas en la superficie celular en células dendríticas (DC) derivadas de médula ósea tratadas con arqueosomas vacíos *in vitro*. Se obtuvieron datos de citometría de flujo en DC (10⁵/ml) que se cultivaron durante 24 horas en ausencia (es decir, Sin activación, Figura 13A) o en presencia (Figura 13B) de arqueosomas de *M. smithii* (25 μ g de lípido/ml). La línea de trazos indica la tinción negativa (con el anticuerpo con especificidad de isotipo) y la línea continua la tinción positiva. Los porcentajes dentro de cada panel indican el número de células que se tiñen fuertemente para cada marcador en los dos grupos.

La Figura 14 muestra datos de citometría de flujo (análisis de 20.000 acontecimientos) que demuestran que los arqueosomas vacíos administrados i.p. a ratones producen una regulación positiva de la expresión del MHC de clase II en células de exudado peritoneal. La línea de trazos indica el perfil de expresión de células de ratones de control tratados con PBS sola, y la línea continua indica el perfil de expresión aumentado del MHC de clase II de células de ratones tratados con arqueosomas de *M. smithii*.

La Figura 15 muestra histogramas que demuestran que en comparación con liposomas convencionales (Liposoma Con.), los arqueosomas de *M. smithii* inducen macrófagos J774A.1 (Figura 15A) y células dendríticas (Figura 15B) para producir cantidades sustanciales de factor de necrosis tumoral- α (TNF). Los macrófagos o las DC se trataron con concentraciones variables de liposomas convencionales o arqueosomas de *M. smithii* durante 48 horas *in vitro* y el TNF producido ($\pm$ SD de cultivos por triplicado) en el sobrenadante se evaluó por medio de un bioensayo. La sensibilidad del ensayo de TNF fue <0,1 pg/ml.

La Figura 16 muestra datos de citometría de flujo (análisis de 20.000 acontecimientos en cada muestra) que demuestran que los arqueosomas vacíos inyectados i.p. en ratones producen un reclutamiento de células Mac1 α^+ en el peritoneo. En ratones BALB/c (n=2) se inyectó 1 mg/200 μ l de arqueosomas de *M. smithii* (Arqueosoma) o 200 μ l de PBS (control con PBS). Después de 4 y 14 días, las células se recuperaron por lavado peritoneal y se analizaron con respecto a la expresión de Mac1 α por citometría de flujo. Los ratones de control con PBS presentaron perfiles celulares similares todos los días después de la inyección. Se distinguieron tres poblaciones distintas basándose en la tinción de Mac1 α : Mac1 α^- , Mac1 α^{bajo} y Mac1 α^{alto} , como se indica por el porcentaje del número de células mostrado en la figura.

La Figura 17 muestra datos de citometría de flujo que demuestran que la población de Mac1 α^{alto} inducida en el peritoneo de ratones en los que se habían inyectado arqueosomas consiste en macrófagos (F4/80) y células dendríticas (CD11c). En ratones BALB/c se inyectaron i.p. 200 μ l de PBS o 1 mg de arqueosomas de *M. smithii* en 200 μ l de PBS. El día 5, se analizaron células del exudado peritoneal con respecto a la expresión de Mac1 α (Figura 17A). Basándose en la expresión de Mac1 α , como se indica en la figura, las células se clasificaron en poblaciones de Mac1 α^{bajo} y Mac1 α^{alto} (Figura 17B). Las células clasificadas (2 x 10⁵/ml) se cultivaron *in vitro* durante 48 h con GM-CSF (5 ng/ml). Después se recuperaron las células cultivadas, se lavaron y se analizaron con respecto a la expresión de F4/80, CD11c y B220 (Figura 17C). Todos los perfiles se deducen del análisis de 20.000 acontecimientos.

La Figura 18 muestra datos de proliferación que comparan la estimulación de células T aloespecíficas por APC tratadas con arqueosomas de *M. smithii* vacíos (25 μ g de lípido/ml) o liposomas convencionales (Liposoma Con., 25 μ g de lípido/ml) o LPS (10 μ g/ml). Se trataron macrófagos J774A.1 o células dendríticas de médula ósea con arqueosomas o LPS y las APC después usaron para estimular células T CD8⁺ aloespecíficas (H-2K^b) purificadas (Figura 18A) o células T CD4⁺ (Figura 18B). Los datos representan la media de cuentas por minuto (CPM) $\pm$ la desviación típica de cultivos por triplicado.

La Figura 19 muestra la estimulación de células T aloespecíficas por células de exudado peritoneal tomadas de ratones tratados con arqueosomas vacíos. Se trataron ratones BALB/c (n=3) con arqueosomas o PBS y 5 días después se recuperaron células del exudado peritoneal. Estas células se usaron como APC para estimular células T CD8⁺ y CD4 purificadas aloespecíficas (H-2K^b). La proliferación de las células T se controló por la incorporación de ³H a 72 h (Figura 19A). El IFN- γ se midió en sobrenadantes de cultivos por ELISA (Figura 19B). Los datos representan la media $\pm$ SD de valores obtenidos de cultivos por triplicado.

La Figura 20 demuestra que los esplenocitos de ratones inmunizados con una vacuna de péptido-arqueosoma presentan una estimulación con especificidad de antígeno de IFN- γ (Figura 20A) y de la actividad de CTL (Figura 20B). La actividad de CTL se muestra como porcentaje de lisis específica $\pm$ SD para cultivos triplicados usando un intervalo de relaciones entre efector y diana (E:T).

La Figura 21 es una evolución a lo largo del tiempo que muestra la cinética de expresión de inmunidad anti-*Listeria* en ratones BALB/c vacunados con un lipopeptido 20-mérico encapsulado en arqueosomas. Se vacunaron ratones con 12,5 μ g del antígeno lipopeptídico 20-mérico encapsulado en arqueosomas de *M. smithii* (antígeno en 0,5 mg de arqueosomas en 100 μ l de PBS) (o), o con 100 μ l de PBS sola (●). Seis semanas después de la última vacunación, los ratones se expusieron a *L. monocytogenes*. Se determinaron las cargas bacterianas en los hígados (Figura 21A) y bazo (Figura 21B) de ratones vacunados y de control 1, 2 y 3 días después de la exposición. * indica la carga bacteriana significativamente menor ($p < 0,05$) en ratones inmunizados frente a los ratones de control de acuerdo con el ensayo de la suma de rangos de Mann Whitney. La línea discontinua indica el límite inferior de detección bacteriana.

La Figura 22 demuestra que la inmunización de ratones con antígeno encapsulado en arqueosomas proporciona protección contra el crecimiento de tumores sólidos. Se inmunizaron ratones C57BL/6 los días 0 y 21 con nada (es decir, ratones vírgenes, Figura 22A), con 15 μ g de OVA en PBS sola (Figura 22B), con 15 μ g de OVA encapsulada en arqueosomas de *H. salinarum* (Figura 22C), *T. acidophilum* (Figura 22E), o *M. smithii* (Figura 22G) o con arqueosomas vacíos de *T. acidophilum* (Figura 22D) o *M. smithii* (Figura 22F). Los ratones se expusieron 8 semanas después de la primera inmunización con 10 millones de células tumorales EG.7 (células del linfoma de células T transfectadas con un gen que codifica OVA).

La Figura 23 demuestra que la inmunización con arqueosomas vacíos o con antígeno encapsulado en arqueosomas produce una regresión de tumores sólidos. En ratones C57BL/6 se inyectaron 10 millones de células tumorales EG.7. Los ratones vírgenes no se inmunizaron (Figura 23A). Otros grupos de ratones se inmunizaron los días 0 y 10, como se indica por las flechas, con 15 μ g de OVA en PBS (Figura 23B) o encapsulada en arqueosomas de *T. acidophilum* (Figura 23D) o *M. smithii* (Figura 23F), o con arqueosomas vacíos de *T. acidophilum* (Figura 23C) o *M. smithii* (Figura 23E).

Descripción detallada de la invención

La presente invención demuestra que los arqueosomas inesperadamente inducen una respuesta de CTL con especificidad de antígeno fuerte y sostenida contra antígenos proteicos o peptídicos acelulares apropiados que están encapsulados y/o asociados con el arqueosoma, sin necesidad de incluir otro adyuvante modulador inmune en la formulación de vacuna. Esto es claramente contrario a la técnica anterior que usa liposomas convencionales. Además, la capacidad de los arqueosomas de inducir simultáneamente respuestas del MHC-I (CTL) y MHC-II (Th1 y Th2), así como respuestas de memoria fuertes y sostenidas apropiadas, también era inesperada y contraria a las expectativas de la bibliografía de estos sistemas de administración vehiculares. En este documento se proporcionan ejemplos de la eficacia y utilidad de los arqueosomas como vehículos inmunomoduladores para antígenos acelulares apropiados en modelos murinos, como inmunidad protectora contra la infección por patógenos intracelulares (*Listeria monocytogenes* y *Francisella tularensis*) y contra cánceres, ya que se sabe que estos dos ejemplos de enfermedades necesitan inducción de una fuerte respuesta de CTL para la protección.

El especialista la técnica reconocerá que el antígeno se selecciona basándose en el tipo de enfermedad que afecta al paciente. El patógeno del que procede el antígeno acelular, o en el que se basa, podría ser una bacteria, un virus o un parásito protozoario, como ejemplos. Este antígeno podría ser el patógeno inactivado o un componente extraído del patógeno, tal como una toxina o un polisacárido capsular producido por el patógeno, proteína de membrana, proteína de la cubierta, proteína citoplásmica, fragmentos proteicos, péptidos u otros componentes. La secuencia de péptido antigénico podría sintetizarse químicamente, por ejemplo, a partir de aminoácidos y/o polimerización, o producirse por tecnología recombinante, siendo estas dos técnicas bien conocidas en la técnica anterior.

En otra realización, el antígeno procede de un patógeno en el que la inmunidad celular es importante para proteger al hospedador inmunizado contra una infección o reinfección. El especialista en la técnica reconocerá que los patógenos intracelulares son un grupo de agentes infecciosos que requieren que el hospedador vacunado cree una inmunidad celular para protegerse del desafío infeccioso. Los ejemplos de patógenos intracelulares (proporcionados sólo con fines ilustrativos y no para limitar el alcance de la invención) son bacterias que producen tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), listeriosis (*Listeria monocytogenes*), tularemia (*Francisella tularensis*) y lepra (*Mycobacterium leprae*), virus [miembros de las familias de adenovirus, coronavirus, herpesvirus, ortomixovirus, papovirus, paramixovirus, piconavirus (siendo los virus más conocidos el VIH que produce SIDA y los virus que producen la gripe)] y parásitos que producen malaria (especies de *Plasmodium*), toxoplasmosis (*Toxoplasmosis gondii*) y leishmaniasis (especies de *Leishmania*).

En otra realización, el antígeno es un antígeno asociado a un tumor (es decir, un antígeno asociado con una enfermedad neoplásica) que puede ser útil para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cánceres en el hospedador inmunizado. Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica. Son ejemplos ilustrativos el antígeno específico de próstata, antígeno carcinoembrionario, mucinas y diversos antígenos de melanoma. El vehículo de arqueosoma inmunomodulador de la presente invención puede activar células presentadoras de antígenos (APC) así como presentar el antígeno en el contexto del MHC de clase I y/o de clase II. Los especialistas en la técnica apreciarán que el tipo de reacción inmune inducida también dependerá de si el antígeno tiene el epítipo o epítopos respectivos necesarios para generar las reacciones inmunes de clase I/II. Estos antígenos apropiados pueden prepararse fácilmente por los especialistas en la técnica usando técnicas recombinantes o sintéticas tradicionales o modernas.

En la presente invención se requiere que el arqueosoma sea un vehículo para el antígeno acelular apropiado. Un especialista en la técnica reconocerá que esto puede conseguirse encapsulando el antígeno dentro del arqueosoma y/o asociándolo con la capa lipídica del arqueosoma usando métodos conocidos en la técnica anterior para liposomas y otros vehículos de administración en forma de partículas. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por interacción covalente o no covalente (por ejemplo, hidrófoba, adsorción) entre el liposoma y el antígeno. También se apreciará por el especialista en la técnica que la unión del antígeno peptídico o proteico al arqueosoma puede facilitarse cuantitativamente por unión de un anclaje hidrófobo, tal como un grupo acilo graso o una secuencia hidrófoba de aminoácidos, a un extremo del péptido. Sin embargo, para que funcione la invención actual, esta modificación del antígeno no es un prerequisite.

La composición de vacuna de la invención comprende el arqueosoma como vehículo inmunomodulador para el antígeno acelular y puede incluir otros excipientes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, agua, solución salina, glicerol, dextrosa, agentes tamponantes del pH, compuestos bacteriostáticos y combinaciones de los mismos) que son compatibles con los componentes activos en la formulación de vacuna y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

Como podrá apreciar un especialista en la técnica, las composiciones de la invención pueden usarse para inmunizar a un hospedador que necesita protección de la infección por un agente infeccioso específico o con riesgo de desarrollar una enfermedad específica o afección asociada con tumores. Las formulaciones de vacuna de la invención incluirán una cantidad estimuladora inmune de un antígeno acelular seleccionado de forma apropiada. La inmunización del hospedador puede realizarse por las vías normalmente aceptables de la administración de vacunas incluyendo vías parenterales tales como subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.) e intradérmica (i.d.) y otras (oral, intranasal o tópica). La dosificación de la formulación de vacuna se administra de una manera compatible con el hospedador a inmunizar, la vía de inmunización y de una manera que sea terapéuticamente eficaz, inmunogénica y protectora. El especialista en la técnica podrá valorar fácilmente las diversas circunstancias y determinar el régimen de inmunización más apropiado.

Se demuestra que como vehículos inmunomoduladores, los arqueosomas son superiores a los liposomas convencionales y al alumbre para inducir una respuesta de células T citotóxicas con especificidad de antígeno. Esta respuesta se crea poco después de la vacunación, tiene una respuesta de memoria con una duración prolongada y protege frente a la exposición por el patógeno intracelular apropiado o cáncer. Los arqueosomas de la presente invención son seguros, no tóxicos y no producen reacciones adversas en el hospedador vacunado.

En la presente invención, los arqueosomas se definen como liposomas que se preparan a partir de lípidos polares extraídos de uno o más miembros de las arqueobacterias, o uno o más lípidos que imitan a estructuras lipídicas polares encontradas en miembros del grupo de las arqueobacterias, o de uno o más lípidos polares purificados en una forma biológicamente pura a partir de arqueobacterias. El especialista en la técnica apreciará que podrían usarse lípidos que imitan estructuralmente (tales como los obtenidos por síntesis química) a los lípidos polares encontrados en las arqueobacterias para obtener arqueosomas para los fines de la presente invención. Las arqueobacterias producen muchas estructuras lipídicas polares diferentes que son útiles para producir arqueosomas. De las especies disponibles de arqueobacterias como clase de organismos, se han seleccionado varias como ejemplos ilustrativos como fuentes de lípidos para preparar arqueosomas para la presente invención.

La descripción anterior describe en general la presente invención. Esta invención se entenderá mejor a partir de los datos proporcionados bajo el encabezamiento de "*Resultados y Discusión*". Los datos presentados en el presente documento tienen sólo fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Se contemplan cambios en la forma y sustitución de equivalentes que puedan considerarse apropiados por las circunstancias.

Definiciones de algunos de los diversos términos usados en esta descripción

Los términos específicos (definiciones) usados en la descripción se entienden en un sentido descriptivo y no deben considerarse limitaciones. Antígeno, un inmunógeno (por ejemplo, derivado de proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos y mezclas de los mismos) contra el cual un animal tal como un ser humano crea una respuesta inmune; antígeno acelular, un antígeno que no es replicativo (que no puede crecer y multiplicarse) y que puede representar un extracto de un patógeno/tejido enfermo o un componente del mismo altamente purificado, incluyendo adicionalmente componentes que se sintetizan químicamente o se producen por métodos recombinantes para imitar a los encontrados en el patógeno/tejido enfermo; adyuvante, una sustancia o material con la actividad moduladora inmune (inmunomoduladora) y/o de vehículo que cuando se administra con un inmunógeno aumenta la reacción inmune a ese inmunógeno; hospedador, cualquier animal incluyendo un mamífero, por ejemplo un ser humano, vaca, cerdo, caballo, gato, perro; célula T virgen, una célula T que no se ha expuesto a un antígeno extraño o a un antígeno autólogo críptico; célula T activada, una célula T que está experimentando mitosis y/o división celular, una que está en la fase G₁, en la fase G₂, en la fase S o en la fase M del ciclo celular; molécula coestimuladora o accesoria, una molécula que promueve la interacción antígeno-MHC con el receptor de células T; estas moléculas, tales como (sólo ejemplos ilustrativos) B7.1 (que se une a CD28) y B7.2 (que se une a CD28) facilitan diversas funciones tales como la unión inicial, estabilización de la asociación, transducción de señales, separación, etc.; respuesta de memoria, células inmunes que se han expuesto previamente a un antígeno, están en fase de reposo pero pueden activarse tras la exposición al antígeno de nuevo; célula T de memoria, célula T que puede crear una respuesta de memoria; fosfolípido convencional o fosfolípido de éster, un glicerolípido en el que las cadenas de hidrocarburo están unidas al esqueleto de glicerol a través de enlaces éster; lípido de éter, un glicerolípido en el que las cadenas de hidrocarburo están unidas al esqueleto de glicerol a

través de enlaces éter; lípido polar de arqueobacteria o arqueobacteriano, lípido polar derivado de un miembro de la clase de las arqueobacterias (sinónimo a *Archaeobacteria*) o un lípido que se sintetiza químicamente para imitar la estructura característica de los lípidos polares de las arqueobacterias; liposoma, vesícula cerrada constituida por membranas lipídicas que atrapan un volumen acuoso, el liposoma puede ser unilamelar, oligolamelar o multilamelar; liposoma convencional, un liposoma preparado a partir de fosfolípidos convencionales y que en algunos casos incluye un esteroide y puede incluir otros compuestos que están atrapados dentro de la vesícula o asociados con la membrana lipídica; arqueosoma, un liposoma preparado a partir de uno o más de los lípidos polares que son característicos para la especie de la clase *Archaea*, incluyendo las vesículas preparadas a partir de lípidos polares de arqueobacterias o lípidos que imitan estructuralmente a los lípidos polares encontrados de forma característica en las arqueobacterias; de forma similar a los liposomas convencionales, los arqueosomas pueden incluir otros compuestos que están atrapados dentro de la vesícula o asociados con la capa de membrana lipídica; vesícula, liposoma o arqueosoma. El nombre de la arqueobacteria asociada con la palabra arqueosoma (por ejemplo, arqueosoma de *T. acidophilum*, o arqueosoma procedente de *T. acidophilum*) indica que el arqueosoma está hecho con lípidos extraídos de esa arqueobacteria específica y, a menos que se indique lo contrario, de los lípidos polares totales (TPL) extraídos de esa arqueobacteria.

Materiales y métodos

Desarrollo de arqueobacterias y extracción de lípidos

Se cultivaron *Halobacterium salinarum* ("H. cutirubrum") (ATCC 33170), *Methanobrevibacter smithii* ALI (DSM 2375), *Methanospira stadtmanae* MCB-3 (DSM 3091), *Thermoplasma acidophilum* 122-1 B3 (ATCC 27658) y *Natronobacterium magadii* (ATCC 43099) como se ha descrito anteriormente (Choquet *et al.*, 1994). Se extrajeron los lípidos totales a partir de pastas celulares congeladas y los lípidos polares totales (TPL) se recogieron como la fracción insoluble en acetona (Choquet *et al.*, 1994). Cuando fue necesario, los lípidos polares se aislaron en una forma biológicamente pura por cromatografía de capa fina a partir de TPL o extractos de lípidos totales (Kates *et al.*, 1993).

Antígenos

Los antígenos ensayados incluían albúmina de suero bovino (BSA) sin ácidos grasos, lisozima de huevo de gallina (HEL) y ovalbúmina (OVA), todas ellas adquiridas en Sigma Chemical Co.

Para ensayar la capacidad de los arqueosomas de inducir la protección en ratones contra la infección por *Listeria monocytogenes*, se atrapó en vesículas un antígeno peptídico sintético que incluía los aminoácidos 90 a 106 de listeriolisina. El epítipo nonamérico inmunodominante restringido al MHC de clase I H-2K^d conocido (GYKDGNEYI) de la listeriolisina (Parmer *et al.*, 1991) se sintetizó como el nonapéptido libre o como un péptido 13-mérico dipalmitoilado (PAM₂-KSSKGYKDGNEYI-OH), o como un péptido 20-mérico dipalmitoilado (PAM₂-KSSKGYKDGNEYIWEKKKK-OH) que contiene extensiones cadena arriba o cadena arriba y cadena abajo del epítipo nonamérico, respectivamente. Los péptidos se sintetizaron usando un sintetizador de péptidos de flujo continuo MilliGen[®] 9050 y la química FMOC como se ha descrito previamente (Barbier *et al.*, 1997), pero con resina NovaSyn[®] TGT (Novabiochem) como soporte. La purificación del péptido y la HPLC analítica se realizaron con columnas de difenil sílice (Vydac[®]) usando un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1%/agua. Se estimó que la pureza era >97% por HPLC analítica. Las identidades del producto se confirmaron por espectrometría de masas con desorción por láser asistida por matriz (MALDI). Las masas determinadas/(esperadas) fueron: 9-mero libre, 1058,69 (1058,12), 13-mero dipalmitoilado, 1965,27 (1965,41), y 20-mero dipalmitoilado, 2806,42 (2805,51). Los péptidos dipalmitoilados [péptidos (PAM)₂] también se conocen como lipopéptidos 13-méricos o 20-méricos.

Se aislaron membranas exteriores de *Francisella tularensis* por medio de un método de N-lauroilsarcosina (Leslie *et al.*, 1993). Se congeló la pasta bacteriana y se descongeló una vez, seguido de suspensión en Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, y se rompió por tratamiento en una celda de prensa French. Después de una centrifugación a baja velocidad para retirar las células que no se habían roto, se disolvió N-lauroilsarcosina al 0,55% (p/v) en el sobrenadante y se continuó la incubación durante 30 minutos. Las membranas externas se recogieron y se lavaron por centrifugación a 42.000 x g durante 1 h.

Preparación y caracterización de arqueosomas y liposomas convencionales

Se prepararon arqueosomas a partir de los lípidos polares totales (TPL) extraídos a partir de la arqueobacteria indicada anteriormente, con la excepción de los arqueosomas PGP-O-CH₃ y PG. Los primeros se prepararon a partir del lípido polar arquetidil glicerolfosfato-O-metilo (PGP-O-CH₃) purificado (Kates *et al.*, 1993) aislado a partir de *H. salinarum* con una pureza de al menos un 79% (siendo el resto PG), y el segundo a partir de arquetidil glicerol (PG) aislado a partir de *N. magadii* con una pureza de >98% como se determina por espectrometría de masas con bombardeo de átomos rápidos de ion negativo. La L- α -dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), el L- α -dimiristoilfosfatidiglicerol (DMPG) y el colesterol (CHOL) se adquirieron en Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, para la preparación de liposomas convencionales (Liposoma Con.), definidos en este documento como DMPC:DMPG:CHOL o PC:PG:CHOL (relación molar 1,8:0,2:1,5).

Para la encapsulación (captura) de BSA, OVA o HEL, las vesículas se prepararon por extrusión a presión a través de filtros de 400 nm a temperatura ambiente usando un aparato Liposofast[®] (Avestin Inc., Ottawa, Canadá). A lo

largo de todo el proceso se usaron agua destilada desionizada estéril sin pirógenos y artículos de vidrio, para todas las preparaciones de vesículas. En resumen, se hidrataron 20 mg de lípidos secos durante un periodo de hasta 16 h a 35°C en solución salina tamponada con fosfato (PBS, tampón fosfato potásico 10 mM a pH 7,14, más NaCl 160 mM) que contenía el antígeno proteico (10 mg/ml) para producir vesículas multilamelares. Las vesículas multilamelares se extruyeron a presión como se ha descrito anteriormente para obtener vesículas predominantemente unilamelares. El antígeno que no estaba asociado en las vesículas extruidas a presión se retiró por ultracentrifugación ($200.000 \times g_{\text{máx}}$ durante 30 min) y lavado, tres veces, a partir de volúmenes de 7 ml de PBS. Toda las preparaciones de vesículas se caracterizaron midiendo el peso seco sin sal y los diámetros medios de la vesícula se determinaron por distribuciones de tamaño Gaussianas en número-ponderadas usando un clasificador de partículas Nicomp® (modelo 370, Nicomp, Santa Bárbara, CA). Se estimó la cantidad de proteína respectiva asociada con las vesículas (encapsulada dentro de vesículas y expuesta/adsorbida en la superficie de las vesículas), después de la eliminación de los lípidos (Wessel y Flugge, 1984), por SDS Lowry y comparación con curvas patrón construidas para la proteína relevante. Se encontraron propiedades inmunológicas similares para los arqueosomas preparados por extrusión por presión o deshidratación-rehidratación como se describe más adelante.

Para encapsular los péptidos (PAM)₂ o las membranas externas de *F. tularensis* en vesículas, se usó un método de deshidratación-rehidratación. En resumen, se secaron 30 mg de los lípidos polares totales de la arqueobacteria indicada, o la mezcla de lípidos para los liposomas convencionales, en nitrógeno y al vacío durante aproximadamente 1 h, seguido de la adición de 2,5 ml de agua, y seguido de la adición del antígeno (0,5-3 mg) disuelto en 0,15 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) en el caso de los péptidos (PAM)₂ (lipopéptidos), o agua en el caso de antígenos solubles en agua, o membranas externas. Se dejó que la hidratación continuara durante 1 h a 35°C en un baño de agua en agitación, seguido de reducción del tamaño de las vesículas en un sonicador de baño de agua para conseguir vesículas predominantemente unilamelares con un diámetro medio menor de 100 nm. Las preparaciones después se liofilizaron y se rehidrataron lentamente en 0,3 ml de agua y se incubaron a 35°C en un agitador durante 1 h. Después de la adición de 1,2 ml de PBS (tampón fosfato 10 mM, pH 7,1, NaCl 160 mM), la preparación se filtró a través de un filtro de esterilización de 0,45 μm (unidades de filtro de jeringa Millipore Millex). La cantidad de antígeno lipopeptídico atrapado en los diversos tipos de vesícula se estimó por un ensayo SDS-Lowry usando el antígeno no atrapado correspondiente como patrón, y cantidades equivalentes de vesículas sin antígeno como control blanco. Como esencialmente todos los péptidos palmitoilados se incorporaron en arqueosomas por el método usado, no fue necesaria una etapa de separación para eliminar el antígeno no unido. Sin embargo, en el caso de otros antígenos, el antígeno no atrapado se eliminó por centrifugación y lavado del sedimento de liposomas con PBS. En la mayoría de los casos, las vesículas que contenían antígeno tenían un diámetro medio de 150 ± 100 nm.

El péptido 20-mérico dipalmitoilado se preparó en forma de micelas para vacunas para ensayar el efecto del antígeno sin incluir en el liposoma. El lipopéptido 20-mérico disuelto en DMSO se mezcló (por agitación vorticial durante 2 min seguido de una breve sonicación en un sonicador de baño) con PBS que contenía ácido trifluoroacético al 0,01% para conseguir una concentración final de 0,4 mg/ml de antígeno y DMSO al 10% v/v. El antígeno se diluyó adicionalmente en PBS a la concentración final deseada.

Líneas Celulares

Las líneas celulares J774A.1 e IC21 (macrófagos) se obtuvieron en la ATCC y se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con FBS al 8% (Hyclone, Logan, UT) y gentamicina a 10 $\mu\text{g/ml}$ (Life Technologies). EG.7, un subclon de EL-4 transfectado de forma estable con el gen que codifica OVA (Moore et al., 1998) también se obtuvo de la ATCC pero se mantuvo en RPMI más FBS al 8%, que contenía adicionalmente G418 a una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$ (Rose Scientific Ltd., Edmonton, Alberta, Canadá). Las células B16-OVA (una línea celular de melanoma que expresa péptidos de OVA) fue una donación del Dr. Edith M. Lord (University of Rochester, Rochester, NY) y se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 8%. La línea celular Phem 3.3 (línea celular negativa para el MHC de clase II) fue una donación del Dr. M. J. Bevan (University of Washington, Seattle, WA). Phem 3.3 es un subclon de la línea celular de mastocitoma P815 que se ha transfectado de forma estable con el gen que codifica listeriolisina (Parmer et al., 1991). Estas células se mantuvieron rutinariamente en RPMI que contenía FBS al 8% y G418 a 400 $\mu\text{g/ml}$ (Rose Scientific Ltd., Edmonton, Alberta, Canadá). La línea de células parentales, P815, se obtuvo a partir de la ATCC y se mantuvo en RPMI suplementado con FBS al 8%. La línea celular Wehi 164-13 usada para el bioensayo de TNF se obtuvo a partir del Dr. T. R. Mosmann (University of Rochester, Rochester, NY) y se mantuvo en RPMI que contenía FBS al 8%. Todas las células se cultivaron a 37°C, con CO₂ al 8% en una atmósfera humidificada.

Generación de células dendríticas (DC) derivadas de médula ósea

Se limpió la médula ósea de los fémures y tibias de uno a tres ratones BALB/c normales, y se prepararon suspensiones de una sola célula prensándola a través de tamices de células Falcon® 2360 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) usando un émbolo de jeringa estéril de 1 ml. Las células se contaron y se resuspendieron a 1×10^6 células/ml en medio RPMI suplementado con FBS al 8% y 5 ng/ml de GM-CSF murino recombinante (ID Labs, London, ON, Canadá) en un matraz de cultivo de tejidos Falcon® (Becton Dickinson) y se cultivaron durante 6-8 días a 37°C en CO₂ al 8%. Las células no adherentes se retiraron en los días 2 y 4 de cultivo, y se añadió más RPMI con FBS al 8% que contenía GM-CSF (factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos). El día del experimento se recogieron las células no adherentes, se lavaron, se contaron y se usaron. Las preparaciones de células dendríticas eran uniformemente >80% CD11c⁺ según la citometría de flujo.

Ratones

Se adquirieron ratones C57BU6 y BALB/c hembra, de 6-8 semanas de edad, endogámicos, sin patógenos específicos, en Charles Rivers Laboratories (Montreal, Que.). Los ratones CS7BL/6J deficientes en células T CD4⁺ y sus controles se obtuvieron en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Se introdujeron en los experimentos cuando tenían 8-12 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron y se usaron de acuerdo con las recomendaciones de la edición actual (1993) del Consejo Canadiense sobre las Prácticas de Cuidados Animales para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales.

Inmunización

Grupos de 3-6 ratones recibieron inmunizaciones del antígeno en PBS (sin adyuvante), en alumbre o en adyuvante de Freund (FA), o atrapado en arqueosomas o liposomas convencionales, como se especifica en las leyendas de la figura o en las notas proporcionadas debajo de las tablas. El volumen de inmunización fue de 100-200 μ l, la dosis de antígeno fue de 8-30 μ g/inyección y la concentración de lípido en la vesícula de 0,5-1,5 mg/inyección. Para las inmunizaciones con alumbre, el antígeno se adsorbió en alumbre Imject[®] (Pierce, Rockford, Illinois) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las vías de inmunización fueron intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.) inyectada en la base de la cola.

Infección y exposiciones tumorales en modelos murinos

Todas las vacunas ensayadas en la exposición al patógeno infeccioso usando modelos murinos apropiados se administraron por vía subcutánea, en la base de la cola, en un volumen de 0,1 ml en PBS. Como se indica en las secciones relevantes de los resultados se emplearon diversos regímenes de vacunación. Para la exposición en el modelo de listeriosis, a diversos puntos del tiempo después de la vacunación indicados, se expusieron ratones de control y vacunados a un inóculo intravenoso de la cepa 10403S de *Listeria monocytogenes* preparado como se ha descrito previamente (Conlan, 1997) o con la cepa C5R de *Salmonella typhimurium*. A diversos puntos de tiempo después de la exposición indicados, los ratones se sacrificaron por asfixia con CO₂ y se retiraron sus hígados, bazo y otros órganos cuando fue necesario. Estos órganos se homogeneizaron y se cultivaron en agar con infusión cerebro-cardíaca que contenía 50 μ g/ml de estreptomina. Se contaron las colonias bacterianas (unidades formadoras de colonias, CFU) después de incubar las placas durante 24 horas a 37°C. Las cargas bacterianas (CFU/órgano) en los tejidos de diversos grupos de ensayo se analizaron estadísticamente usando el ensayo de suma de rangos de Mann Whitney y se consideraron significativamente diferentes entre sí a $p < 0,05$.

En el caso del modelo de infección por *Francisella tularensis*, la exposición a ratones de control e inmunizados se administró como un aerosol. Se generan aerosoles de partícula pequeña en el intervalo de 4-6 μ m en un nebulizador Lovelace[®] que funciona a 40 p.s.i. Una vez generados, los aerosoles se administran a una cámara de exposición. Para la exposición, los ratones se encierran en conos de inmovilización de los que sólo sobresalen los orificios nasales a la corriente de aerosol. Tres días después de la exposición al patógeno (a menos que se indique otra cosa), los ratones se sacrificaron y se retiraron el hígado, el bazo y los pulmones como se ha descrito anteriormente. Los órganos se homogeneizaron y se cultivaron en placas con agar con infusión de cisteína y corazón suplementado con hemoglobina al 1% (p/p). Las colonias bacterianas se contaron después de incubar las placas durante 24 horas a 37°C. Las cargas bacterianas (CFU/órgano) en los tejidos de diversos grupos de ensayo se analizaron estadísticamente usando el ensayo de suma de rangos de Mann Whitney y se consideraron significativamente diferentes entre sí a $p < 0,05$. Para los dos modelos de infección anteriores, el límite inferior de detección de patógeno en el hígado y bazo fue de 100 CPU/órgano y para los pulmones de 50 CFU.

Para el modelo de tumor EG.7, se inmunizaron s.c. ratones C57BL/6 (5 por grupo) en la base de la cola con las vacunas descritas. En los ratones se inyectaron (s.c.) 10 x 10⁶ células tumorales EG.7 en la región dorsal media para iniciar la exposición tumoral. El modelo tumoral se usó para evaluar la eficacia de los arqueosomas para aplicaciones profilácticas (ratones preinmunizados antes de la exposición tumoral) y terapéutica (células tumorales implantadas y ratones inmunizados al mismo tiempo). En los ratones se controlaron regularmente la progresión tumoral y una vez que el tumor alcanzó un tamaño palpable, se midieron la longitud (L) y la anchura (W) con calibres digitales y el crecimiento del tumor se registró como el producto de L x W (mm²). Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron una anchura máxima de 17 mm.

Para el modelo de melanoma metastásico, se inmunizaron ratones C57BL/8 (s.c.) los días 0 y 21 con 25 μ g de OVA encapsulada en arqueosomas de *M. smithii*. Ocho semanas después de la primera inmunización, en grupos de ratones de control vírgenes y los ratones inmunizados se inyectaron (i.v.) células de B16-OVA (5 x 10⁵/ratón) para iniciar la exposición tumoral. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la exposición y se enumeraron los focos metastásicos negros en los pulmones por recuento visual.

Proliferación de esplenocitos con especificidad de antígeno

Se obtuvieron esplenocitos el día 28 a partir de ratones individuales inmunizados los días 0 y 21. La lisis selectiva de RBC se realizó usando cloruro armónico tamponado con Tris, pH 7,2 (Sigma Chemical Co.). Las células se lavaron dos veces y se establecieron cultivos por triplicado (72 h, CO₂ al 7%) en medio RPMI 1640 (Gibco-BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY) en placas de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos (Falcon[®], Becton

and Dickinson) para la proliferación en presencia o ausencia de antígeno. El suplemento de suero usado para el cultivo incluía suero equino definido (al 2%, para los cultivos estimulados con BSA) o suero bovino fetal (al 8%, para cultivos estimulados con HEL y OVA), obtenido en Hyclone Laboratories Inc., Logan, Utah. Los pocillos se sometieron a pulsos de $1 \mu\text{Ci}$ de $[^3\text{H}]$ timidina. (ICN Pharmaceuticals Canadá, Montreal, Quebec) durante 18 h, se recogieron en filtros de fibra de vidrio y la radiactividad incorporada en las células (medida de la respuesta proliferativa) se determinó por recuento de centelleo de líquidos. La respuesta proliferativa se expresó como cuentas por minuto (CPM) o como CPM X 1000 (kCPM) $\pm$ SEM de ratones en cada grupo.

Para evaluar la estimulación específica de listeriolisina, se cultivaron células de bazo (5×10^5) de ratones inmunizados por triplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos (Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) con diversas concentraciones del péptido nonamérico libre. Después de 72 h, se recogieron los sobrenadantes y se ensayaron con respecto a la producción de IFN- γ por medio de un ELISA de tipo sándwich.

Ensayos de citoquinas

Las citoquinas secretadas en los sobrenadantes de cultivos estimulados con antígeno se midieron por un método ELISA de tipo sándwich (Mosmann y Fong, 1989). Los pares de anticuerpo usados incluían RA-6A2 (ATCC HB170), y XMG1.2-biotina (Cherwinski *et al.*, 1987) para IFN- γ , y 11B11 (Ohara y Paul, 1985) y BVD6-24G2-biotina (Pharmingen Canada Inc, Mississauga, Canadá) para IL-4. Los patrones de IFN- γ e IL-4 se adquirieron en ID Labs, London, Canadá. En cada placa se incluyeron curvas patrón por duplicado. La sensibilidad de los ELISA fue la siguiente: IFN- γ >100 pg/ml e IL-4 >15 pg/ml. El TNF secretado en los sobrenadantes de cultivos de APC activados por arqueosomas se midió por medio de un bioensayo en células Wehi 164-13 (Sad *et al.*, 1995). La sensibilidad del ensayo de TNF fue 0,1 pg/ml.

Análisis del ciclo celular

El análisis del ciclo celular se realizó cuantificando la incorporación de colorante de unión al ADN, yoduro de propidio, por citometría de Flujo. En resumen, se tiñeron esplenocitos (10^6) con anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8 conjugados con FITC (Pharmingen Canada, Inc.) durante 30 min en hielo en 50 μl de medio RPMI que contenía suero bovino fetal (FBS) al 8%. Las células después se lavaron y se fijaron durante una noche a 4°C en 1 ml de etanol enfriado con hielo al 70%. Las células fijadas se tiñeron con yoduro de propidio (Calbiochem, La Jolla, CA) en presencia de ribonucleasa A (100 U/ml, Boehringer Mannheim, Laval, Canadá) y se analizaron por Citometría de Flujo (EPICS® XL, Beckman Coulter Corp., Hialeah, FL). Se obtuvieron perfiles de contenido de ADN con ventanas de células CD4⁺ y CD8⁺ usando el software EXPO® (Beckman Coulter Corp.). Como la ploidía del ADN aumenta cuando las células entran en las fases sintética y mitótica, cada célula incorpora mayores cantidades de yoduro de propidio. De esta manera, los porcentajes de células en diversas fases del ciclo celular [apoptótica, G1 (reposo), S (sintética) y G2/M (mitótica)] se calcularon basándose en el contenido de ADN.

Evaluación de los títulos de anticuerpo

Se extrajo sangre de los ratones por la vena del extremo de la cola o por punción cardiaca, y la sangre se recogió en tubos separadores de suero Microtainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Después de dejar coagular la sangre (1 h a 4°C), el suero se separó por centrifugación y se congeló a -20°C hasta que se ensayó. Los niveles de anticuerpo se determinaron por ELISA específico de antígeno indirecto. En resumen, se recubrieron placas ELISA (placas de microtitulación EIA, fondo plano de 96 pocillos, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) con antígeno en PBS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y se ensayaron por duplicado diluciones seriadas de dos veces de suero (procedentes de ratones individuales). Para determinar los títulos de anticuerpo total de suero se usó inmunoglobulina de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (IgG + IgM) como anticuerpo de revelado (Caltag, San Francisco, CA). Las reacciones se revelaron con sistema de peroxidasa de micropocillos ABS (Kirkegaard y Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland) y la absorbancia se determinó a 415 nm después de 15 min a temperatura ambiente. Los títulos de anticuerpo se representan como diluciones de punto final que presentan una densidad óptica de 0,3 unidades por encima del nivel de fondo. En el mismo ensayo se evaluaron muestras pertenecientes a cada experimento.

Ensayos de CTL

Se prepararon células efectoras a partir de los esplenocitos de ratones inmunizados y vírgenes. Se co-cultivaron 30×10^6 células de bazo con 5×10^5 células EG.7 irradiadas en matraces de cultivo de tejidos de 25 cm² en una posición vertical. El medio de cultivo era 10 ml de RPMI 1640 suplementado con FBS al 8% y 0,1 ng/ml de IL-2. Después de 5 días a 37°C y CO₂ al 8%, las células se recuperaron, se lavaron, se contaron y se usaron como efectores para el ensayo de CTL. Las células diana eran células EG.7 o EL-7. Las células EL-4, a diferencia de las EG.7, no presentan un epítipo OVA de MHC-1 y por lo tanto sirvieron como controles negativos para la destrucción no específica. Las células diana (10^7) se marcaron con 100 μCi de ^{51}Cr en 50 μl de RPMI más medio FBS al 8% durante 45 min. Las dianas se lavaron y se co-cultivaron diversas relaciones de efectores y diana durante 4 horas en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y la radioactividad se midió por recuento gamma. El porcentaje de lisis específica se calculó como $100 \times [(\text{cpm experimentales} - \text{cpm espontáneas}) / \text{cpm totales} - \text{cpm espontáneas}]$. Una unidad lítica se define como el número de células efectoras por 10^6 células de bazo que produce un 20% de lisis específica de una población de $2,5 \times 10^4$ células diana.

ES 2 320 971 T3

Para determinar la actividad de CTL en bazo de ratones inmunizados con el lipopéptido de listeriolisina, se cultivaron 30×10^6 células de bazo con 5×10^5 células Phem 3.3 irradiadas (10.000 rad) en 10 ml de RPMI más FBS al 8% que contenía 0,1 ng/ml de IL-2, en matraces de cultivo de tejidos de 25 cm² verticales (Falcon®). Después de 5 días (37°C, 8% de CO₂), las células se recuperaron del matraz y se usaron como efectores en el ensayo de CTL de liberación de ⁵¹Cr convencional, como se ha detallado anteriormente. Las dianas eran células Phem 3.3 (diana específica que expresa el péptido de listeriolisina) o células P815 (control no específico).

Activación in vitro de células presentadoras de antígeno (APC)

Se incubaron células dendríticas derivadas de médula ósea o J774A.1 con 25 µg/ml de arqueosomas vacíos o liposomas convencionales, en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos *in vitro* (Falcon®) a las densidades celulares apropiadas indicadas. Como alternativa, las células se activaron con 10 µg/ml de LPS (obtenido a partir de *E. coli*, una donación de nuestro colega Dr. M. B. Perry). Después de 24 h a 37°C y con un 8% de CO₂, en una atmósfera humidificada, las células se recuperaron y se tiñeron para diversos marcadores de la superficie celular o se usaron como APC (después de la irradiación a 2.500 rad) en ensayos de proliferación de células T.

Inyecciones de arqueosomas y preparaciones de exudado peritoneal

En ratones BALB/c o C3H/HeJ se inyectaron por vía intraperitoneal arqueosomas vacíos (1 mg de lípido/inyección). A diversos puntos de tiempo después de la inyección, los ratones se sacrificaron y se recuperaron células de exudado peritoneal realizando un lavado peritoneal con 10 ml de RMPI caliente más FBS al 8%. Después se lisaron selectivamente los eritrocitos con cloruro amónico tamponado con Tris, pH 7,2 (Sigma Chemical, Co.). Las células se lavaron, se resuspendieron en RPMI más FBS al 8%, se contaron y se analizaron con respecto a la expresión de marcadores de la superficie celular, se usaron para la clasificación de células o se usaron como APC (después de la irradiación) para ensayos de alo-estimulación de células T.

Ensayo de alo-estimulación de células T

Se enriquecieron en células CD4⁺ o CD8⁺ esplenocitos de C57BL/6 (H-2K^b) obtenidos a partir de ratones vírgenes por medio de pases a través de las columnas de células T apropiadas (Cytovax, Edmonton, Canadá) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron esplenocitos (100×10^6) con un anticuerpo CD4 o CD8 de rata anti-ratón, se cargaron en columnas en perlas de vidrio recubiertas con Ig de cabra anti-rata e Ig de oveja anti-ratón y se eluyeron. Las células después de pasar a través de la columna tenían una pureza del 80-90% para la célula T apropiada como se determinó por análisis citométrico de flujo. Las células T obtenidas de esta manera se cultivaron con alo-APC (H-2K^b) irradiadas (2.500 rad) a diversas concentraciones de APC:células T, por triplicado, en medio RPMI más FBS al 8%, en placas de microtitulación de 96 pocillos (Falcon®). Después de 72 h, se recogió una alícuota del sobrenadante de cultivo para el análisis de citoquinas. Para determinar la proliferación de células T, los cultivos se sometieron a pulsos de 1 µCi de [³H]timidina (ICN Pharmaceuticals Canada, Montreal, Canadá) durante 18 h, se recogieron en filtros de fibra de vidrio y se determinó la radioactividad incorporada por recuento de centelleo de líquidos.

Análisis citométrico de flujo y clasificación

Para el análisis citométrico de flujo, las células se incubaron en hielo (10⁶ células en 50 µl de RPMI más FBS al 1%) con CD32/CD16 anti-ratón (receptor FcγII/III). Después de 30 min, se lavaron alícuotas y se incubaron en 50 µl de RMPI más FBS al 1% con los diferentes anticuerpos anti-ratón biotinilados o asociados a FITC o PE como se indica en las leyendas de las figuras. Los anticuerpos usados para los diversos experimentos incluían: Mac 1α (CD11b), F4/80, CD11c, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), H-2K^d (MHC de clase I), I-A^d (MHC de clase II), B220, CD4, CD8, CD28, CD44 y LFA-1. Todos los anticuerpos se obtuvieron en PharMingen Canada Inc (Mississauga, Canadá) excepto F4/80 que se obtuvo en Cedarlane Laboratories (Homby, Ontario, Canadá). La incubación del anticuerpo se realizó durante 30 min en hielo. Posteriormente, las células teñidas con anticuerpos biotinilados se incubaron con estreptavidina-FITC después de un lavado minucioso. Las células se fijaron en formaldehído al 1% en PBS y se analizaron por citometría de flujo (EPICS® XL; Beckman Coulter Corp., Hialeah, Canadá) usando su software EXPO®.

Para la clasificación de células por citometría de flujo, se tiñeron células de exudado peritoneal (10×10^6 /ml) con 5 µl del anticuerpo CD32/CD16 anti-ratón, seguido de 5 µl de Mac 1α anti-ratón marcado con PE, o anticuerpo B220 durante 30 min en hielo. Las células después se lavaron y se resuspendieron en 1 ml de RPMI 1640 suplementado con FBS al 1%. Las células se clasificaron en EPICS® Elite ESP (Beckman Coulter Corp.), y se recogieron en medio R8. Después se analizó una alícuota de las células clasificadas en EPICS® XL, para confirmar la pureza.

Resultados y discusión

Los arqueosomas facilitan la proliferación con especificidad de antígeno de células de bazo

La inducción de una respuesta mediada por células contra antígenos a menudo es crítica para conseguir una inmunidad sostenida y eficaz, particularmente contra patógenos intracelulares. Uno de los primeros indicadores de una respuesta inmune mediada por células eficaz mediada por células T CD4⁺ es la capacidad de poblaciones de linfo-

citados de ratones inmunizados para responder al antígeno soluble (Ag) *in vitro*. Se inmunizaron ratones (BALB/c y/o C3H/HeJ) con BSA (Figura 1A y 1B), HEL (Figura 1C) u OVA (Figura 1D) encapsuladas en los arqueosomas indicados o en liposomas convencionales (Liposomas Con.), o adsorbidas en alumbre (Alum). Cuando se indica, se incluyeron controles con antígeno solo (sin adyuvante). La BSA, HEL y OVA se usaron a 10, 10 y 15 μg por inyección respectivamente. Las inmunizaciones fueron i.p. o s.c. y se realizaron los días 0 y 21. Se recogieron los bazo el día 28 y la proliferación con especificidad de antígeno de los esplenocitos se evaluó como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los datos representan la respuesta proliferativa media dependiente de antígeno, expresada como cuentas por minuto (CPM) $\times$ 1000 (kCPM) $\pm$ SEM de ratones en cada grupo [n=5 (Figura 1A, 1B), n=6 (Figura 1C) y n=3 (Figura 1D)].

Se observó una proliferación específica de BSA de células de bazo después de la inmunización i.p. (Figura 1A). Se observó una proliferación dependiente de la dosis con BSA únicamente en las células de bazo de ratones que se habían inmunizado con BSA atrapada en arqueosomas (BSA-arqueosomas). Los liposomas convencionales así como el alumbre no pudieron inducir una proliferación significativa. Además, se observó una respuesta proliferativa de las células de bazo después de la inmunización con arqueosoma tanto en ratones BALB/c como en ratones C3H/HeJ (que presentan una hipo-respuesta a LPS) (Figura 1B). Se observó una proliferación con especificidad de antígeno similar después de la inmunización de los ratones con HEL-arqueosomas (Figura 1C) y OVA-arqueosomas (Figura 1D). La inmunización con arqueosomas por la vía s.c. produjo respuestas similares, que fueron mayores que las observadas con liposomas convencionales (Figura 1D, panel inferior).

De forma similar a los liposomas convencionales, más del 85% de la BSA asociada con los arqueosomas quedó atrapada dentro de las vesículas, quedando expuesto el resto en la superficie de la vesícula (datos no mostrados), como se determina por análisis de BSA de las vesículas respectivas antes y después del tratamiento de proteólisis.

Los arqueosomas inducen la producción de citoquinas Th1 y Th2 por cultivos de ganglio linfático y bazo estimulados con antígeno

La proliferación de linfocitos con especificidad de antígeno produce la activación de respuestas auxiliares de células T específicas y la producción de citoquinas. Aunque las respuestas Th2 (IL-4) son importantes para ayudar a la producción de anticuerpos por las células B, las respuestas Th1 (IFN- γ) son importantes para la inducción de una inmunidad celular eficaz. Las respuestas Th1 y Th2 pueden ser dicótomas y los propios antígenos pueden desviar la inmunidad hacia una o la otra (Krishman y Mosmann, 1998). Un adyuvante superior por otra parte debería poseer la capacidad deseable de inducir tanto respuestas Th1 como respuestas Th2 independientemente de la naturaleza antigénica.

Se inmunizaron ratones BALB/c (días 0 y 21) i.p. con 10 μg de HEL (Figura 2A), o s.c. con 15 μg de OVA (Figura 2B), encapsuladas en arqueosomas de *M. smithii* o *M. stadtmanae*. También se incluyeron grupos de ratones inmunizados con HEL sola como controles (es decir, antígeno solo, Sin adyuvante). Como se muestra en la figura, se incluyeron HEL encapsulada en liposomas convencionales (Liposoma Con.), y HEL mezclada con alumbre (Alum). Los bazo se recogieron el día 28, y las células de cada ratón se estimularon por triplicado con dosis variables del antígeno apropiado *in vitro* durante 72 h. Se determinaron por medio de un ELISA las citoquinas producidas en sobrenadantes a las 72 h. Los valores representan la medida $\pm$ SEM de la producción de citoquinas por células de bazo de ratones en cada grupo [n=6 (Figura 2A), n=3 (Figura 2B)]. Solo se observó una producción de IFN- γ sustancial en cultivos de células obtenidas a partir de ratones inmunizados con HEL-arqueosomas de *M. smithii* (Figura 2A). Los niveles de IFN- γ mostraron una clara producción dependiente de la dosis en la respuesta a la estimulación por el antígeno. El alumbre no pudo inducir ninguna producción de IFN- γ . Por otra parte, tanto los arqueosomas como el alumbre indujeron la producción de IL-4. Los liposomas convencionales no indujeron ni IFN- γ ni IL-4. La capacidad de los arqueosomas de *M. smithii* para inducir respuestas Th1 (IFN- γ) así como Th2 (IL-4) contra antígenos atrapados se corroboró adicionalmente usando otro sistema de antígeno. La inmunización de ratones con OVA-arqueosomas por vía s.c. también ocasionó la producción de IFN- γ e IL-4 por células de bazo (Figura 2B). Después de la inmunización s.c. con arqueosomas, se detectó producción de citoquinas incluso en cultivos de ganglio linfático poplíteo (datos no mostrados). Incluso la potencia de la inmunización s.c. falló en la inducción de una producción sustancial de IFN- γ por alumbre. De nuevo, los liposomas convencionales no indujeron ni IL-4 ni IFN- γ .

También se observó (Figura 3) la producción de IFN- γ dependiente de antígeno por células de bazo cultivadas (ensayadas como se describe en la Figura 2) obtenidas (el día 28) a partir de ratones BALB/c inmunizados s.c. (días 0, 21) con 15 μg de OVA encapsulada en arqueosomas de *T. acidophilum* o *H. salinarum* o *M. smithii*. Además, el nivel de IFN- γ producido (los valores representan medias $\pm$ SEM de producción de citoquinas por células de bazo de ratones en cada grupo, n=3) por bazo de ratones inmunizados con OVA-arqueosoma fue considerablemente mayor que el observado en ratones inmunizados con una cantidad equivalente de OVA encapsulada en liposomas convencionales (Liposomas Con.).

Inducción de memoria de células T por arqueosomas: aumento del ciclo celular de células CD4⁺

Ratones BALB/c hembra que se inmunizaron (i.p.) los días 0 y 14 con BSA (15 μg /inyección) encapsulada en arqueosomas de *T. acidophilum* (0,53 mg/inyección), o mezclada con alumbre, o en PBS sola (sin adyuvante) se reforzaron con 25 μg de BSA en PBS los días 210 y 334. La inmunización de Ag con arqueosoma indujo una respuesta de anticuerpo primario moderadamente aumentada que se mantuvo casi 200 días ($P < 0,02$ por ANOVA, para todos los

puntos de tiempo en comparación con la inmunización sin adyuvante). Después de un refuerzo con antígeno solo el día 210, se observó una respuesta de anticuerpo de memoria destacable (aproximadamente un aumento 2 log, $P=0,0004$) que se mantuvo al menos hasta el día 300. Por otra parte, el alumbre, a pesar de inducir una respuesta primaria potenciada que era comparable a la obtenida con los arqueosomas, mostró una reducción posterior en los títulos de anticuerpo y no pudo inducir una respuesta de rellamada significativa contra los refuerzos realizados sólo con antígeno (datos no mostrados).

Siete días después de los refuerzos sólo con antígeno en el día 334, se recogieron las células de bazo, se lisaron selectivamente los glóbulos rojos y las células dentro de cada grupo se reunieron para el análisis del ciclo celular. Las células después se tiñeron con anticuerpos anti-CD4⁺ y anti-CD8⁺ marcados con FITC y se analizó el ciclo celular en células CD4⁺ seleccionadas como ventana de análisis por cuantificación de la incorporación de yoduro de propidio usando citometría de flujo que se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se adquirieron 20.000 acontecimientos por muestra. Los perfiles de la Figura 4A indican la ventana de CD4⁺ (FL1). Los gráficos de la Figura 4B indican el porcentaje de células CD4⁺ en diversas fases del ciclo celular [basándose en el contenido de PI (FL3)] en cada grupo. Según aumenta la cantidad de ADN por célula, mayor es la incorporación de PI y mayor es el número de células en fase sintética y/o mitótica. "A" significa fase apoptótica, "G1" reposo, "S1" sintética y "G2/M" mitótica. En la Figura 4A se muestra la frecuencia de tinción CD4⁺ en poblaciones de células de bazo obtenidas a partir de ratones inmunizados con BSA sola como control (sin adyuvante), BSA-alumbre (Alum), o BSA-arqueosoma de *T. acidophilum* (*T. acidophilum*). El número total de células CD4⁺ aumentó ligeramente del 29% en los controles al 37% en el grupo inmunizado con arqueosomas. La comparación, entre los diversos grupos, de perfiles de ciclos celulares de las células CD4⁺ reveló que la exposición antigénica de ratones inmunizados con arqueosoma de *T. acidophilum* produjo un espectacular aumento en los números de células en fase S (sintética) y G2/M (mitótica) (Figura 4B). Esto estaba acompañado por una reducción concomitante en las células en fase G1 (reposo). Por el contrario, la inmunización con alumbre no indujo ningún cambio en los porcentajes de células en las diversas fases en comparación con el control sin adyuvante. No se detectó ningún cambio en el porcentaje de números de células CD8⁺ en fase sintética/mitótica entre los diferentes grupos (datos no mostrados), lo cual era esperado ya que la exposición al antígeno soluble no puede llevar a una presentación de MHC de Clase I.

Los arqueosomas inducen respuestas CTL a OVA encapsulada

Se inmunizaron ratones C57BL/6 i.p, los días 0 y 21 con 15 µg de OVA en PBS (Sin adyuvante) o encapsulada en liposomas convencionales (Liposomas Con.), o en arqueosomas de *M. smithii* (*M. smithii*), o adsorbida sobre (mezclada con) alumbre (Alum). Los bazos se obtuvieron el día 28 y las células de bazo reunidas (n=3/grupo) se estimularon con células EG-7 irradiadas durante 5 días y se midió la actividad de CTL a las 4 horas contra dianas marcadas con ⁵¹Cr como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los datos de CTL representan el porcentaje de lisis específica de cultivos por triplicado ± SD a diversas relaciones de efector:diana (E:T) en células EL-4 (diana no específica) y EG.7 (diana específica que expresa péptidos de OVA) (Figura 5A). Las células de bazo de ratones inmunizados con OVA-arqueosoma presentaron una fuerte actividad de CTL (% de lisis específica) hacia EG.7 pero no las células L-4 de control negativo (Figura 5A). Para estos experimentos se usó una cantidad relativamente baja de antígeno (15 µg de OVA en aproximadamente 1,0 mg de lípidos), reiterando la potencia de la respuesta CTL por OVA-arqueosomas. Las células de bazo de los liposomas convencionales con OVA y de ratones inmunizados sin adyuvante (OVA sola en PBS) no demostraron actividad de CTL, mientras que la actividad de CTL de bazos de ratones inmunizados con OVA-alumbre fue mínima.

Se ha demostrado que el epítipo de CTL inmunodominante en ovalbúmina para el haplotipo H-2K^b es OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SI-INFELK) (Rockzschke *et al.*, 1991). Para ensayar si la respuesta de CTL inducida por los arqueosomas se correlacionaba con la presentación de este epítipo, se sometieron células de macrófagos (IC21) a pulsos con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ durante 2 h *in vitro* y después se usaron como estimuladores para células de bazo obtenidas a partir de los ratones inmunizados en la Figura 5A. La producción de IFN-γ por los cultivos de células de bazo se controló a las 72 horas como una medida de la estimulación de células T CD8⁺. Se indica la producción de IFN-γ (Figura 5B) para cultivos por triplicado ± SD en ausencia de la estimulación con APC (sin activación), en presencia de APC no cargadas (APC) y después de la estimulación con APC sometidas a pulsos de péptido de OVA (APC + OVA-péptido). Las células de bazo de ratones inmunizados con OVA-arqueosoma de *M. smithii* respondieron a la estimulación en el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ produciendo una cantidad sustancial de IFN-γ (Figura 5B). No hubo ninguna activación no específica en ausencia del péptido SIINFELK. De forma similar, las células de bazo de ratones inmunizados con OVA en ausencia de adyuvante no respondieron a la estimulación con péptido.

Para evaluar si las respuestas de CTL pueden también pueden mediarse por otros tipos de arqueosoma, se inmunizaron ratones C57BU6 una vez (s.c.) con 15 µg de OVA en PBS sola (sin adyuvante), o encapsulada en arqueosomas de *M. smithii*, *T. acidophilum*, *H. salinarum* o *M. stadtmanae*. Los ratones inmunizados con OVA encapsulada en arqueosomas de *M. smithii* se usaron como control positivo. El día 14 se recogieron los bazos, se reunieron (n=3/grupo) y se estimularon con células EG.7 irradiadas durante 5 días y después se evaluó la actividad de CTL a las 4 horas en dianas marcadas con ⁵¹Cr (EL-4 y EG.7). Se indica el porcentaje de lisis específica ± SD de cultivos por triplicado (Figura 6) a las diversas relaciones de Efector:Diana (E:T). Todos los tipos de arqueosoma indujeron respuestas de CTL fuertes (Figura 6) después de una sola inmunización.

En un experimento adicional, se compara la actividad de CTL en bazos de ratones que recibieron una (día 0) o dos (días 0 y 21) inmunizaciones de OVA-arqueosoma (s.c.). En este experimento, se inmunizaron ratones C57BL/6

como se indica en la Figura 7, con 15 μ g de OVA en PBS sola (sin adyuvante) o encapsulada en arqueosomas de *T. acidophilum* o *H. salinarum*. Se recogieron los bazo el día 28, se estimularon con células EG.7 irradiadas, se evaluó la actividad de CTL y se determinó el % de lisis específica como se describe para la Figura 6. Los ratones inmunizados una o dos veces con los OVA-arqueosomas demostraron actividad de CTL, pero la actividad de CTL de las células de bazo de ratones inmunizados dos veces fue mayor en comparación con los ratones que recibieron únicamente una inmunización con el tipo de arqueosoma correspondiente (Figura 7).

Los arqueosomas compuestos de lípidos de arqueobacterias purificados inducen la actividad de CTL

Para ilustrar el concepto de que lípidos polares de arqueobacterias aislados en una forma biológicamente pura, o subfracciones de lípidos polares, pueden sustituir a los lípidos polares totales extraídos de preparaciones de arqueosomas de esta invención, se realizó un experimento como se describe en la Tabla 1. OVA atrapada en arqueosomas compuesta de arquetidil glicerolfosfato-O-metilo o arquetidil glicerol indujo claramente la actividad de CTL en ratones.

La actividad de CTL inducida por arqueosomas está mediada por células T CD8⁺

Como verificación de que la actividad de CTL inducida por células de bazo de ratones inmunizados con OVA-arqueosomas de *M. smithii* estaba mediada efectivamente por células T CD8⁺, se realizó el experimento indicado en la Figura 8. Se inmunizaron ratones C57BL/6 (i.p.) los días 0 y 21 con 15 μ g de OVA en PBS sola (Sin adyuvante) o encapsulada en arqueosomas de *M. smithii*. El día 28, los bazos se recogieron, se reunieron (n=4/grupo) y se estimularon con células EG.7 irradiadas durante 5 días para multiplicar los efectores. Las células T CD8⁺ se retiraron (se eliminaron) de una alícuota de efectores de *M. smithii* (lisado de *M. smithii*-CD8) el día 5 con el uso de anticuerpo anti-CD8 y complemento de conejo. El análisis de citometría de flujo de los efectores reducidos indicó que la población se había reducido en >99% de células T CD8⁺ y no había una reducción no específica de células T CD4⁺ (datos no mostrados). La actividad de CTL de esta preparación se comparó con la de los controles positivos (efectores de *M. smithii* no reducidos) y negativos (efectores sin adyuvante) en el ensayo de 4 h contra dianas marcadas con ⁵¹Cr (EL-4 y EG.7). Los datos representan el % de lisis específica $\pm$ SD de cultivos por triplicado a las diversas relaciones de Efector:Diana (E:T). La reducción de células T CD8⁺ anuló completamente la actividad lítica de los efectores de OVA-*M. smithii* hacia las células EG.7 (Figura 8), demostrando claramente que la respuesta de CTL está mediada por células T CD8⁺.

La respuesta de CTL inducida por arqueosomas es independiente de las células T CD4⁺

Para evaluar el papel de ayuda de las células T CD4⁺ en la inducción de las respuestas de CTL por los arqueosomas, se inmunizaron ratones C57BL/6J de control normales y ratones C57BL/6J deficientes en células T CD4⁺ una vez (s.c.) con 15 μ g de OVA encapsulada en arqueosomas de *M. smithii*. Las células de bazo reunidas (n=2/grupo) obtenidas a partir de los dos grupos de ratones inmunizados 14 y 30 días después de la inmunización se estimularon con células EG.7 durante 5 días *in vitro*, y se evaluó la actividad de CTL sobre dianas marcadas con ⁵¹Cr. Se indica el % de lisis específica $\pm$ SD de cultivos por triplicado. Los datos de la Figura 9A y 9B demuestran que después de la inmunización con OVA-arqueosomas, los ratones deficientes en células T CD4⁺ (CD4^{-/-}) indujeron una actividad de CTL con especificidad de antígeno comparable a la de los ratones de control normales. La actividad de CTL en ausencia de ayuda de células T CD4⁺ fue evidente incluso 30 días después de la inmunización (Figura 9B).

Varios estudios indican que las respuestas de células T CD8⁺ a menudo requieren ayuda de las células T CD4⁺ para una estimulación e inmunidad de larga duración eficaces (Kalams y Walker, 1998). Las células T CD4⁺ impidieron la rápida reducción de células T CD8⁺ después de una respuesta transitoria al antígeno (Kirberg *et al.*, 1993). Las respuestas de células T CD8⁺ protectoras a la infección crónica por LCMV requirieron la ayuda de células T CD4⁺ (Matloubian *et al.*, 1994). También se ha demostrado que adyuvantes compuestos de antígenos virales en forma de partículas (partículas semejantes a virus) requieren la ayuda de células T CD4⁺ para inducir respuestas de células T CD8⁺ al antígeno exógeno (Wild *et al.*, 1999). Las respuestas de CTL resultantes del cebado cruzado, como después de la vacunación con ADN, también dependen de la ayuda de las células T CD4⁺ (Maecker *et al.*, 1998). De forma importante, y a diferencia de otras observaciones anteriores, los arqueosomas evitaban de forma eficaz la ayuda de las células T CD4⁺ para la inducción de respuestas CTL fuertes al antígeno atrapado, incluso aunque se usara una sola inmunización con dosis relativamente bajas (15 μ g) del antígeno. De esta manera, los arqueosomas pueden ser eficaces incluso en vacunas para individuos inmunocomprometidos tales como pacientes con SIDA.

Los arqueosomas inducen respuestas de CTL a largo plazo y memoria

Para determinar la longevidad de la respuesta de CTL inducida, se inmunizaron ratones C57BL/6 (s.c., los días 0 y 21) con 25 μ g de OVA encapsulada en arqueosomas de *M. smithii*. Se terminaron ratones representativos (n=3 por punto de tiempo) a intervalos regulares, las células de bazo se reestimularon con células EG.7 durante 5 días, y la actividad de CTL se evaluó en dianas EL-4 y EG.7 marcadas con ⁵¹Cr. Los datos se representan como unidades líticas $\pm$ SD de células de bazo de ratones individuales. La destrucción de las dianas EL-4 fue < 5% incluso a una relación de efector:diana de 100:1 para todos los puntos de tiempo ensayados. Los resultados (Figura 10) demuestran que los OVA-arqueosomas inducen una fuerte respuesta de CTL de rellamada (memoria) que aumenta espectacularmente a lo largo de un periodo de tiempo y es máxima incluso 150 días después de la primera inmunización. Se obtuvieron tendencias similares cuando los datos se expresaron como unidades líticas por bazo entero (datos no mostrados). De

esta manera, la administración de antígenos solubles atrapados en arqueosomas no solo induce una respuesta de CTL a corto plazo, sino que también induce una potente memoria de células T CD8⁺.

Las células T de memoria se caracterizan por la alta expresión de moléculas en la superficie celular tales como CD44, y normalmente responden más a la exposición al antígeno. Para establecer el desarrollo y la activación de células de memoria, se expusieron ratones inmunizados con OVA-arqueosoma de *M. smithii* representativos (n=2) de los experimentos descritos en la Figura 10 y ratones de control vírgenes (n=2) por inyección de OVA₂₅₇₋₂₆₄, macrófagos IC21 sometidos a pulsos de epítipo de CTL (10 x 10⁸ células, administradas i.p.) el día 140. Cinco días después, las células de bazo se analizaron con respecto a la expresión de CD44, LFA-1 (CD11a) y CD28 por citometría de flujo. Se indica la expresión de los marcadores de la superficie celular para las poblaciones de células T CD8⁺ esplénicas seleccionadas como ventana de análisis, de ratones de control (vírgenes) y ratones inmunizados con OVA-arqueosoma de *M. smithii* (Figura 11). Se analizaron los datos de 25.000 acontecimientos. Los números dentro de cada panel indican el porcentaje de células T CD8⁺ que se tiñen para cada marcador. En comparación con los controles vírgenes (panel superior, Figura 11), se observó una regulación positiva espectacular (~3 veces) de CD44 en el caso de ratones inmunizados con OVA-arqueosoma (panel inferior, Figura 11). Esta inducción de expresión de CD44 en ratones inmunizados con OVA-arqueosoma era con especificidad de antígeno, ya que el refuerzo con células IC21 sin el péptido no aumentaba la expresión (datos no mostrados). Como las células CD44^{alto} están asociadas clásicamente con el fenotipo de memoria (Dutton *et al.*, 1998), la fuerte regulación positiva de CD44 observada incluso 140 días después de la inmunización usando una dosis de antígeno relativamente baja (25 µg/inyección), indica el establecimiento de una potente respuesta de memoria. La modulación de otras moléculas de la superficie celular tales como LFA1 y CD28 también sugiere una activación eficaz y capacidad de respuesta de las células T CD8⁺ de memoria a la exposición al antígeno.

Los arqueosomas activan APC

Se incubaron macrófagos de J774A.1 (10⁵/ml) durante 24 h con arqueosomas de *M. smithii* (25 µg/ml de lípido), liposomas convencionales (25 µg/ml de lípido), o LPS (10 µg/ml de lípido) para la evaluar la activación *in vitro* de APC. Después, las células se lavaron, se recuperaron y se tiñeron doblemente con Mac 1α-PE y otro marcador de activación de la superficie celular marcado con FITC cuando se indica, y se analizaron por citometría de flujo (Figura 12). Se analizaron los datos de 20.000 acontecimientos. La línea de trazos indica la tinción positiva para cada marcador de activación. Los números dentro de cada panel indican el porcentaje de células Mac 1α⁺ que se tiñen para cada marcador en los diversos grupos de tratamiento. Las células J774A.1 no activadas mostraron constitutivamente una expresión moderada de marcador co-estimulador CD86 (B7.2) y una fuerte expresión de moléculas del MHC clase I, pero no expresaron MHC de clase II ni CD80 (B7.1). La exposición de células J774A.1 a arqueosomas condujo a una fuerte regulación positiva de CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) y moléculas del MHC de clase II. Los niveles de expresión de diversos marcadores después del tratamiento por arqueosomas a menudo fueron similares a los obtenidos por el tratamiento de las células con LPS, un activador conocido de macrófagos. Por el contrario, las células J774A.1 expuestas a una cantidad comparable de liposomas convencionales expresaron niveles de marcador de activación coestimuladores y moléculas del MHC de clase II similares a los macrófagos de control negativo no activados (Figura 12).

Se obtuvo una inmunomodulación similar a la medida con células J774A.1 cuando se expusieron células dendríticas (DC) derivadas de médula ósea a arqueosomas. Se cultivaron células dendríticas derivadas de médula ósea (10⁵/ml) durante 24 h en ausencia (sin activación) o en presencia de arqueosomas de *M. smithii* (25 µg de lípido/ml). Después, las células se lavaron, se recuperaron y se tiñeron individualmente con Ia^d anti-ratón (MHC de clase II), B7.1, B7.2 o anticuerpos apropiados con especificidad de isotipo, y se analizaron por citometría de flujo. Los perfiles de datos se obtuvieron después del análisis de 20.000 acontecimientos. Los perfiles de la Figura 13A indican la tinción de DC de médula ósea no activadas, y la Figura 13B de las DC tratadas con arqueosomas, para los marcadores indicados. El perfil mostrado como una línea de trazos indica la tinción negativa (con el anticuerpo con especificidad de isotipo), y la línea continua perfila la tinción positiva (con el anticuerpo específico). Los porcentajes de cada panel indican el número de células que se tiñen fuertemente para cada marcador en los grupos. Se observa que las DC no activadas expresan fuertemente moléculas del MHC de clase II. Sin embargo, la incubación de estas DC con arqueosomas condujo a una regulación positiva adicional de la expresión del MHC de clase II. Además, también hubo una fuerte regulación positiva de la expresión de B7.2 después del tratamiento con arqueosomas. De esta manera, los arqueosomas indujeron una regulación positiva rápida y potente del MHC de clase II y moléculas coestimuladores sobre APC.

A continuación se demuestra que arqueosomas inyectados en las cavidades peritoneales de ratones activan APC *in vivo*. Se inyectó (i.p) en ratones BALB/c (n=3) 1 mg de arqueosomas de *M. smithii* (en un volumen final de 200 µl de PBS), o 200 µl de PBS (control con PBS). Las células peritoneales se recuperaron 5 días después y se tiñeron con anticuerpo Ia^d marcado con FITC anti-ratón (MHC de clase II), y se analizaron por citometría de flujo. La tinción del MHC de clase II (como un marcador de activación representativo) de células de exudado peritoneal deducida a partir de 20.000 acontecimientos se indica por los perfiles de la Figura 14. Los resultados destacan la fuerte regulación positiva de la expresión del MHC de clase II en células obtenidas a partir de ratones tratados con arqueosomas (perfil de expresión de línea continua) en comparación con células de los controles de PBS (perfil de expresión de línea de trazos).

Las células presentadoras de antígeno activadas a menudo presentan una mayor capacidad de secretar citoquinas inflamatorias, particularmente factor de necrosis tumoral (TNF)-α. Por lo tanto, se ensayó si el tratamiento de APC

con arqueosomas también conducía a una mayor secreción de TNF. Se incubaron células J774A.1 (Figura 15A) o DC de médula ósea (Figura 15B) *in vitro* con concentraciones variables de liposomas convencionales (Liposomas Con.) o arqueosomas de *M. smithii* durante 48 h, y el TNF producido en el sobrenadante se determinó como se describe en Materiales y Métodos. La producción de TNF se indica como media $\pm$ SD de cultivos por triplicado. La sensibilidad del ensayo de TNF fue $<0,1$ pg/ml. Los macrófagos (células J774A.1) o células dendríticas que se habían incubado con arqueosomas de *M. smithii* produjeron cantidades sustanciales de TNF, mientras que los liposomas convencionales no pudieron inducir aumentos significativos en la producción de TNF (Figura 15A y 15B).

Los arqueosomas facilitan el reclutamiento de células positivas para Mac 1 α in vivo

Para descifrar los efectos de los arqueosomas sobre poblaciones de células *in vivo*, se analizó el reclutamiento de poblaciones de APC en el peritoneo de ratones después de la inyección i.p. de arqueosomas vacíos. En ratones BALB/c (n=2) se inyectó (i.p.) 1 mg/200 μ l de arqueosomas de *M. smithii* o 200 μ l de PBS. 4 y 14 días después de la inyección, se recuperaron células por lavado peritoneal y se analizaron con respecto a la expresión de Mac 1 α . Los datos representativos de la Figura 16 demuestran el perfil de expresión de Mac 1 α de células de exudado peritoneal de ratones de control (tratados con PBS) y tratados con arqueosomas. Los datos se deducen a partir de 20.000 acontecimientos para cada muestra. Pueden identificarse tres poblaciones distintas basándose en la tinción de Mac 1 α : Mac 1 α^{-} , Mac 1 α^{bajo} y Mac 1 α^{alto} , particularmente en los ratones tratados con arqueosomas. El porcentaje de estas tres poblaciones en el peritoneo en diversos puntos de tiempo después de la inyección de arqueosomas también se indica en la Figura 16. Es evidente que en los ratones de control, la población de células primarias es Mac 1 α^{-} . Los ratones de control con PBS presentaron perfiles celulares similares todos los días después de la inyección. Por el contrario, los ratones tratados con arqueosomas muestran una reducción en las células Mac 1 α^{-} ya en el día 2 (no mostrado) y 4, y un aumento concomitante en las células Mac 1 α^{+} . El día 14 después del tratamiento con arqueosomas, las células Mac 1 α^{alto} se convierten en la población predominante, representado $>60\%$ de las células en el peritoneo. Como la expresión de Mac 1 α se observa principalmente en células de linaje monocítico (incluyendo macrófagos y células dendríticas), estos resultados demuestran que los arqueosomas facilitan el reclutamiento sostenido de estas poblaciones de células en el sitio de inyección.

Para caracterizar adicionalmente la población de células Mac 1 α^{alto} que se reclutó y activó por los arqueosomas *in vivo*, en ratones BALB/c se inyectó i.p. 1 mg de arqueosomas de *M. smithii* en 200 μ l de PBS. El día 5, se analizaron las células de exudado peritoneal con respecto a la expresión de Mac 1 α (Figura 17A). Basándose en la expresión de Mac 1 α , como se indica en la figura, las células se clasificaron en poblaciones de Mac 1 α^{bajo} y Mac 1 α^{alto} (Figura 17B). La pureza de las poblaciones clasificadas se representa por los histogramas. Las células clasificadas (2×10^5 /ml) se cultivaron *in vitro* durante 48 h con GM-CSF (5 ng/ml). Después las células cultivadas se recuperaron, se lavaron y se analizaron con respecto a la expresión de F4/80, CD11c y B220 (Figura 17C). Todos los histogramas se deducen del análisis de 20.000 acontecimientos.

De forma interesante, las células Mac 1 α^{alto} dieron lugar a dos poblaciones que expresaban F4/80 o CD11c (Figura 17C, panel derecho). Como la fuerte expresión de F4/80 está asociada con macrófagos activados y la expresión de CD11c con células dendríticas maduras (Pulendran *et al.*, 1997), está claro que las células Mac 1 α^{alto} reclutadas y activadas por los arqueosomas *in vivo* incluían precursores de estas dos potentes poblaciones de APC. Por otra parte, las células Mac 1 α^{bajo} tuvieron una tinción negativa para F4/80, y CD11c, y se descubrió que eran principalmente células B220 $^{+}$ (Figura 17C, panel izquierdo).

Las APC activadas por arqueosomas estimulan células T

En este ejemplo se demuestra que la activación *in vitro* de APC (macrófagos y DC) por arqueosomas se traduce en un aumento de la capacidad funcional de las APC de estimular la proliferación de células T. Se incubaron células J774A.1 de haplotipo H-2K ^{d} o células dendríticas derivadas de médula ósea (10^5 /ml), con liposomas convencionales (25 μ g de lípido/ml), o arqueosomas (*M. smithii*, 25 μ g de lípido/ml) o LPS (10 μ g/ml) durante 24 h y las células posteriormente se lavaron, se recuperaron y se usaron como APC para estimular células T aloespecíficas. Las células T CD8 $^{+}$ aloespecíficas (H-2K ^{b}) purificadas se estimularon con 2×10^4 células J774A.1 (Figura 18A). Como alternativa, se estimularon células T CD4 $^{+}$ aloespecíficas purificadas con 10^4 DC (Figura 18B). 72 h después, las células se sometieron a pulsos con ^3H timidina y la proliferación se evaluó 18 h después por recuento de centelleo de líquidos. Los datos representan la media de cuentas por minuto (CPM) $\pm$ desviación típica de cultivos por triplicado.

Los macrófagos (J774A.1, H-2K ^{d}) expuestos a arqueosomas estimularon fuertemente la proliferación de células T CD8 $^{+}$ aloespecíficas (H-2K ^{b}) purificadas (Figura 18A). Esta proliferación fue comparable a la conseguida con macrófagos activados con LPS. En ausencia de cualquier activación, las APC J774A.1 indujeron solo una modesta proliferación de células T CD8 $^{+}$. De forma similar, las DC derivadas de médula ósea no activadas (H-2K ^{d}) mostraron una baja capacidad de inducir la proliferación de células T CD4 $^{+}$ aloespecíficas (H-2K ^{b}) vírgenes purificadas. Sin embargo, la activación previa de células dendríticas con arqueosomas condujo a una fuerte proliferación de las células T (Figura 18B). Por el contrario, las células dendríticas expuestas a liposomas convencionales no pudieron aumentar la estimulación de células T.

Las APC inducidas in vivo por arqueosomas estimulan fuertemente la proliferación de células T y la producción de citoquinas

Habiendo demostrado la capacidad de los arqueosomas de reclutar y activar APC *in vivo*, se evaluó la capacidad de estas APC de estimular células T. En ratones BALB/c (n=3) se inyectó (i.p.) 1 mg/200 μ l de arqueosomas de *M. smithii* o 200 μ l de PBS y 5 días después se recuperaron las células del exudado peritoneal. Las células (10^4) se lavaron, contaron, irradiaron y usaron como APC para estimular las células T CD8⁺ y CD4⁺ purificadas aloespecíficas (H-2K^b). La proliferación de las células T se controló por la incorporación de ³H timidina a las 72 h (Figura 19A). La producción de IFN- γ en el sobrenadante a las 72 h se evaluó por medio de un ELISA (Figura 19B). Los datos representan media $\pm$ SD de valores de cultivos por triplicado. Las APC peritoneales de ratones tratados con arqueosomas indujeron una fuerte proliferación de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ (Figura 19A). Además, las células T estimuladas con APC activadas con arqueosomas produjeron una cantidad sustancial de IFN- γ (Figura 19B). Por el contrario, las células del exudado peritoneal de ratones de control (tratados con PBS solo) no pudieron inducir la proliferación de células T o la producción de citoquinas.

Vacuna protectora para Listeria monocytogenes

La inmunidad contra patógenos intracelulares depende de la generación y acciones posteriores de células T CD8⁺ con especificidad de patógeno. Estos linfocitos se generan de la mejor manera por exposición previa a una dosis subletal del patógeno vivo o por vacunación con una versión atenuada viva del patógeno (Zhan y Cheers, 1998). Esta invención contribuye a un objetivo importante de la vacunología moderna; particularmente reemplazar la necesidad de organismos vivos con vacunas acelulares definidas que generan una inmunidad protectora contra patógenos intracelulares. Una clave para realizar estas vacunas parece ser desarrollar estrategias de administración de antígenos que emulen los medios por medio de los cuales los antígenos expresados en organismos mismos se exponen al sistema inmune del hospedador.

Listeria monocytogenes es un patógeno intracelular prototípico y la infección sistémica en ratones con este organismo se ha usado durante cuatro décadas como modelo para estudiar la inmunidad mediada por células. *L. monocytogenes* puede parasitar células epiteliales, fagocitos especializados y células parenquimáticas. Los anticuerpos no producen absolutamente ninguna defensa contra este patógeno. Generalmente se está de acuerdo en que la inmunidad protectora contra la listeriosis murina está mediada casi totalmente por células T CD8⁺ en lugar de células T CD4⁺ (North y Conlan, 1998). Lo más probable es que la función precisa de las células T CD8⁺ implique la activación de los macrófagos, así como la citólisis de las células infectadas. Para examinar la inmunidad protectora mediada por células T CD8⁺, la utilidad de este modelo de infección está fuera de dudas.

Por lo tanto, se examinó la capacidad de vacunas basadas en arqueosomas de inducir una inmunidad protectora contra este patógeno, como ejemplo ilustrativo de vacunaciones protectoras contra los patógenos intracelulares en general. Se ha demostrado que un péptido nonamérico de la hemolisina de *L. monocytogenes*, listeriolisina, es un epítipo específico de células T CD8⁺ restringidas al MHC de Clase I muy inmunodominante para ratones BABL/c (Vijh y Pamer, 1997). Se han preparado dos péptidos bipalmitoilados que contienen la secuencia de aminoácidos nonamérica inmunodominante mencionada anteriormente para encapsular en arqueosomas y determinar la eficacia de estas vacunas en un modelo de infección murino.

La vacunación con arqueosoma-péptido induce la respuesta de células T CD8⁺ con especificidad de antígeno

Se vacunaron ratones BALB/c dos veces (s.c.), separando las vacunaciones por 28 días, con el lipopéptido 20-mérico libre (desnudo) (27 μ g) o con el lipopéptido 20-mérico (27 μ g) encapsulado en arqueosomas de *M. smithii* (1 mg de lípido). Tres semanas después de la segunda inmunización, se tomaron 2 ratones del grupo de control virgen y de los dos grupos vacunados para el análisis inmunológico.

En un experimento, se estimularon esplenocitos de cada grupo de ratones *in vitro* durante 72 h con las cantidades indicadas del péptido nonamérico de listeriolisina específico y se evaluó la inducción con especificidad de antígeno de la secreción de IFN- γ ($\pm$ SD para cultivos por triplicado) en el sobrenadante de las células (Figura 20A). Los esplenocitos de ratones vacunados con péptido encapsulado en arqueosomas de *M. smithii*, pero no los de ratones de control vírgenes (no vacunados), o ratones vacunados con el lipopéptido 20-mérico, respondieron a la exposición al péptido nonamérico de listeriolisina como se observa por la secreción de cantidades sustanciales de IFN- γ . Esto indicó que el lipopéptido encapsulado en arqueosomas es capaz de potenciar una respuesta de células T CD8⁺ con especificidad de antígeno.

En un experimento paralelo, se estimularon cultivos masivos de los esplenocitos durante 5 días por co-incubación con células Phem 3.3 irradiadas (derivadas de células P815 transfectadas con el gen para la listeriolisina). Las células T efectoras generadas de esta manera se ensayaron con respecto a la citotoxicidad específica contra células P815 o Phem 3.3 marcadas con ⁵¹Cr usando un ensayo de liberación de cromo convencional (Figura 20B). Se muestra el % de lisis específica $\pm$ SD para cultivos por triplicado, usando un intervalo de relaciones entre efector y diana (E:T). Los esplenocitos de ratones vacunados con lipopéptido atrapado en arqueosomas destruyeron las células Phem 3.3 transfectadas pero no las células P815 parentales que no expresaban el péptido. A diferencia de esto, los esplenocitos de ratones vírgenes o ratones inmunizados con el péptido libre (no encapsulado), no pudieron inducir una respuesta de CTL medible a juzgar por su incapacidad de lisar las células Phem 3.3.

Basándose en los resultados anteriores, se evaluó la eficacia de arqueosomas que contenían lipopéptido encapsulado para conferir protección contra la exposición al patógeno (Tabla 2). Los ratones BABL/c vacunados con lipopéptido encapsulado en arqueosomas tuvieron niveles de 8 a 38 veces menores de *Listeria* en sus hígados y de al menos 380 a 2042 veces menores de *Listeria* en sus bazo que los que se encontraron en los órganos correspondientes en cualquiera de los grupos de control, que incluían ratones no vacunados (ratones vírgenes), ratones vacunados con el lipopéptido solo o el arqueosoma solo, y ratones inmunizados con arqueosomas vacíos preformados mezclados con el lipopéptido. Una reducción de 1 log₁₀ en las CFU representa una reducción del 90% de la carga de patógeno y la diferencia entre una reducción de 1 log₁₀ y 3 log₁₀ en la carga bacteriana sólo representa la diferencia entre una reducción del 90% y del 99,9% en números de bacterias. Considerando esto, probablemente hay poca diferencia biológicamente significativa entre la inmunidad expresada en el hígado y el bazo. La inmunidad inducida por la vacunación con el lipopéptido encapsulado en arqueosomas era específica de antígeno, porque los ratones inmunizados con lipopéptido-arqueosoma, según se descubrió, no eran más resistentes que los ratones de control no vacunados a una exposición intravenosa con la bacteria intracelular facultativa heteróloga, *Salmonella typhimurium*. Por lo tanto, no hay una potenciación prolongada no específica de la resistencia antibacteriana después de la inyección de antígeno de listeria atrapado en arqueosomas.

Usando el modelo murino de listeriosis sistémica, se ha demostrado el potencial de los arqueosomas como vehículos inmunomoduladores presentadores de antígeno para vacunas de subunidad capaces de inducir una inmunidad protectora mediada por células. No se requiere ningún aumento de la preparación aparte de la encapsulación del antígeno. Por el contrario, otros investigadores han notificado que los liposomas convencionales requieren una captura conjunta del inmunoestimulador Quil-A con el antígeno peptídico de listeriolisina para inducir protección (Lipford *et al.*, 1994a). Normalmente, puede generarse inmunidad anti-*Listeria* en ratones después de la exposición a una infección subletal con *L. monocytogenes* virulento o mutantes productores de listeriolisina con virulencia atenuada. Por el contrario, la vacunación de ratones con bacterias negativas para listeriolisina viables o bacterias virulentas inactivadas, o proteínas derivadas de *Listeria* no puede generar esta inmunidad protectora (Barry *et al.*, 1992; Zhan y Cheers, 1998). Recientemente, otros investigadores han notificado éxito en la generación de inmunidad protectora por vacunación de ratones con *L. monocytogenes* inactivada mezclada con la citoquina interleuquina-12 (Miller *et al.*, 1996). Sin embargo, casi toda esta protección parece deberse a la activación no específica del sistema inmune por la IL-12 exógena, y como tal indudablemente tendrá corta duración. Además, se sabe que la IL-12 es muy tóxica para el hospedador. La vacunación de ratones con el antígeno peptídico de listeriolisina o con listeriolisina entera, cuando se incorpora en vectores bacterianos y virales vivos, genera inmunidad protectora contra la exposición con *Listeria monocytogenes* virulenta (Ann *et al.*, 1996; Gentshev y col, 1996; Sirard *et al.*, 1997), pero esto tiene los inconvenientes de las vacunas vivas mencionados anteriormente. El antígeno peptídico de listeriolisina fusionado con la toxina del ántrax como molécula de vehículo también actúa como vacuna anti-*Listeria* (Ballard *et al.*, 1996). Sin embargo, un inconveniente principal de esta estrategia es que el vehículo de la vacuna es inmunogénico por sí mismo. Esto reduce su utilidad, ya que no puede usarse repetidamente. Los resultados de la presente invención son nuevos y contrarios a la técnica anterior ya que los arqueosomas actúan como vehículos inmunomoduladores para antígenos peptídicos no replicativos, sin necesidad de inmunoestimuladores adicionales tales como Quil A o IL-12, o la necesidad de usar vehículos de replicación viables para el antígeno.

Persistencia de inmunidad anti-*Listeria*

Anteriormente se mostraron datos para confirmar la longevidad y memoria de las respuestas inmunológicas generadas en animales contra antígenos administrados con arqueosomas. A continuación se evaluó la persistencia de la inmunidad anti-*Listeria* en ratones que se vacunaron con el lipopéptido encapsulado en arqueosomas de *M. smithii* exponiendo los ratones vacunados a *L. monocytogenes* hasta 10 meses después de la primera vacunación (Tabla 3). El nivel de inmunidad protectora observado después de 1 mes desde la vacunación (Tabla 2) persistió al menos durante 10 meses después de la vacunación. Las vacunas anti-*Listeria* basadas en arqueosomas usadas en este experimento parecen inducir una inmunidad protectora de mayor duración y superior que la vacuna de fusión basada en toxina del ántrax (Ballard *et al.*, 1996), la vacuna vaccinia recombinante (Ann *et al.*, 1996), y las vacunas basadas en ADN desnudo (Cornell *et al.*, 1999). Ninguna de las otras estrategias de vacunación (Lipford *et al.*, 1994a; Ann *et al.*, 1996; Ballard *et al.*, 1996) demostró la capacidad de inducir la inmunidad expresada rápidamente que claramente puede inducirse por las vacunas basadas en arqueosomas.

Cinética de expresión de inmunidad anti-*Listeria*

A continuación se examinó la cinética de la aparición de una mayor resistencia anti-*Listeria* en ratones inmunizados (Figura 31A y Figura 21B). Se vacunaron grupos de ratones BALB/c (volumen de inyección 100 µl) los días 0, 21 y 42 con 12,5 µg del antígeno lipopeptídico 20-mérico en PBS solo (●), o encapsulado en 0,5 mg de arqueosomas de *M. smithii* (○). Seis semanas después de la última vacunación, los ratones se expusieron a un inóculo intravenoso de 3,18 x 10³ CFU de *L. monocytogenes*. Las cargas bacterianas se determinaron en los hígados (Figura 21A), y bazo (Figura 21B) de los dos grupos de ratones 1, 2, y 3 días después de la exposición. Los ratones vacunados con antígeno atrapados en arqueosomas de *M. smithii* expresaron inmunidad anti-*Listeria* en los bazo 24 h después de la infección, y en los hígados después de 48 h de infección.

Inicio rápido de inmunidad después de la vacunación con antígeno atrapado en diversos arqueosomas

Para evaluar el momento de inicio de resistencia anti-*Listeria* después de la inmunización, se vacunaron una vez ratones con lipopéptido 20-mérico derivado de listeriolisina atrapado en arqueosomas preparados a partir de *M. smithii* o *H. salinarum*, y se expusieron a *L. monocytogenes* 7 días después. Las cargas bacterianas en el bazo y en el hígado se determinaron el día 3 de la infección. Los resultados de la Tabla 4 demuestran que se expresó una resistencia anti-*Listeria* sustancial en los dos órganos de ratones vacunados con cualquier formulación de lipopéptido-arqueosoma. Este resistencia fue específica (no inmunidad innata), porque estaba ausente en ratones vacunados con arqueosomas vacíos.

El antígeno lipopeptídico 20-mérico, administrado en arqueosomas preparados a partir de los lípidos polares totales de halófilos extremos (*H. salinarum*, *N. magadii*), un termoacidófilo (*T. acidophilum*), o el metanógeno *M. smithii*, induce una inmunidad protectora temprana superior a la inducida por el mismo antígeno atrapado en liposomas de fosfolípido de éster convencionales (Tabla 5). Esta inmunidad parecía ser específica de antígeno porque los ratones vacunados con el antígeno atrapado en arqueosomas preparados a partir de *H. salinarum* no eran más resistentes que los ratones de control a una exposición con *S. typhimurium*. Además, en un estudio complementario (Tabla 6), se descubrió que la inmunidad temprana expresada después de la vacunación con antígeno atrapado en arqueosomas de *T. acidophilum* tenía restricción de haplotipo y especificidad de patógeno.

Cuando se expusieron grupos de ratones BALB/c inmunizados una vez, como en la Tabla 5, un mes después de la vacunación, todas las formulaciones de arqueosoma presentaron niveles similares de inmunidad protectora (Tabla 7).

En otro ejemplo, grupos de ratones vacunados dos veces se expusieron 1 mes después con una dosis 10 veces mayor de *L. monocytogenes*. La protección en el bazo inducida por la vacunación con el antígeno atrapado en arqueosomas de *M. smithii* y *T. acidophilum* fue superior a la inducida por el antígeno encapsulado en arqueosomas de *H. salinarum*, o liposomas convencionales. Sin embargo, en el hígado, la inmunización con cualquiera de los tres tipos de arqueosomas produjo menos CFU en comparación con las inmunizaciones con liposomas convencionales (Tabla 8).

Dosis de antígeno y arqueosoma necesaria para conferir una protección rápida en el modelo de L. monocytogenes

Para estos estudios se atrapó el lipopéptido 13-mérico en arqueosomas de *L. acidophilum*. Se inmunizaron ratones con la vacuna que se diluyó en serie antes de la inyección, manteniendo de esta manera una relación constante entre antígeno y lípido. Una semana después se evaluó la protección exponiendo los animales al patógeno vivo. Los datos revelan que se produjo una rápida protección después de una sola inmunización a todas las dosis de la vacuna de arqueosoma de *T. acidophilum*, que variaba de 23 µg de lipopéptido en 500 µg de arqueosomas a una cantidad tan pequeña de 0,5 µg de lipopéptido en 10 µg de arqueosomas (Tabla 9).

Vacuna de Francisella tularensis

Francisella tularensis es un patógeno intracelular facultativo Gram negativo. Es el agente etiológico de la tularemia, una enfermedad severa y a menudo fatal de seres humanos y otros mamíferos. Como *F. tularensis* es un patógeno intracelular que puede residir tanto en los macrófagos como en las células parenquimáticas, se cree que se necesita una inmunidad mediada por células en lugar de humoral para combatirla. Clínicamente esto se confirma por el descubrimiento de que la inmunización del personal de laboratorio con una vacuna viva atenuada experimental, pero no con una vacuna de células enteras inactivadas, imparte inmunidad protectora. Ciertos estudios exhaustivos que usan modelos murinos de tularemia han demostrado convincentemente que la inmunidad mediada por células T específica es clave para la resolución eficaz de infecciones de *F. tularensis* tanto primarias como secundaria (Conlan *et al.*, 1994).

Por lo tanto, se usó la tularemia como otro modelo de parasitismo intracelular para ensayar la capacidad de los arqueosomas de actuar como vehículos inmunomoduladores para vacunas sin replicación contra patógenos intracelulares. El antígeno usado era una preparación de membrana externa aislada a partir de *F. tularensis*. Las membranas externas aisladas se caracterizaron con respecto al tamaño usando un clasificador de partículas por tamaños, y eran vesículas de 65 ± 67 nm de diámetro. Para evaluar si se había obtenido un producto de fusión entre las membranas externas y los arqueosomas, se mezclaron por separado muestras de membranas externas, arqueosomas de *M. smithii* y el supuesto producto de fusión entre las membranas externas y arqueosomas de *M. smithii* con un volumen de Percoll® (Pharmacia Fine Chemicals) y dos volúmenes de PBS. Después, las muestras se centrifugaron a 7.700 x g durante 1,5 h. Los arqueosomas vacíos (sin membranas externas) formaron una banda cerca de la superficie del gradiente, mientras que las membranas externas formaron una sola banda discreta varios centímetros dentro del gradiente. La evidencia de un producto de fusión apareció como la desaparición de las bandas de membrana externa y arqueosoma, y la formación de una nueva banda de densidad media.

Los ratones inmunizados dos veces con el producto de fusión mencionado anteriormente mostraron protección contra una exposición de aerosol con el patógeno virulento (Tabla 10). En algunos casos los tejidos eran estériles, a pesar de la pequeña dosis de antígeno administrada.

Protección contra el desarrollo tumoral en ratones pre-inmunizados con arqueosoma-antígeno

EG.7 es una línea de células de linfoma de células T que se ha transfectado con el gen que codifica OVA, y se sabe que induce tumores sólidos en ratones. Se inmunizaron grupos de ratones C57BL/6 s.c. los días 0 y 21 con arqueosomas vacíos (260 μg de arqueosomas de *T. acidophilum* o 312 μg de arqueosomas de *M. smithii*), o con 15 μg de OVA en PBS, o con 15 μg de OVA encapsulada en las cantidades respectivas de arqueosomas anteriores. Otro grupo de ratones se inmunizó con 25 μg de OVA encapsulada en 1 mg de arqueosomas de *H. salinarum*. Los ratones vírgenes (de control) no recibieron inmunizaciones. Todos los ratones se expusieron 8 semanas después de la primera inyección a 10×10^6 células tumorales EG.7, y se midió el tamaño del tumor como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Todos los ratones del grupo virgen (Figura 22A), el grupo inmunizado con OVA sola (Figura 22B) y el grupo inmunizado con arqueosomas vacíos (Figura 22D y F) desarrollaron tumores. Sin embargo, se produjo una extraordinaria protección contra el crecimiento y el desarrollo tumoral en ratones pre-inmunizados con antígeno atrapado en arqueosomas de *H. salinarum* (Figura 22C), *T. acidophilum* (Figura 22E), o *M. smithii* (Figura 22G). La progresión del tamaño tumoral en cada ratón se representa frente al tiempo en las Figuras 22A-22G.

El efecto protector de la inmunización con arqueosoma-antígeno también fue evidente en otro modelo de potente tumor metastático. B16-OVA es una línea celular de melanoma de origen H-2^b que se ha transfectado con el gen que codifica OVA, y se sabe que induce focos de tumores metastásicos en los pulmones 14 días después de la exposición al tumor. El experimento se realizó como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos. Ratones vírgenes en los que se inyectaron estas células tumorales por vía intravenosa desarrollaron más de 100 focos metastásicos negros en los pulmones 14 días de la exposición al tumor. Por el contrario, dos de los tres ratones inmunizadores con OVA-arqueosomas de *M. smithii* tuvieron focos pulmonares reducidos espectacularmente (8 y 20, respectivamente) y sólo uno presentó un número de focos comparable a los ratones de control vírgenes, después de la exposición tumoral.

Efecto terapéutico de arqueosomas contra tumores

El efecto terapéutico de arqueosomas vacíos y de arqueosomas que contienen antígeno encapsulado sobre el crecimiento de tumores, se evaluó como se indica a continuación. Primero se inyectaron en ratones C57BL/6 (s.c.) 10×10^6 células tumorales EG.7, seguido de la inmunización en los días 0 y 10 con nada (vírgenes) o 15 μg de OVA, o 15 μg de OVA encapsulada en 144 μg de arqueosomas de *T. acidophilum* o *M. smithii*, o 144 μg de cualquier tipo de arqueosomas vacíos. Las inyecciones de OVA sola no tuvieron ninguna influencia sobre el crecimiento/progresión tumoral (comparar las Figuras 23A y 23B). La inyección de arqueosomas vacíos de *T. acidophilum* produjo una regresión completa (eliminación) de los tumores en 2 de 5 ratones (Figura 23C), y mostró una regresión tumoral completa similar (2/5 ratones) e impidió la formación de tumores grandes en el resto cuando el antígeno OVA se encapsuló en el arqueosoma respectivo (Figura 22D). Los arqueosomas vacíos de *M. smithii* tuvieron un efecto terapéutico especialmente fuerte, ocasionando la regresión de los tumores en 5 de 5 ratones (Figura 23E).

Bibliografía

1. Ann, L.L., Pamer, E., and Whitton, J.L. (1996) A recombinant minigene vaccine containing a nonameric cytotoxic T-lymphocyte epitope confers limited protection against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 64: 1685-1693.
2. Ballard, J.D., Collier, R.J., and Starnbach, M.N. (1996) Anthrax toxin-mediated delivery of a cytotoxic T-cell epitope *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 12531-12534.
3. Barbier, J.-R., Neugebauer, W., Morley, P., Ross, V., Soska, M., Whitfield, J.F., and Willick, G. (1997) Bioactivities and secondary structures of constrained analogues of human parathyroid hormone: Cyclic lactams of the receptor binding region. *J. Med. Chem.* 40: 1373-1380.
4. Barry, R.A., Bouwer, H.G., Portnoy, D.A., and Hinrichs, D.J. (1992) Pathogenicity and immunogenicity of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 60: 1625-1632.
5. Bowersock, T.L., and Martin, S. (1999) Vaccine delivery to animals. *Advanced Drug Delivery Rev.* 38: 167-194.
6. Cherwinski, H.M., Schumacher J.H., Brown, K.D., and Mosmann, T.R. (1987) Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 166: 1229-1244.
7. Choquet, C.G., Patel, G.B., Beveridge, T.J., and G.D. Sprott. (1994) Stability of pressure-extruded liposomes made from archaeobacterial ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 375-384.
8. Conlan, J.W. (1997) Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections in mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 65: 630-635.

9. **Conlan, J.W., Sjostedt, A., and North, R.J. (1994)** CD4+ and CD8+ T-cell-dependent and-independent host defense mechanisms can operate to control and resolve primary and secondary *Francisella tularensis* LVS infection in mice. *Infect. Immun.* 62: 5603-5607.
- 5 10. **Cornell, K.A., Bouwer, H.G.A., Hinrichs, D.J., and Barry, R.A. (1999)** Genetic immunization of mice against *Listeria monocytogenes* using plasmid DNA encoding listeriolysin O. *J. Immunol.* 163: 322-329.
11. **Dutton, R.W., Bradley, L.M., and Swain, S.L. (1998)** T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 201-223.
- 10 12. **Fukasawa, M., Shimizu, Y., Shikata, K., Nakata, M., Sakakibara, R., Yamamoto, N., Hatanaka, M., and Mizuochi, T. (1998)** Liposome oligomannose-coated with neoglycolipid, a new candidate for a safe adjuvant for induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *FEBS Letters*, 441: 353-356.
- 15 13. **Gentshev, I., Mollenkopf, H., Sokolovic, Z., Hess, J., Kaufmann, S.H., and Goebel, W. (1996)** Development of antigen-delivery systems based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. *Gene* 179: 133-140.
- 20 14. **Gupta, R.K., Rost, B.E., Reyveld, E., and Siber, G.S. (1995)** Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. In: M.F. Powell and M.J. Newman, (ed.), Vaccine design, the subunit and adjuvant approach, p. 229-248. *Plenum Press*, New York.
- 25 15. **Harokopakis, E., Hajishengallis, G., and Michalek, S.M. (1998)** Effectiveness of liposomes possessing surface-linked recombinant B subunit of cholera toxin as an oral antigen delivery system. *Infect. Immun.* 66: 4299-4304.
16. **Henkart, P.A. (1997)** CTL effector functions. *Semin. Immunol.* 9: 85-86.
- 30 17. **Kalams, S.A., and Walker, B.D. (1998)** The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 188: 2199-2204.
18. **Kates, M. (1992)** Archaeobacterial lipids: structure, biosynthesis and function. *Biochem. Soc. Symp.* 58: 51-72.
- 30 19. **Kates, M., Moldoveanu, N., and Stewart, L.C. (1993)** On the revised structure of the major phospholipid of *Halobacterium salinarum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1169: 46-53.
- 35 20. **Kirberg, J., Bruno, L., and von Boehmer, H. (1993)** CD4+8- help prevents rapid deletion of CD8+ cells after a transient response to antigen. *Eur. J. Immunol.* 23: 1963-1967.
21. **Krishnan, L and Mosmann, T.R. (1998)** Functional subpopulation of CD4+T lymphocytes. p. 7-32. In: I. Kimber and M.K. Selgrade, (ed.), T lymphocyte subpopulations in immunotoxicology. *John Wiley & Sons*, Chichester.
- 40 22. **Leslie, D.L., Cox, J., Lee, M., and Titball, R.W. (1993)** Analysis of a cloned *Francisella tularensis* outer membrane protein gene and expression in attenuated *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 111: 331-336.
- 45 23. **Lipford, G.B., Lehn, N., Bauer, S., Heeg, K., and Wagner, H. (1994a)** The immunodominant peptide from listeriolysin in Quil A liposomes vaccinates CD8+ cytolytic T cells and confers protection to infection. *Immunol. Letts.* 40:101-104.
24. **Lipford, G.B., Wagner, H., and Heeg, K. (1994b)** Vaccination with immunodominant peptides encapsulated in Quil A-containing liposomes induces peptide-specific primary CD8+ cytotoxic T cells. *Vaccine*, 12:73-80.
- 50 25. **Maecker, H.T., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., and Levy, S. (1998)** Cytotoxic T cell responses to DNA vaccination: dependance on antigen presentation via class II MHC. *J. Immunol.* 161: 6532-6536.
- 55 26. **Matloubian, M., Concepcion, R.J., and Ahmed, R. (1994)** CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J. Virol.* 68: 8056-8063.
27. **Miller, M.A., Skeen, M.J., and Ziegler, H.K. (1996)** Protective immunity to *Listeria monocytogenes* by immunization with heat-killed *Listeria* and IL-12. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 797: 207-227.
- 60 28. **Mosmann, T.R., and Fong, T.A. (1989)** Specific assays for cytokine production by T cells. *J. Immunol. Methods* 116: 151-158.
29. **North, R.J., and Conlan, J.W. (1998)** Immunity to *Listeria monocytogenes*. *Chem. Immunol.* 70: 1-20.
39. **Ohara, J., and Paul, W.E. (1985)** Production of a monoclonal antibody to and molecular characterization of B-cell stimulatory factor-1. *Nature*, 315: 333-336.
- 65 30. **Pamer, E.G., Harty, J.T., y Bevan, M.J. (1991)** Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature (Lond.)* 353: 852-855.

31. **Pulendran, B., Lingappa, J., Kennedy, M.K., Smith, J., Teepe, M., Rudensky, A., Maliszewski, C.R., and Mar-askovy, E. (1997)** Development of pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J. Immunol.* 159: 2222-2231.
- 5 32. **Richards, R.L., Rao, M., Wassef, N.M., Glenn, G.M., Rothwell, S.W., and Alving, C.R. (1998)** Liposomes containing lipid A serve as an adjuvant for induction of antibody and cytotoxic T-cell responses against RTS,S malaria antigen. *Infect. Immun.* 66: 2859-2865.
- 10 33. **Rotzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Walden, P., and Rammensee, H. G. (1991)** Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* 21: 2891-2894.
34. **Sad, S., Marcotte, R., and Mosmann, T.R. (1995)** Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 and Th2 cytokines. *Immunity*, 2: 271-279.
- 15 35. **Sirard, J.C., Fayolle, C., de-Chastellier, C., Mock, M., LeClerc, C., and Berche, P. (1997)** Intracytoplasmic delivery of listeriolysin O by a vaccinal strain of *Bacillus anthracis* induces CD8-mediated protection against *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 159: 4435-4443.
- 20 36. **Sjolander, A., Cox, J.C., and Barr, I.G. (1998)** ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J. Leukoc. Biol.* 64: 713-723.
37. **Vijh, S., and Pamer, E.G. (1997)** Immunodominant and subdominant CTL responses to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 158: 3366-3371.
- 25 38. **Wessel, D., and Flugge, U.I. (1984)** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.
39. **White, W.I., Cassatt, O.R., Madsen, J., Burke, S.J., Woods, R.M., Wassef, N.M., Alving, C.R. and Koenig, S. (1995)** Antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses to a single liposome-associated peptide antigen. *Vaccine*, 13: 1111-1122.
- 30 40. **Wild, J., M. Grusby, J., Schirmbeck, R., and Reiman, J. (1999)** Priming MHC-I restricted, cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell-dependent. *J. Immunol.* 163: 1880-1887.
- 35 41. **Williams, N. A., Hirst, T.R., and Nashar, T.O. (1999)** Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol. Today* 20: 95-101.
42. **Zhan, Y., and Cheers, C. (1998)** Control of IL-12 and IFN- γ production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors. *J. Immunol.* 161: 1447-1453.
- 40

TABLA 1

Los arqueosomas preparados a partir de lípidos polares aislados en una forma biológicamente pura a partir de arqueobacterias inducen actividad de CTL

Efector:diana	% de lisis de células diana	
	PGP-O-CH ₃	PG
100:1	32	14
33:1	22	5
11:1	17	5
3.3:1	8	3

Se usó el lípido polar purificado arquetidil glicerolfosfato-O-metilo (PGP-O-CH₃ de *H. salinarum*) o arquetidil glicerol (PG de *N. magadii*) para obtener arqueosomas con ovalbúmina encapsulada. Se inmunizaron ratones BALB/c dos veces (s.c.), separando las administraciones por 3 semanas, con 20 μ g de ovalbúmina atrapada en 0,6-0,8 mg de lípidos. La actividad de las células T citotóxicas (CTL) se midió 3 semanas después de la vacunación final, como % de lisis de las células diana a diversas relaciones de efector:diana (datos de EG.7 menos datos de EL-4 de control).

TABLA 2

Carga de *L. monocytogenes* o *S. typhimurium* en los hígados y bazo de ratones de control y ratones vacunados el día 3 después de la exposición a uno u otro patógeno

Grupo de vacuna ¹	Patógeno de exposición	Log ₁₀ ± SD de CFU de patógeno por órgano ²		
		Hígado	Bazo	
No vacunado	<i>L. monocytogenes</i>	3,90 ± 0,33	5,11 ± 0,22*	±
Lipopéptido encapsulado ³	"	<2,97 (1/5) [†]	<2,09 (4/5) [†]	
Lipopéptido solo ⁴	"	4,04 ± 0,28	4,67 ± 0,59*	±
Arqueosomas solos	"	4,53 ± 0,51*	5,40 ± 0,42*	±
Mezclados	"	4,53 ± 0,37*	4,79 ± 0,24*	±
No vacunado	<i>S. typhimurium</i>	5,27 ± 0,29	4,89 ± 0,27	±
Lipopéptido encapsulado ³	"	5,16 ± 0,19	5,01 ± 0,30	±

¹Se vacunaron (s.c.) ratones (n=4-6 por grupo) los días 0, 21, 42 y se expusieron a bacterias (1,66 x 10³ CFU de *L. monocytogenes*/ratón o 2,42 x 10³ CFU de *S. typhimurium*/ratón, administrados i.v.) 28 días después de la vacunación final; ²las cargas bacterianas (Log₁₀ ± SD de CFU/órgano) se determinaron 3 días después de la exposición; ³12,5 µg de lipopéptido 20-mérico encapsulado en 0,5 mg de arqueosomas de *M. smithii*; ⁴12,5 µg de lipopéptido 20-mérico en PBS; ⁵0,5 mg de arqueosomas de *M. smithii* vacíos; ⁶12,5 µg de lipopéptido 20-mérico mezclados con 0,5 mg de arqueosomas de *M. smithii* preformados; *carga bacteriana significativamente mayor que en los órganos correspondientes de ratones inmunizados con péptido encapsulado (p<0,05 por ensayo de suma de rangos de Mann Whitney); [†] los números entre paréntesis indican la proporción de ratones en el grupo que no tuvieron niveles detectables de CFU/órgano indicado; si no se muestra el paréntesis, los órganos respectivos en todos los ratones del grupo tenían niveles de CFU detectables (es decir, infección); CFU, unidades formadoras de colonias; SD desviación típica.

TABLA 3

La inmunidad contra Listeria persiste en animales vacunados con antígeno encapsulado en arqueosomas

Grupo	Log ₁₀ ± SD de CFU de <i>Listeria</i> /órgano				
	3 meses		5 meses		10 meses
	Hígado	Bazo	Hígado	Bazo	Bazo
No vacunado	4,64 ± 0,66	5,49 ± 0,38	3,93 ± 0,97	4,75 ± 0,67	4,66 ± 0,32
Vacunado [†]	<3,44 (1/5) ^{†*}	<2,17 (4/5) ^{†*}	<2,74 (1/5) ^{†*}	<2,12 (4/5) ^{†*}	<2,00 (1/5)

[†]Se vacunaron ratones (4-5 por grupo) como en la Tabla 2, con antígeno lipopeptídico 20-mérico encapsulado en arqueosomas de *M. smithii*. Después de 3, 5 y 10 meses desde la vacunación final, se expusieron grupos vacunados y no vacunados (control) de ratones a 10³ CFU de *L. monocytogenes*. Las cargas bacterianas se determinaron (Log₁₀ ± SD de CFU de *Listeria*/órgano) 3 días después de la exposición.

* carga bacteriana significativamente menor (p<0,05) que en el órgano correspondiente del grupo de control no vacunado por el ensayo de suma de rangos de Mann Whitney.

[†] los números entre paréntesis indican la proporción de ratones en el grupo que no tuvieron niveles detectables de *Listeria*/órgano indicado; si no se muestra paréntesis, los órganos respectivos en todos los ratones del grupo tuvieron niveles de CFU detectables (es decir infección).

CFU, unidades formadoras de colonias; SD, desviación típica

TABLA 4

Inmunidad anti-Listeria temprana después de la vacunación con antígeno lipopeptídico encapsulado en arqueosoma

Grupo de vacuna	Log ₁₀ ± SD de CFU de <i>Listeria</i> /órgano	
	Hígado	Bazo
No vacunado	4,90 ± 0,54	5,69 ± 0,61
Arqueosomas de <i>H. salinarum</i> , sin antígeno	4,25 ± 0,50	5,09 ± 0,33
Arqueosomas de <i>H. salinarum</i> , antígeno incorporado	2,66 ± 0,55 ^{†*}	2,42 ± 0,44 ^{†*}
Arqueosomas de <i>M. smithii</i> , sin antígeno	4,31 ± 0,46	5,20 ± 0,33
Arqueosomas de <i>M. smithii</i> , antígeno incorporado	3,60 ± 0,86 [*]	2,73 ± 0,63 ^{†*}

Se vacunaron ratones (n=4 ó 5 por grupo) (s.c.) una vez con 15 µg de lipopéptido 20-mérico atrapado en 0,6 mg de arqueosomas de *M. smithii* o *H. salinarum* o con arqueosomas vacíos. Siete días después de la vacunación, todos los ratones se expusieron a un inóculo i.v. de $2,5 \times 10^3$ CFU de *L. monocytogenes*. Tres días después de la exposición, se determinaron las cargas bacterianas ($\text{Log}_{10} \pm \text{SD}$ de *Listeria*/órgano) en los hígados y bazos.

* carga bacteriana significativamente menor ($p < 0,05$) que en el órgano correspondiente en el grupo de control no vacunado.

† carga bacteriana significativamente menor ($p < 0,05$) en el órgano correspondiente que en los ratones inmunizados con los arqueosomas vacíos correspondientes (sin antígeno).

TABLA 5

Grado de inmunidad anti-*Listeria* temprana inducida por vacunación con lipopéptido encapsulado en diversos tipos de vesícula

Vehículo de liberación	Patógeno de exposición	Log ₁₀ de CFU ± SD del patógeno/órgano		
		Hígado	Bazo	
Arqueosomas de <i>T. acidophilum</i> (0,37 mg) [¶]	<i>L. monocytogenes</i>	2,84 ± 0,76*	<2,00 (4/5) ^{†*}	
Arqueosomas de <i>M. smithii</i> (0,67 mg) [¶]	"	3,70 ± 0,51*	2,76 ± 0,08*	±
Arqueosomas de <i>H. salinarum</i> (0,60 mg) [¶]	"	3,01 ± 0,46*	2,46 ± 0,51*	±
Arqueosomas de <i>N. magadii</i> (0,66 mg) [¶]	"	3,40 ± 0,22*	2,81 ± 0,67*	±
Liposomas convencionales (0,54 mg) [¶]	"	4,35 ± 0,84	4,03 ± 0,76*	±
Controles vírgenes		4,58 ± 0,38	5,54 ± 0,73	±
Arqueosomas de <i>H. salinarum</i> (0,60 mg) [¶]	<i>S. typhimurium</i>	5,73 ± 0,18	6,02 ± 0,14	±
Controles vírgenes	"	5,66 ± 0,08	5,95 ± 0,10	±

Se vacunaron ratones (n=5 por grupo) una vez con 15 µg del lipopéptido 20-mérico encapsulado en la cantidad indicada (¶) de uno u otro tipo de vesícula.

Una semana después de la vacunación los ratones se expusieron por vía intravenosa a *L. monocytogenes* ($2,5 \times 10^3$ CFU/ratón) o *S. typhimurium* ($3,1 \times 10^3$ CFU/ratón). Las cargas bacterianas (Log_{10} de CFU $\pm$ SD del patógeno/órgano) en los hígados y bazo se determinaron 3 días después de la exposición.

* carga bacteriana significativamente menor ($p < 0,05$) que la de órganos correspondientes del grupo de control virgen por ensayo de suma de rangos de Mann Whitney;

† los números entre paréntesis indican la proporción de ratones en el grupo que no tuvieron niveles detectables de CFU de patógeno/órgano indicado; si no se muestra el paréntesis, los órganos respectivos en todos los ratones del grupo tuvieron niveles de CFU detectables (es decir infección).

TABLA 6

*Especificidad de inmunidad temprana inducida por vacunación con antígeno encapsulado en arqueosomas de *T. acidophilum**

Tratamiento	Cepa ratón	de Patógeno exposición	Log ₁₀ $\pm$ SD de CFU de patógeno/órgano		
			de Hígado	Bazo	
Vacunado ¹	BALB/c	<i>L. monocytogenes</i>	<2,18 (3/5) ^{†*}	<2,00 (4/5) ^{†*}	
Virgen	BALB/c	"	4,29 $\pm$ 0,62	5,17 $\pm$ 0,70	$\pm$
Vacunado ¹	C57BU6	"	3,47 $\pm$ 0,64	4,67 $\pm$ 0,39	$\pm$
Virgen	C57BU6	"	3,81 $\pm$ 0,37	4,96 $\pm$ 0,16	$\pm$
Vacunado ¹	BALB/c	<i>S. typhimurium</i>	5,64 $\pm$ 0,19	5,89 $\pm$ 0,14	$\pm$
Virgen	BALB/c	"	5,76 $\pm$ 0,19	6,01 $\pm$ 0,20	$\pm$

¹Se vacunaron ratones una vez con el lipopéptido 20-mérico (11 μ g) encapsulado en arqueosomas de *T. acidophilum* (0,28 mg), después se expusieron 7 días después a *L. monocytogenes* ($2,23 \times 10^3$ CFU/ratón) o *S.*

typhimurium ($3,61 \times 10^3$ CFU/ratón). Las cargas bacterianas ($\text{Log}_{10} \pm \text{SD}$ de CFU de patógeno/órgano) en el hígado y el bazo se determinaron 3 días después de la exposición.

* carga bacteriana significativamente menor ($p < 0,05$) que en el órgano correspondiente de los grupos de ratones vírgenes (no vacunados).

† los números entre paréntesis indican la proporción de ratones en el grupo que no tuvieron un nivel detectable de CFU de patógeno/órgano indicado; si no se muestran paréntesis, los órganos respectivos en todos los ratones del grupo tuvieron niveles de CFU detectables (es decir infección).

TABLA 7

Capacidad de diversas vacunas de arqueosomas para inducir inmunidad anti-Listeria prolongada

Vehículo de administración	Log_{10} de CFU $\pm$ SD de <i>Listeria</i> /órgano	
	Hígado	Bazo
Arqueosomas de <i>T. acidophilum</i>	$3,71 \pm 0,42^*$	$3,52 \pm 0,62^*$
Arqueosomas de <i>M. smithii</i>	$3,82 \pm 0,28^*$	$3,52 \pm 0,62^*$
Arqueosomas de <i>H. salinarum</i>	$3,60 \pm 0,38^*$	$3,77 \pm 0,30^*$
Controles vírgenes	$4,89 \pm 0,58$	$5,69 \pm 0,61$

Se vacunaron ratones ($n=5$ por grupo) una vez con $15 \mu\text{g}$ del lipopéptido 20-mérico encapsulado en uno u otro arqueosoma (las cantidades de arqueosoma se indican en la Tabla 5). Un mes después de la vacunación, los ratones se expusieron por vía intravenosa a *L. monocytogenes* ($2,5 \times 10^3$ CFU/ratón). Las cargas bacterianas (Log_{10} de CFU $\pm$ SD de *Listeria*/órgano) en los hígados y bazos se determinaron 3 días después de la exposición.

* carga bacteriana significativamente menor ($p < 0,05$) que la de los órganos correspondientes del grupo de ratones de control vírgenes (no vacunados) por en ensayo de suma de rangos de Mann Whitney.

TABLA 8

*Capacidad de antígeno lipopeptídico atrapado en diversos tipos de vesículas para inducir inmunidad anti-*Listeria* prolongada cuando se exponen a un inóculo grande del patógeno*

Vehículo de administración	Log ₁₀ de CFU ± SD de <i>Listeria</i> /órgano	
	Hígado	Bazo
Arqueosomas de <i>T. acidophilum</i>	3,62 ± 0,40*	<2,54 (3/4) [†] *
Arqueosomas de <i>M. smithii</i>	<2,74 (1/3) [†] *	<2,0 (3/3) [†] *
Arqueosomas de <i>H. salinarum</i>	3,35 ± 0,87*	4,23 ± 1,22*
Liposomas convencionales	4,48 ± 0,44*	4,18 ± 1,04*
Arqueosomas de <i>M. smithii</i> sin antígeno	6,21 ± 1,12	6,26 ± 0,33

Se vacunaron ratones (n=3 ó 4 por grupo) dos veces, con una separación de 28 días, con 15 µg del lipopéptido 20-mérico encapsulado en uno u otro tipo de vehículo (cantidades indicadas en la Tabla 5) o con arqueosomas de *M. smithii* vacíos (sin antígeno). Un mes después de la vacunación, los ratones se expusieron por vía intravenosa a *L. monocytogenes* (2,0 x 10⁴ CFU/ratón). Las cargas bacterianas (Log₁₀ de CFU ± SD de *Listeria*/órgano) en los hígados y bazo se determinaron 3 días después de la exposición.

* carga bacteriana significativamente menor (p<0,05) que en los órganos correspondientes de ratones de control con arqueosomas de *M. smithii* sin antígeno por ensayo de suma de rangos de Mann Whitney.

[†] los números entre paréntesis indican la proporción de ratones del grupo que no tuvieron niveles detectables de CFU de *Listeria*/órgano indicado; si no se muestran paréntesis, los órganos respectivos en todos los ratones del grupo tuvieron niveles detectables de CFU (es decir infección).

TABLA 9

Inicio rápido de inmunidad contra infección por Listeria monocytogenes en ratones BALB/c inmunizados con cantidades decrecientes del lipopéptido 13-mérico encapsulado en arqueosomas de T. acidophilum

μg de arqueosomas	μg de lipopéptido 13-mérico	Log ₁₀ de CFU $\pm$ SD de <u>Listeria/órgano</u>	
		Bazo	Hígado
500	23,0	<2,971 (1/5) [†]	<2,843 (1/5) [†]
250	11,5	<2,389 (3/5) [†]	<3,374 (3/5) [†]
50	2,3	<2,00 (5/5) [†]	2,914 $\pm$ 0,31
10	0,5	<2,699 (4/5) [†]	<3,341 (1/5) [†]
0	0,0	5,928 $\pm$ 0,22	4,827 $\pm$ 0,19

Se vacunaron ratones (5 animales/grupo) (s.c.) una vez con arqueosomas que contenían lipopéptido 13-mérico a las concentraciones mostradas en la Tabla. Una semana después de la vacunación, los animales se expusieron (i.v.) a $1,26 \times 10^4$ CFU de *L. monocytogenes* y las cargas bacterianas (Log₁₀ de CFU $\pm$ SD de *Listeria*/órgano) en los bazo e hígados se determinaron 3 días después de la exposición.

[†] los números entre paréntesis indican la proporción de ratones del grupo que no tuvieron niveles detectables de CFU de *Listeria*/órgano indicado; si no se muestra el paréntesis, los órganos respectivos en todos los ratones del grupo tuvieron niveles detectables de CFU (es decir infección).

TABLA 10

Inmunidad frente a la infección por una exposición de aerosol de LVS de Francisella tularensis en ratones BALB/c inmunizados con arqueosomas de M. smithii fusionados con preparación de membrana externa aislada de F. tularensis

Tratamiento	Log ₁₀ de CFU ± SD		
	Pulmón	Bazo	Hígado
Virgen	6,85 ± 0,15	4,07 ± 0,39	4,27 ± 0,25
Inmunizado	5,27 ± 0,13	<2,77 (1/6) [†]	<3,90 (1/6) [†]

Se vacunaron ratones (6 animales/grupo) por vía subcutánea, en la base de la cola, a las 0, 3 y 5 semanas, con 1 mg de arqueosomas de *M. smithii* que contenía la membrana externa (1,6 µg de proteína) extraída de *F. tularensis*. A las 7 semanas después de la primera vacunación, los animales se expusieron por aerosol (durante 5 minutos) con una suspensión de LVS de *F. tularensis* que contenía $6,9 \times 10^9$ CFU por ml. Las cargas bacterianas (Log₁₀ de CFU ± SD de *F. tularensis*/órgano) en los pulmones, bazo e hígados se determinaron por recuento de placas 3 días después de la exposición.

[†] los números entre paréntesis indican la proporción de ratones en el grupo que no tuvieron niveles detectables de CFU de *Francisella tularensis*/órgano indicado; si no se muestra paréntesis, los órganos respectivos en todos los ratones del grupo tuvieron niveles de CFU detectables (es decir infección).

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende un liposoma preparado a partir de un extracto de lípido polar de una arqueobacteria y un antígeno que tiene un epítipo restringido al MHC de clase I, en la fabricación de un medicamento para uso profiláctico y/o terapéutico contra cánceres o infecciones por patógenos intracelulares, donde el liposoma sirve como un adyuvante y el medicamento induce una respuesta de células T CD8⁺ con especificidad de antígeno en un animal.
2. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el medicamento es una vacuna.
3. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde el liposoma sirve como un vehículo inmunomodulador para el antígeno.
4. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el extracto de lípido polar es el extracto de lípidos polares totales de una arqueobacteria.
5. Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, donde el extracto de lípido polar es arquetidil glicerolfosfato O-metilo.
6. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la respuesta de células T CD8⁺ con especificidad de antígeno inducida es una respuesta de células T citotóxicas.
7. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medicamento se administra a un animal por vía parenteral.
8. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el antígeno es un antígeno acelular, un péptido, una secuencia de aminoácidos de un péptido alquilado, una proteína o una preparación de membrana externa aislada a partir de un patógeno.
9. Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, donde la respuesta de células T CD8⁺ inducida en el animal promueve una respuesta de memoria de células T CD8⁺.
10. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicaciones 1 a 4, donde la re-exposición del animal al antígeno regula positivamente la expresión del marcador de memoria CD44 sobre las células T.
11. Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, donde la arqueobacteria se selecciona entre el grupo compuesto por *Methanobrevibacter smithii*, *Thermoplasma acidophilum* o *Halobacterium salinarum*.
12. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 11, donde la arqueobacteria es *Methanobrevibacter smithii*.
13. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 11, donde la arqueobacteria es *Thermoplasma acidophilum*.
14. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 11, donde la arqueobacteria es *Halobacterium salinarum*.
15. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 12, donde la respuesta de células T CD8⁺ específica de antígeno en el animal se induce en ausencia de ayuda de células T CD4⁺.
16. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 12, donde la generación de una respuesta de células T CD8⁺ específica de antígeno está mediada por la activación de células presentadoras de antígeno por el adyuvante del liposoma.
17. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 16, donde la activación de las células presentadoras de antígeno se realiza por regulación positiva de moléculas coestimuladoras B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) en la superficie de las células presentadoras de antígeno.
18. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, donde las células presentadoras de antígeno activadas son células dendríticas CD11c⁺.
19. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 12, donde la generación de una respuesta de células T CD8⁺ específica de antígeno tiene como resultado la producción de la citoquina interferón gamma por las células T CD8⁺.
20. Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, donde la generación de una repuesta de células T específica de antígeno produce además la estimulación de la producción de la citoquina IL-4 por las células T.

ES 2 320 971 T3

21. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 12, donde el adyuvante del liposoma estimula la producción del factor de necrosis tumoral por las células presentadoras de antígeno.
22. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 16, donde las células presentadoras de antígeno
5 activadas son las células Mac 1 α^{alto} .
23. Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, para conferir a un animal inmunidad protectora contra la infección por un patógeno intracelular.
24. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 23, donde el patógeno intracelular es un virus, una
10 bacteria o un parásito.
25. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 23 ó 24, donde el antígeno es una secuencia de aminoácidos de un péptido alquilado correspondiente a una secuencia de aminoácidos expresada por el patógeno.
15
26. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 23 ó 24, donde el antígeno es una preparación de la membrana externa aislada a partir del patógeno.
27. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 23, donde la dosificación de la composición de
20 vacuna comprende de 10 a 670 μg de liposomas y de 0,5 a 23 μg de antígeno.
28. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 27, donde la dosificación de la composición de vacuna comprende 10 μg de liposomas y 0,5 μg de antígeno.
29. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 23, donde la inmunidad protectora conferida al animal es específica para el antígeno.
30. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 23, donde una sola inyección subcutánea de la composición de vacuna en un animal es suficiente para conferir inmunidad protectora al animal.
30
31. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 30, donde el inicio de la inmunidad protectora se produce en los 7 días siguientes a una sola administración subcutánea de la composición de vacuna al animal.
32. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 30 ó 31, donde la inmunidad protectora se observa
35 en el animal vacunado en las 24 a 48 horas posteriores a una exposición infecciosa.
33. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 23, donde la arqueobacteria es *Thermoplasma acidophilum*, *Methanobrevibacter smithii*, *Natronobacterium magadii* o *Halobacterium salinarum*.
34. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 23, donde el patógeno es *Francisella tularensis*.
40
35. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 34, **caracterizado** por que el antígeno es una preparación de la membrana externa aislada de *Francisella tularensis*.
36. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 23, **caracterizado** por que el patógeno es *Listeria monocytogenes*.
45
37. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 36, **caracterizado** por que la dosificación de la composición de vacuna comprende de 10 a 500 μg de liposomas preparados a partir del extracto de lípidos polares totales de *Thermoplasma acidophilum* y de 0,5 a 23 μg del antígeno.
50
38. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 23, **caracterizado** por que la inmunidad protectora conferida puede inducir una respuesta de memoria.
39. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 38, **caracterizado** por que la respuesta de memoria
55 conferida confiere al animal inmunidad protectora durante una parte significativa de la vida del animal.
40. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** por que además se inducen en un animal respuestas Th1 y Th2 CD4 $^{+}$.
60
41. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 40, **caracterizado** por que en el animal se induce una respuesta de memoria de células T CD8 $^{+}$ con especificidad de antígeno y de células T CD4 $^{+}$ con especificidad de antígeno.
42. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 41, **caracterizado** por que la arqueobacteria es *Thermoplasma acidophilum*.
65

ES 2 320 971 T3

43. Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, para conferir a un animal inmunidad protectora contra cánceres.

5 44. Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, para conferir a un animal inmunidad terapéutica contra cánceres.

45. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 43, **caracterizado** por que el antígeno en la composición de vacuna se expresa por la célula cancerosa.

10

15

20

25

30

35

40

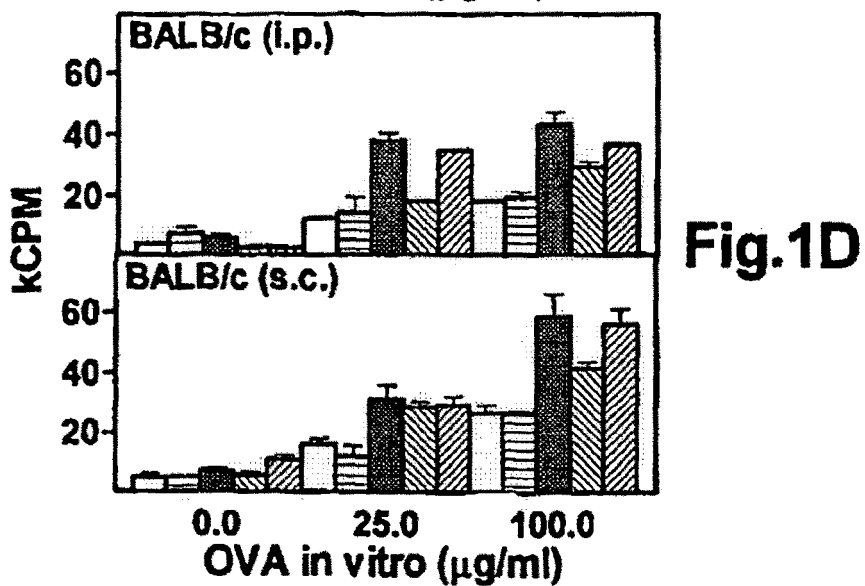
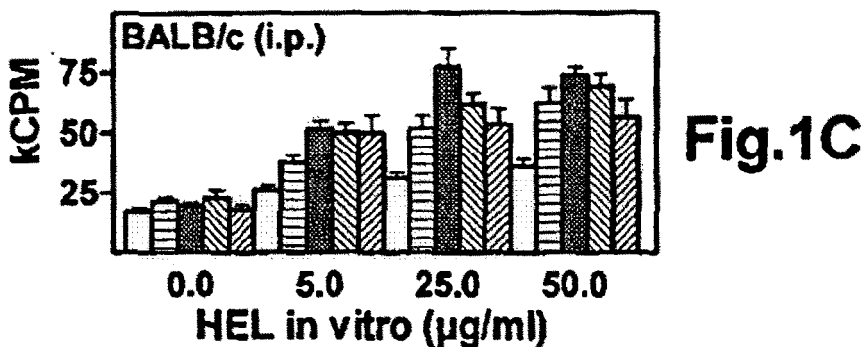
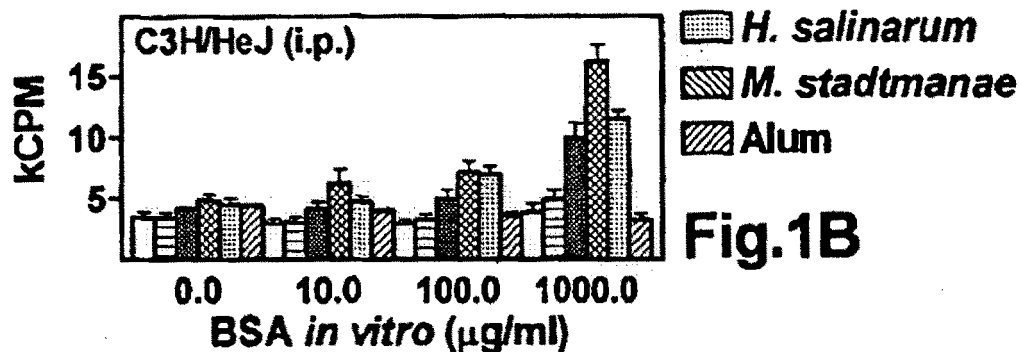
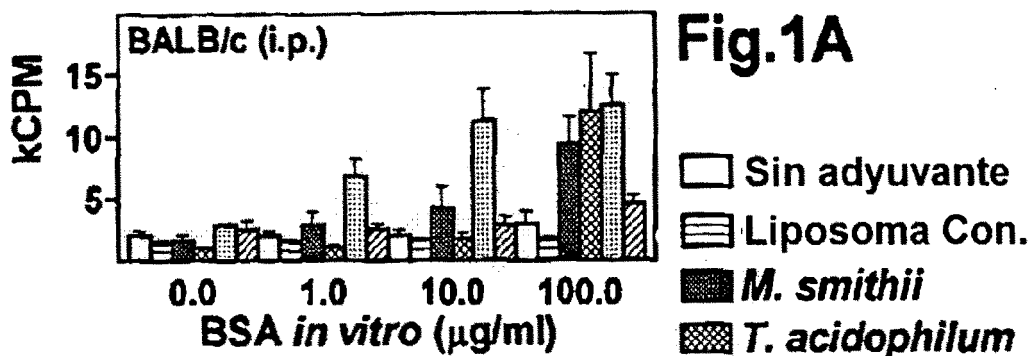
45

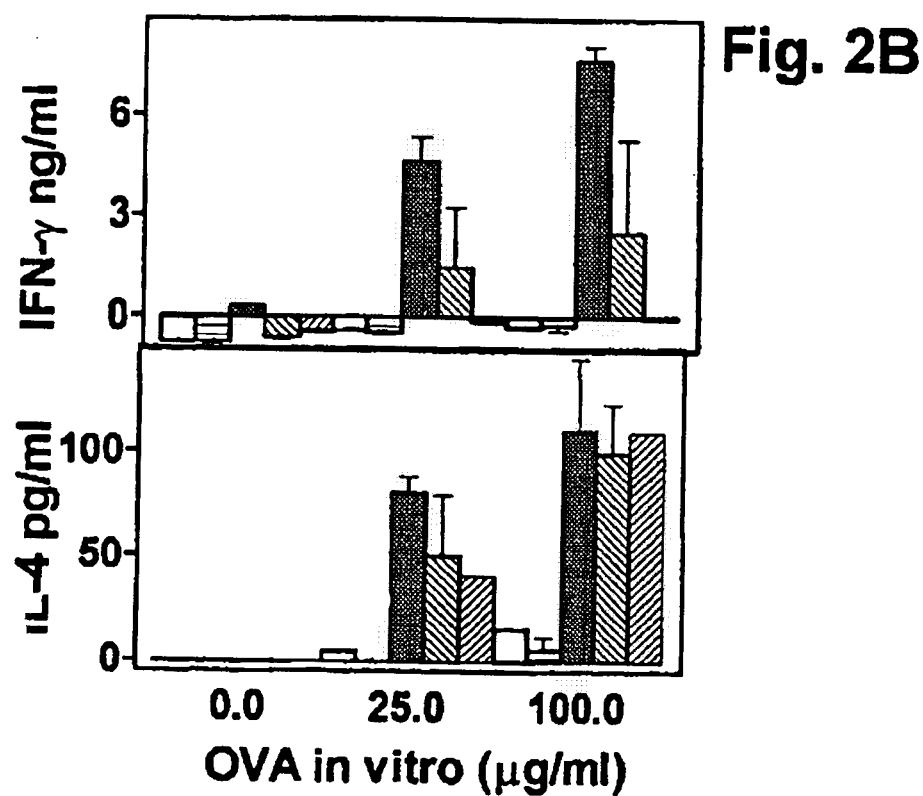
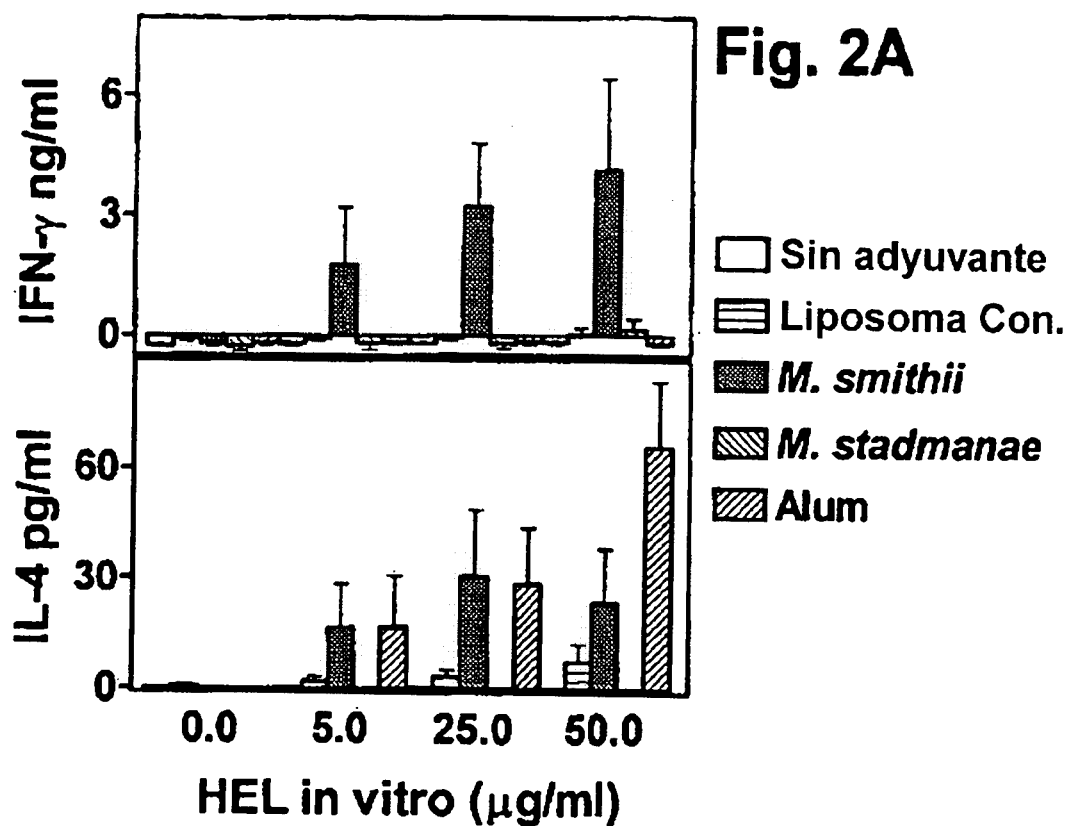
50

55

60

65





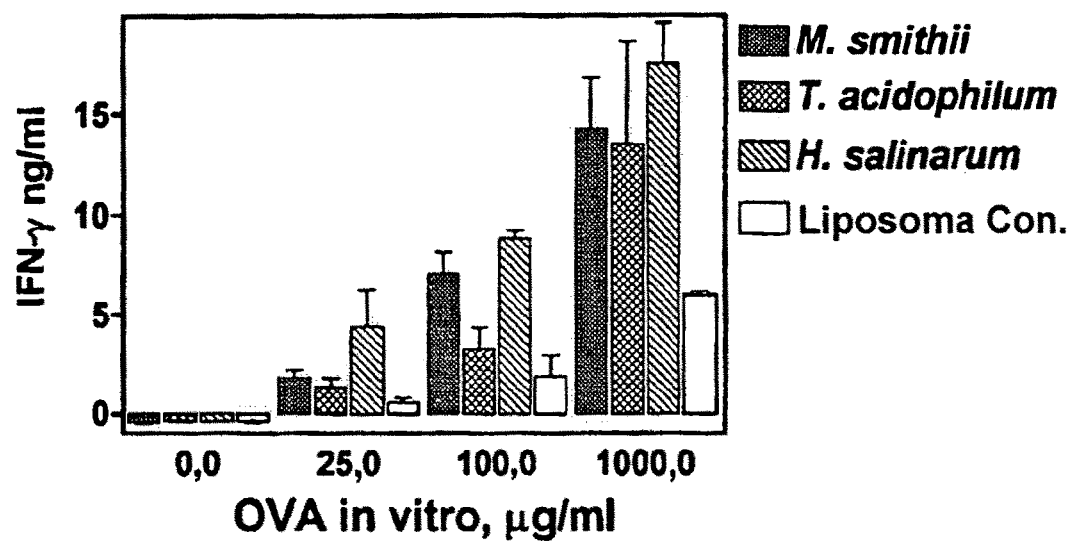


Fig. 3

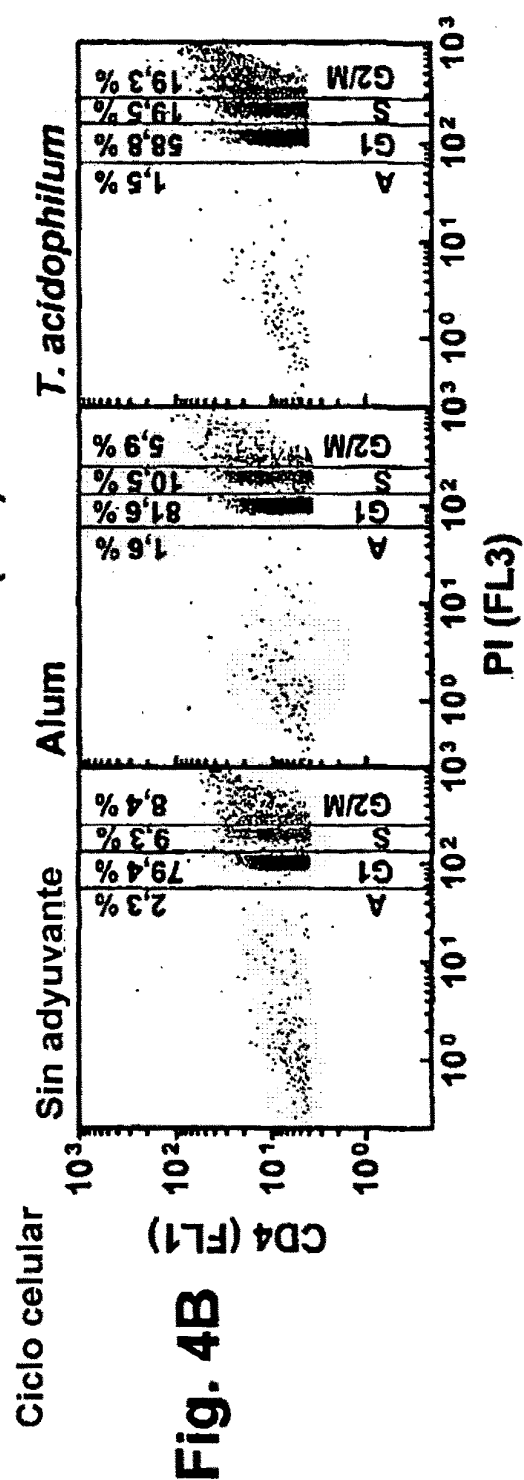
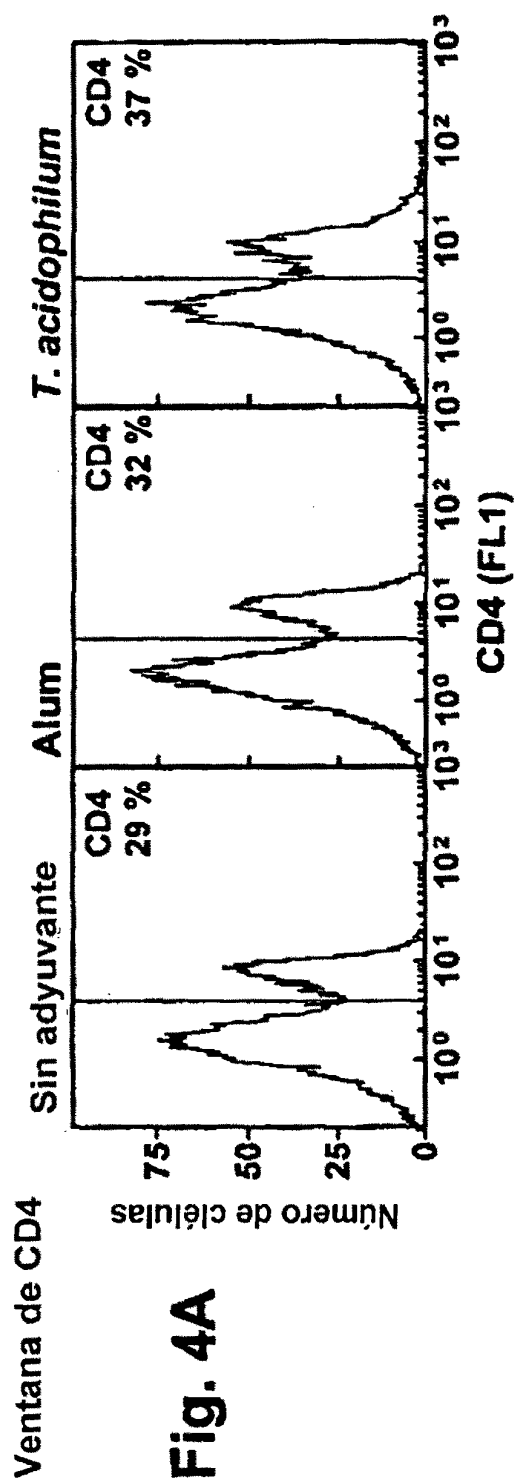


Fig. 5A

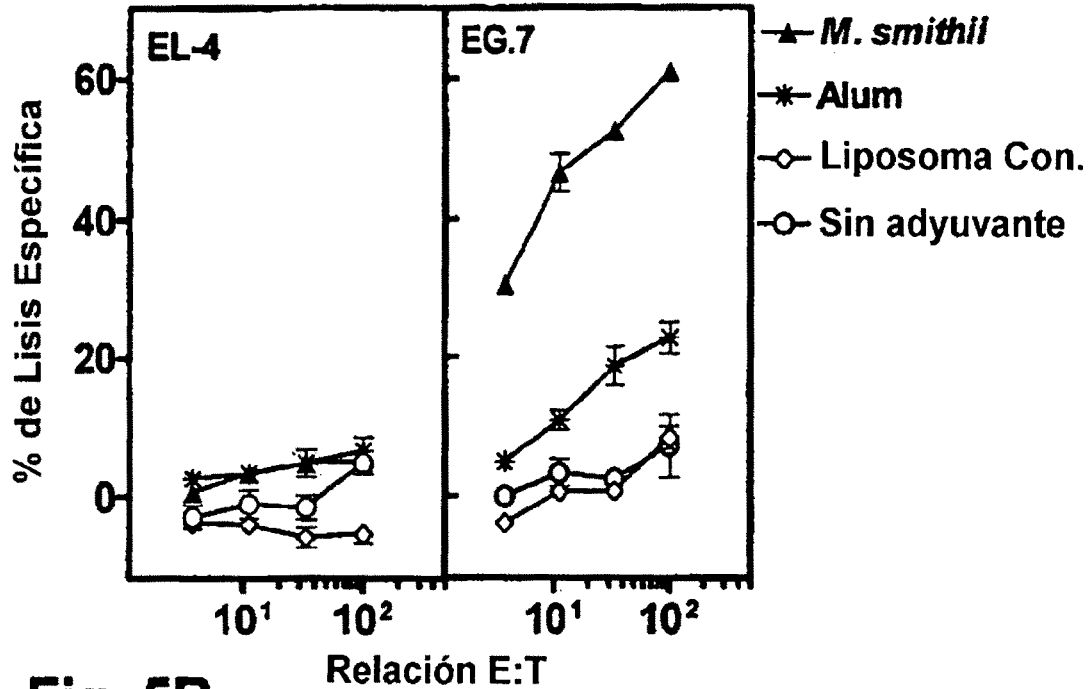
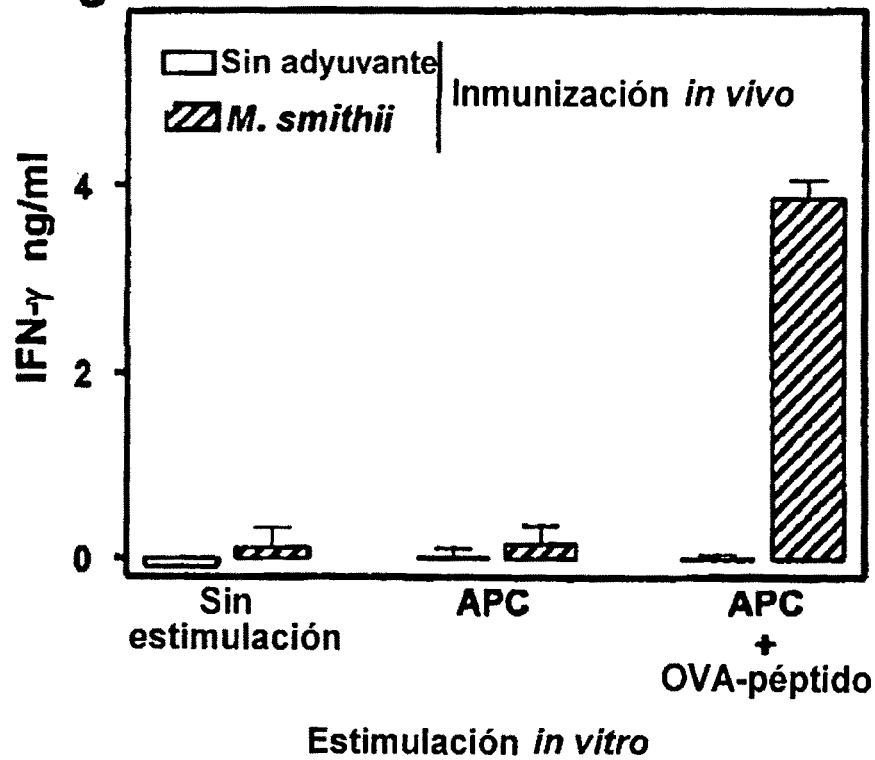


Fig. 5B



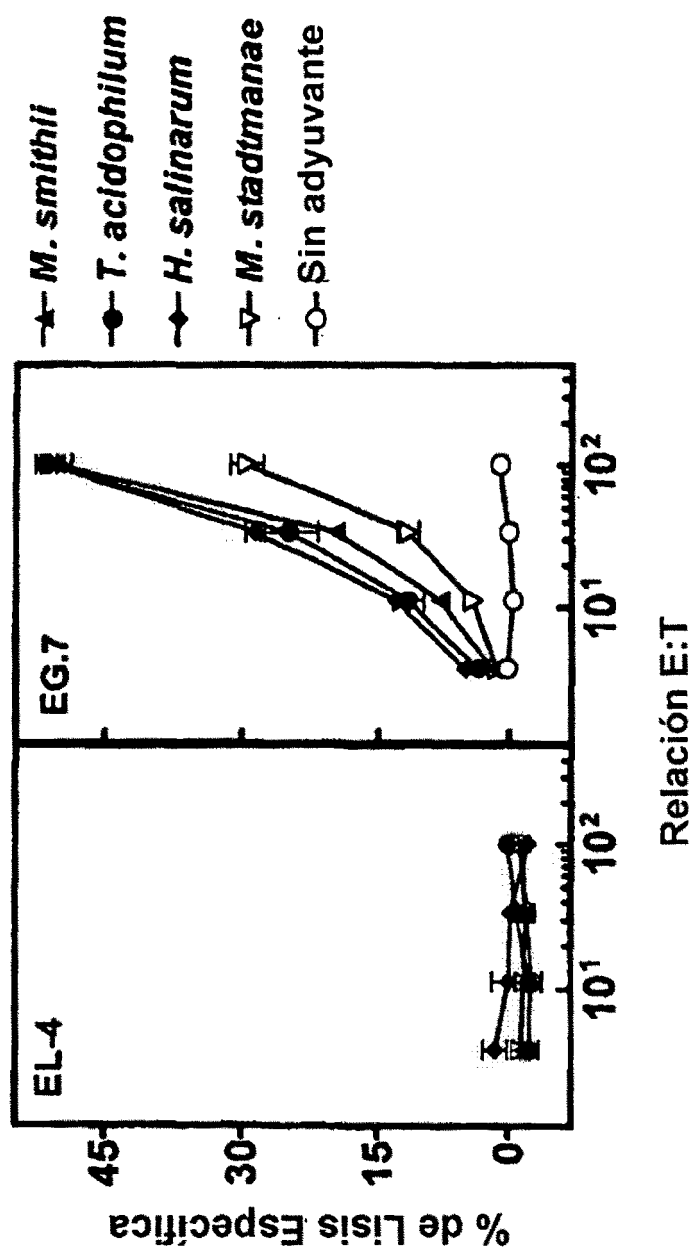


Fig. 6

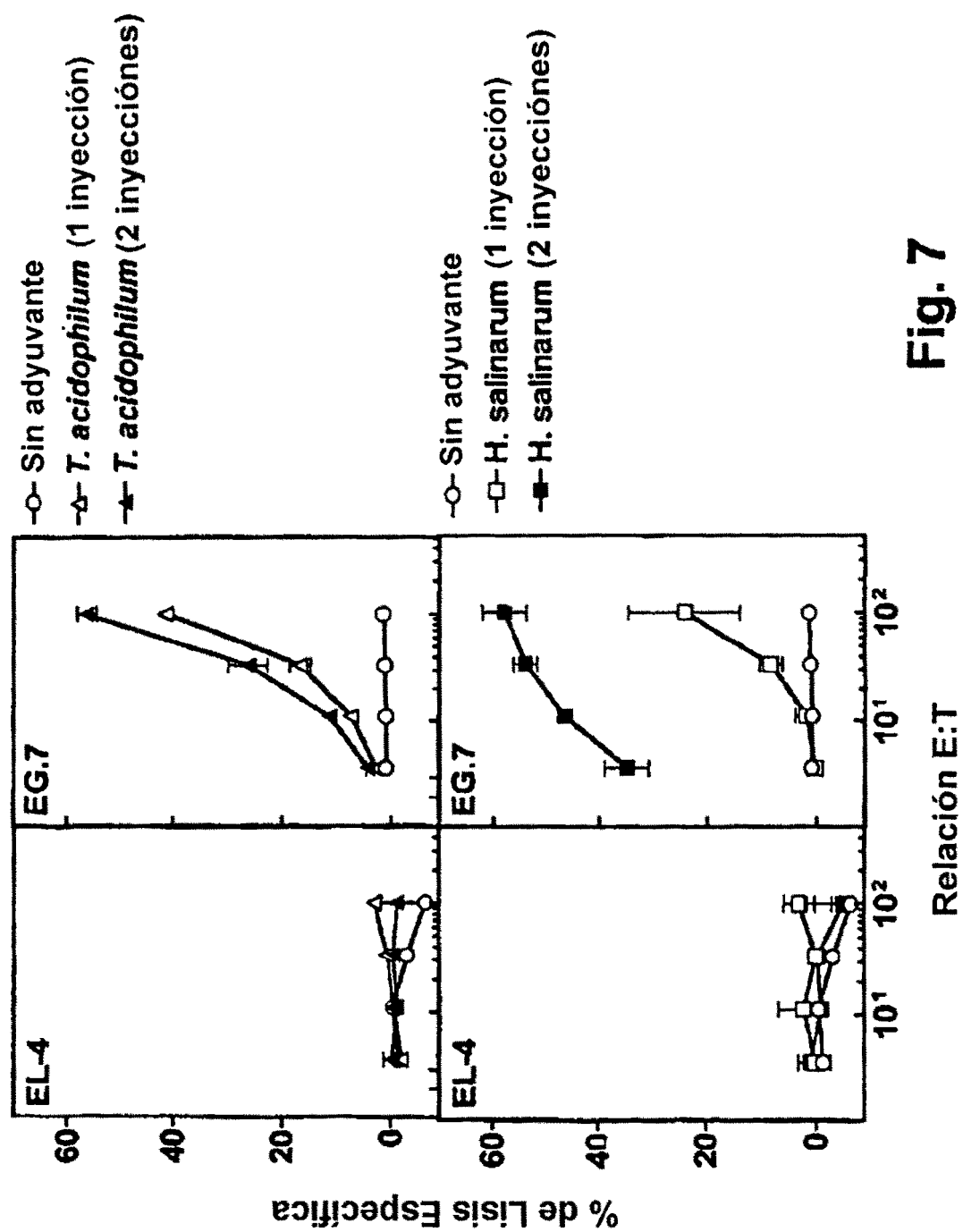


Fig. 7

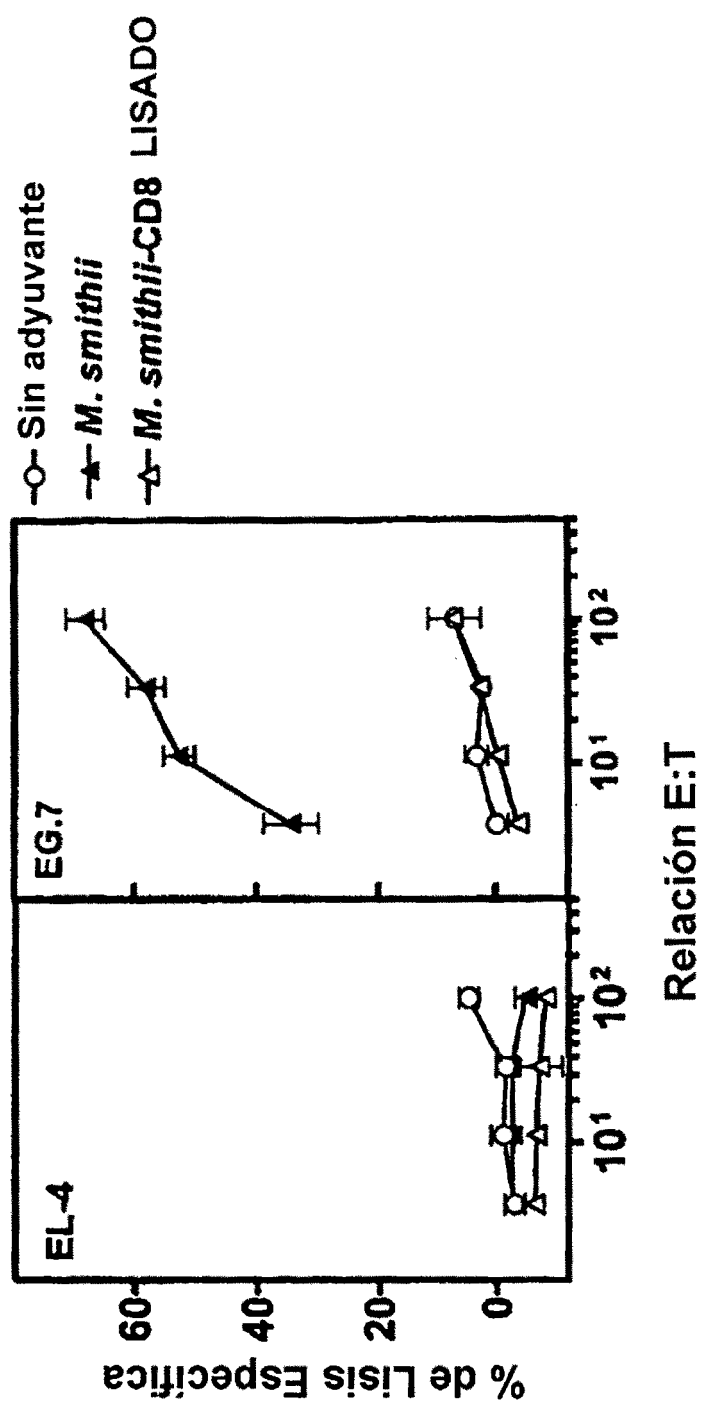
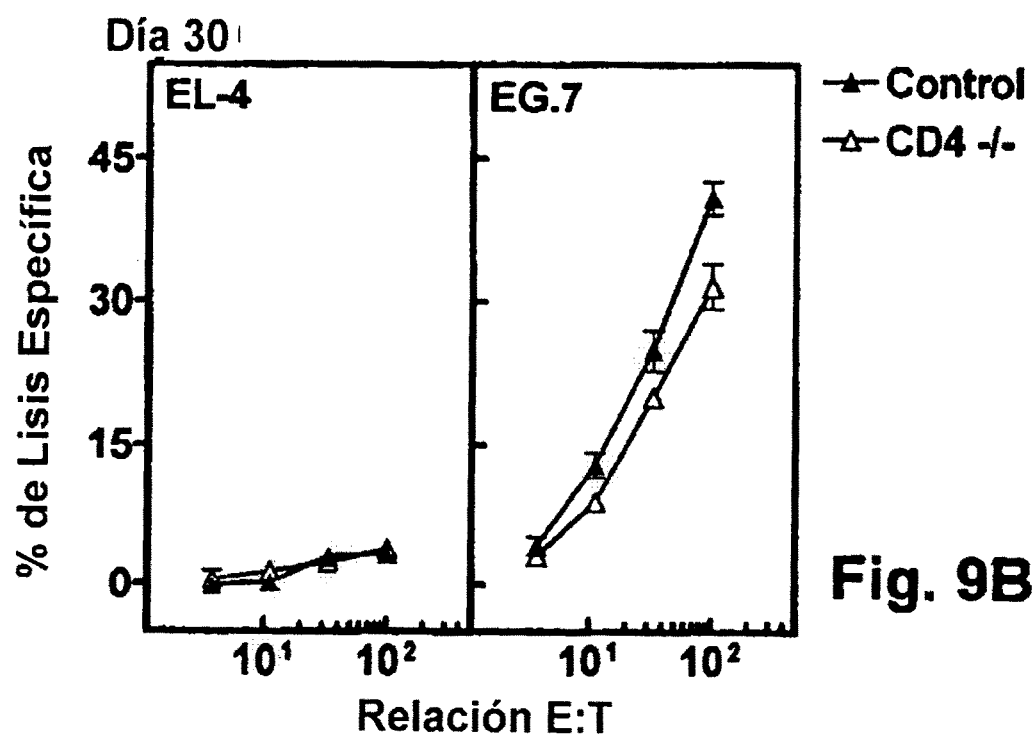
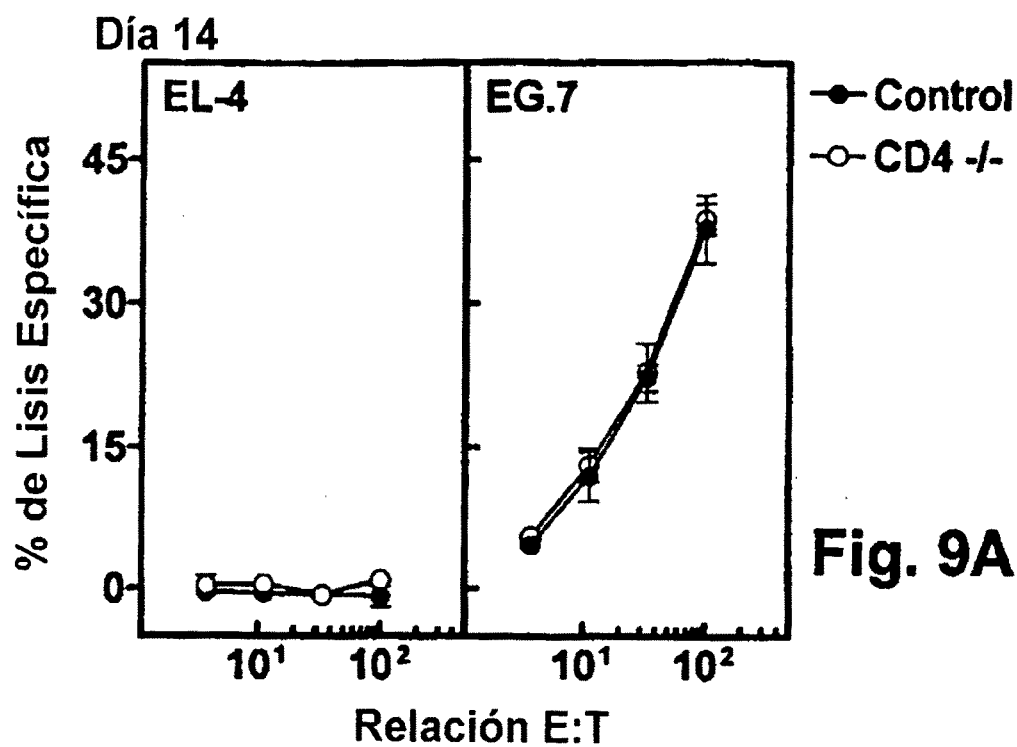


Fig. 8



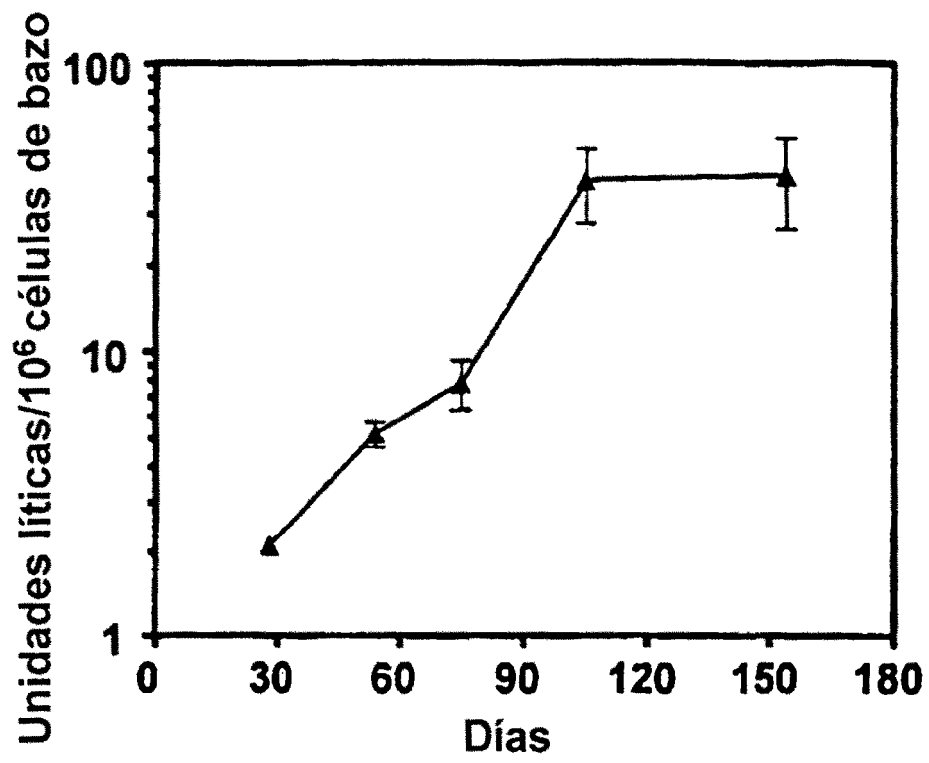


Fig. 10

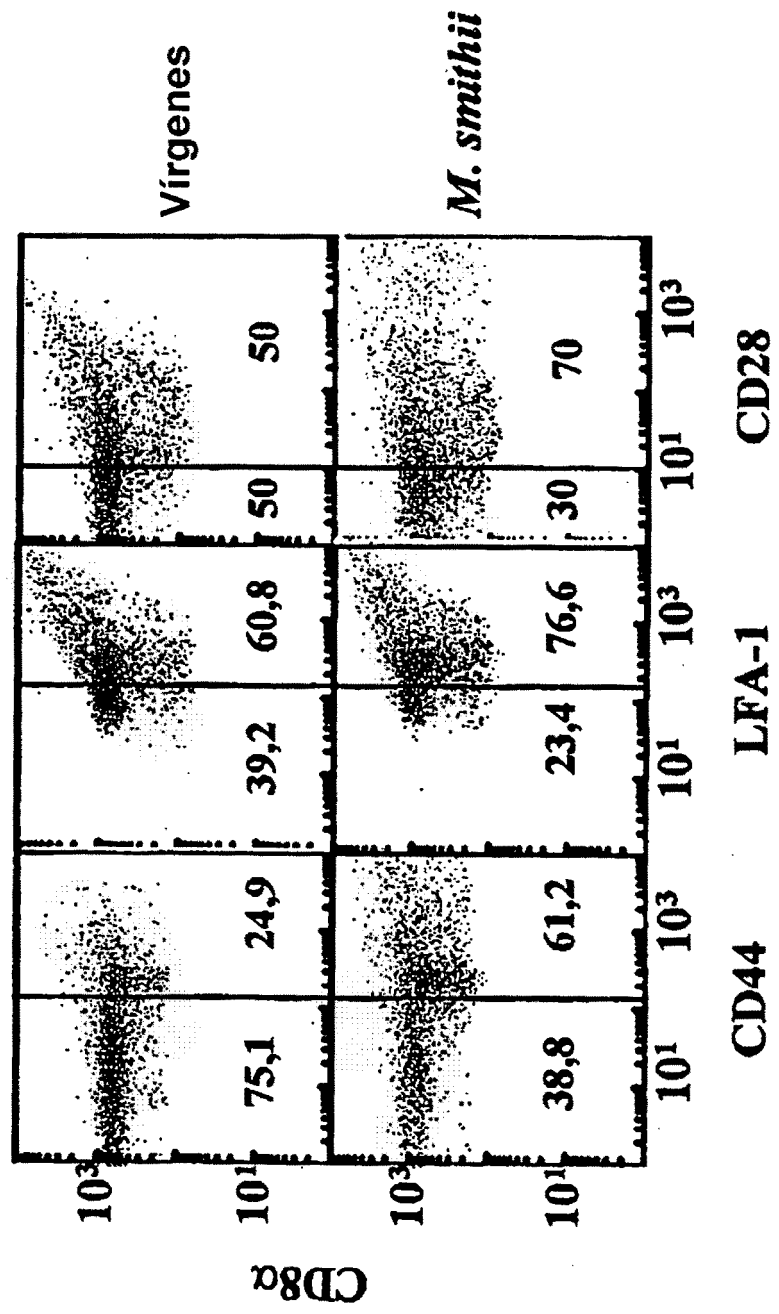
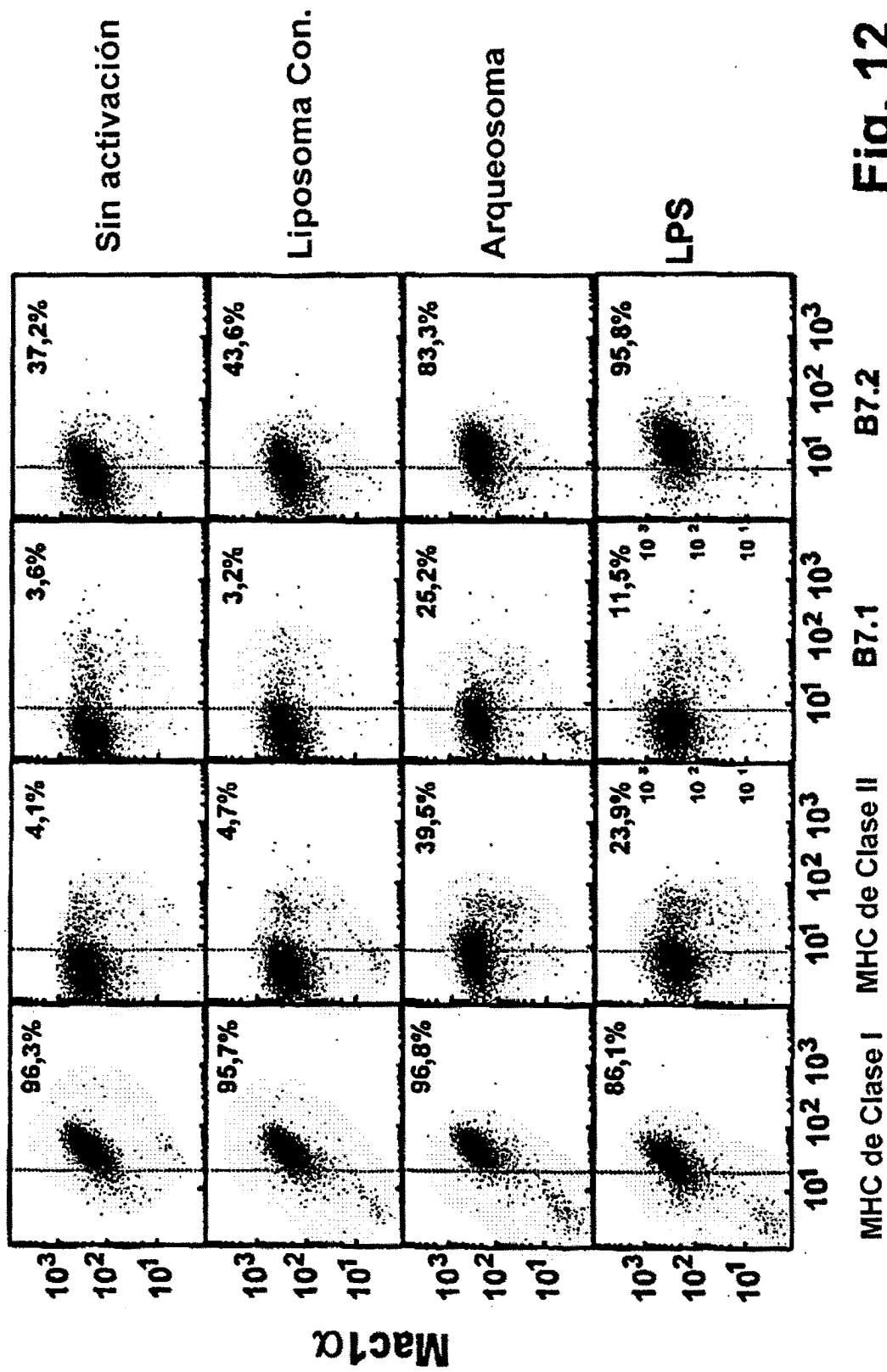
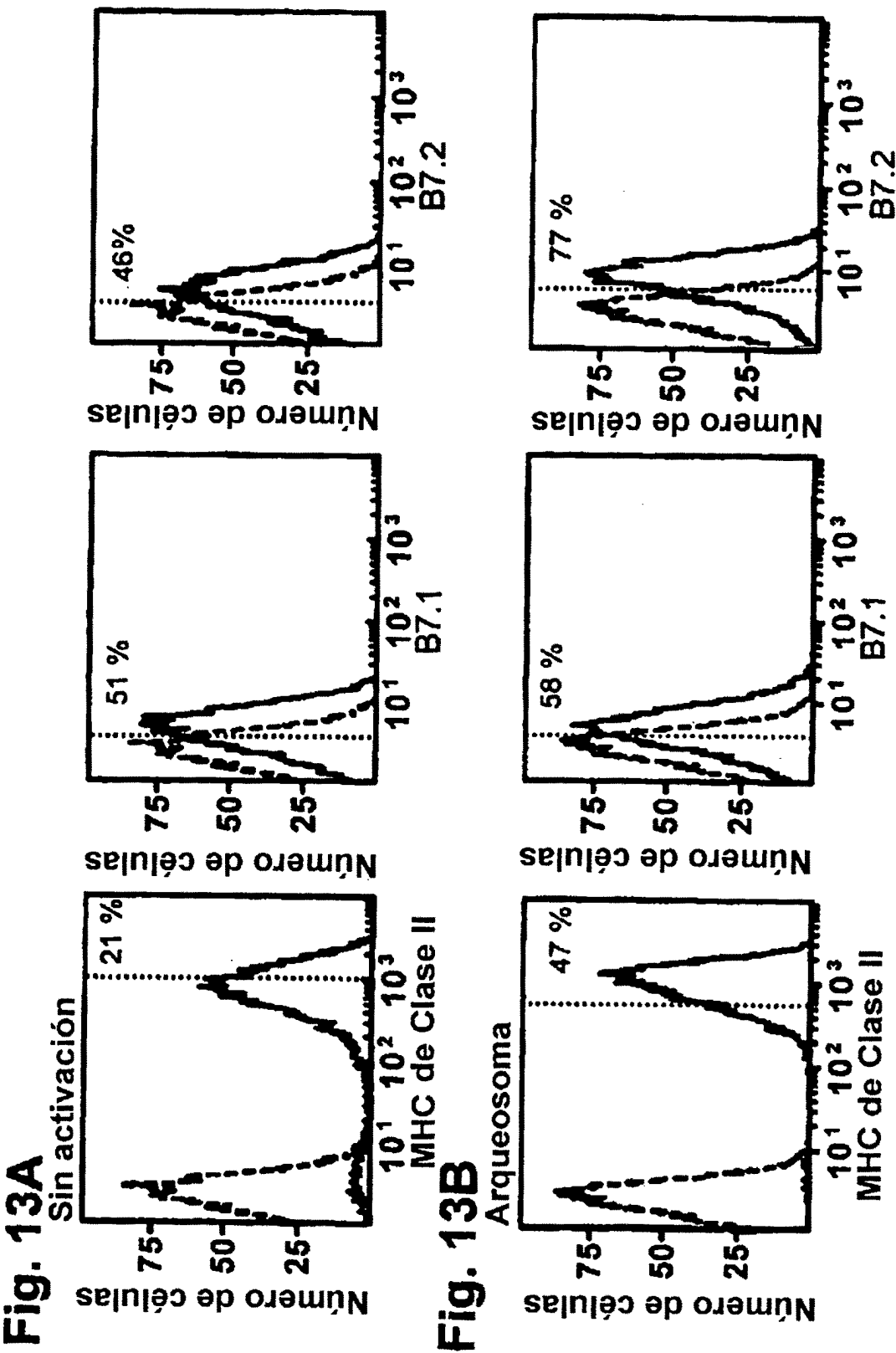


Fig. 11





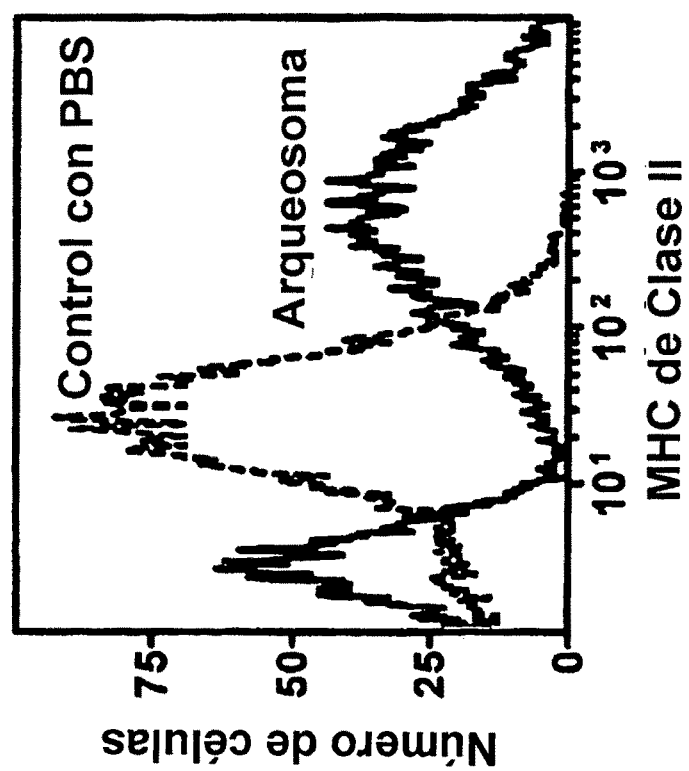
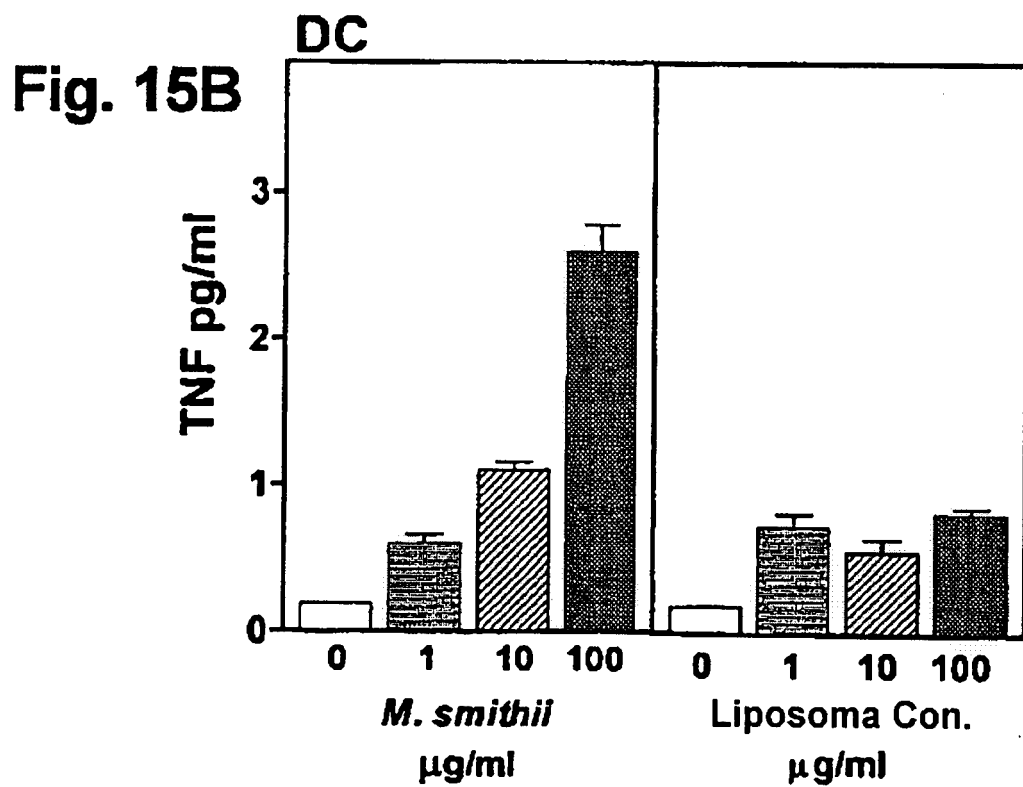
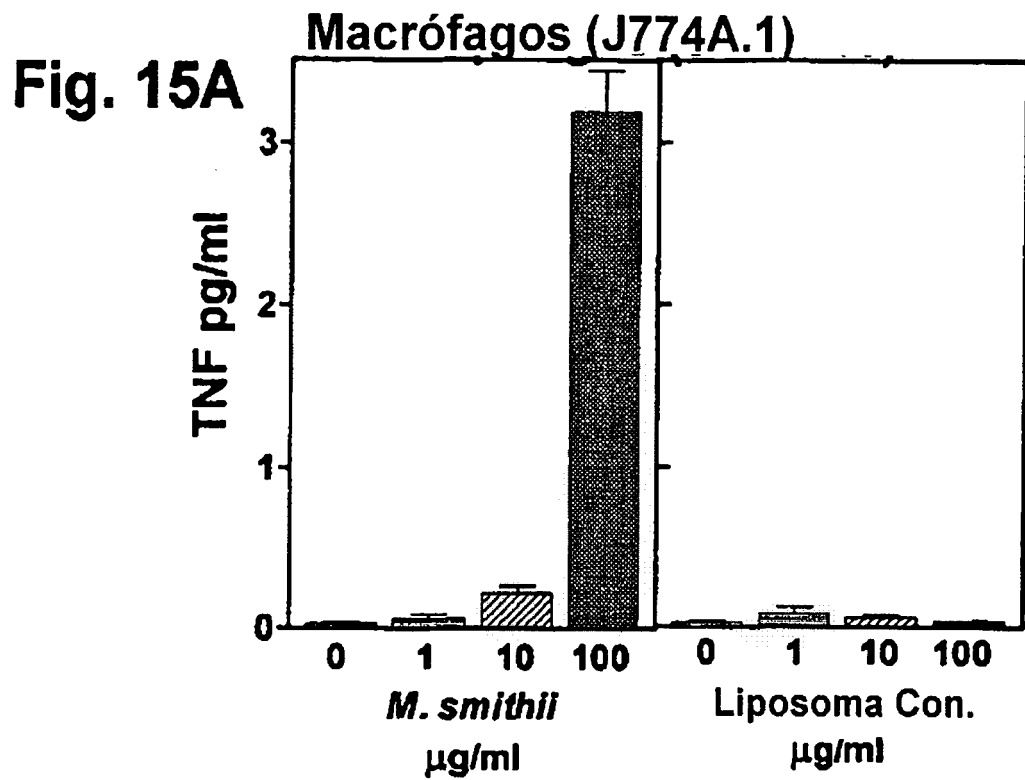


Fig. 14



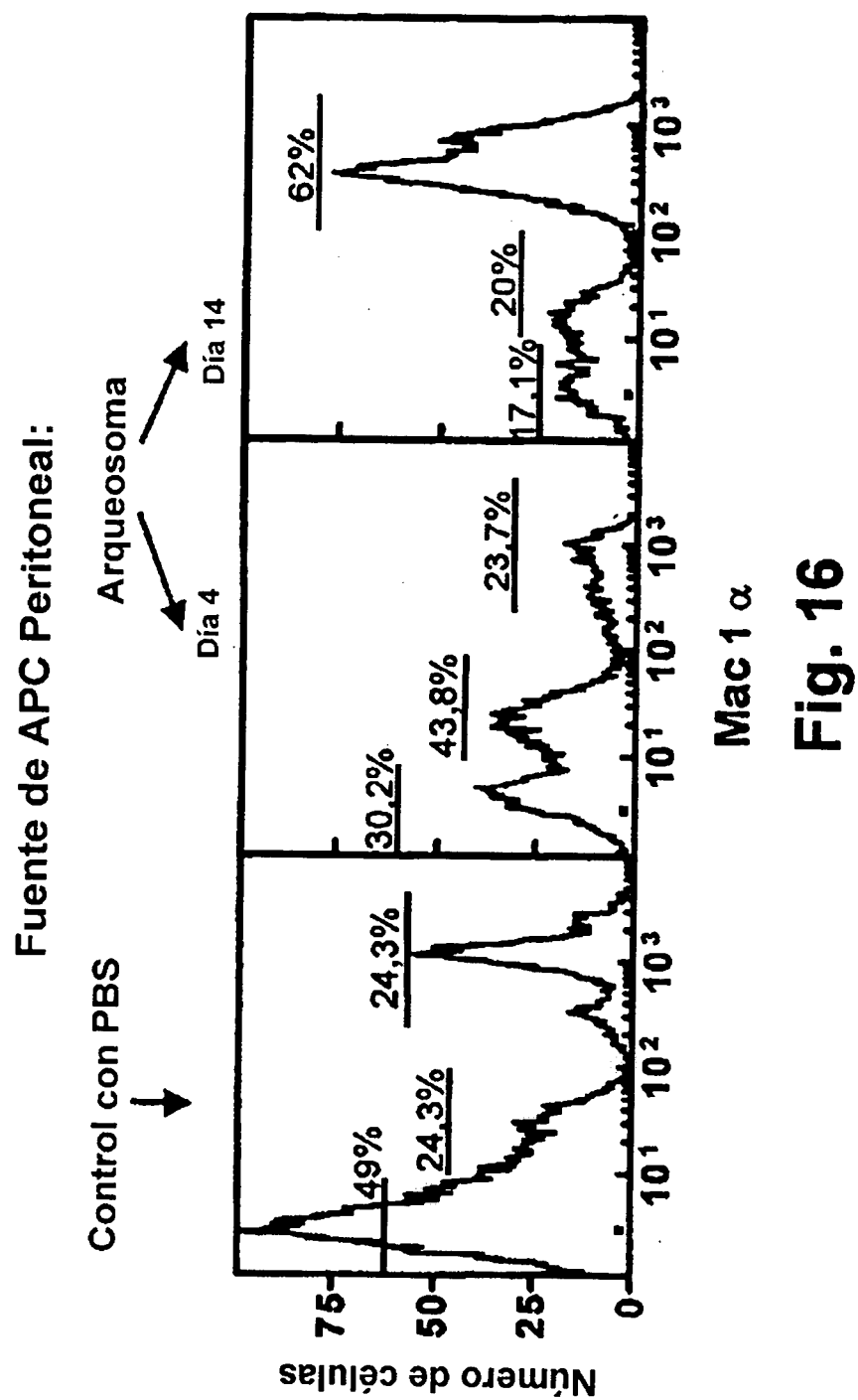


Fig. 16

Fig. 17A

Sin clasificar

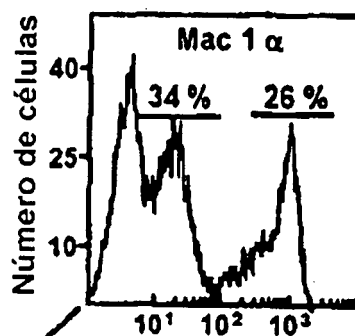


Fig. 17B

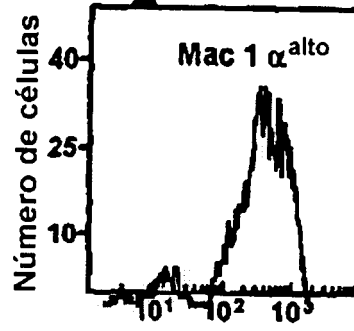
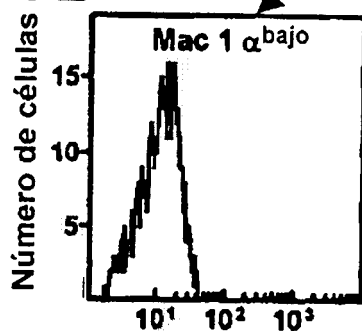


Fig. 17C

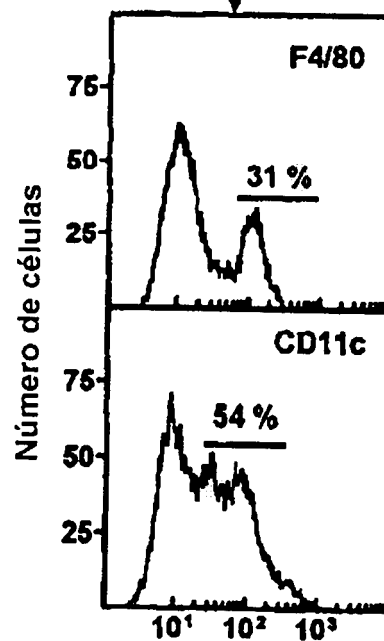
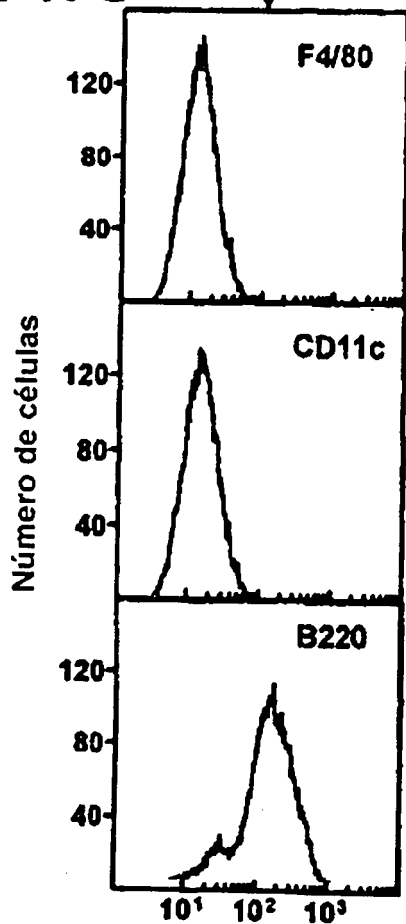


Fig.18A

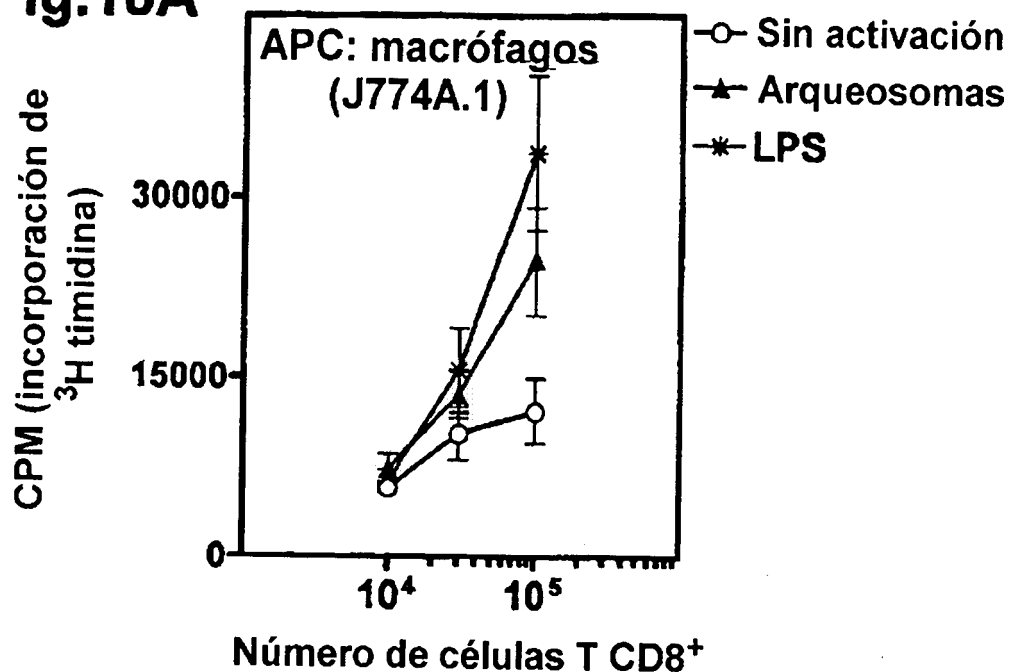
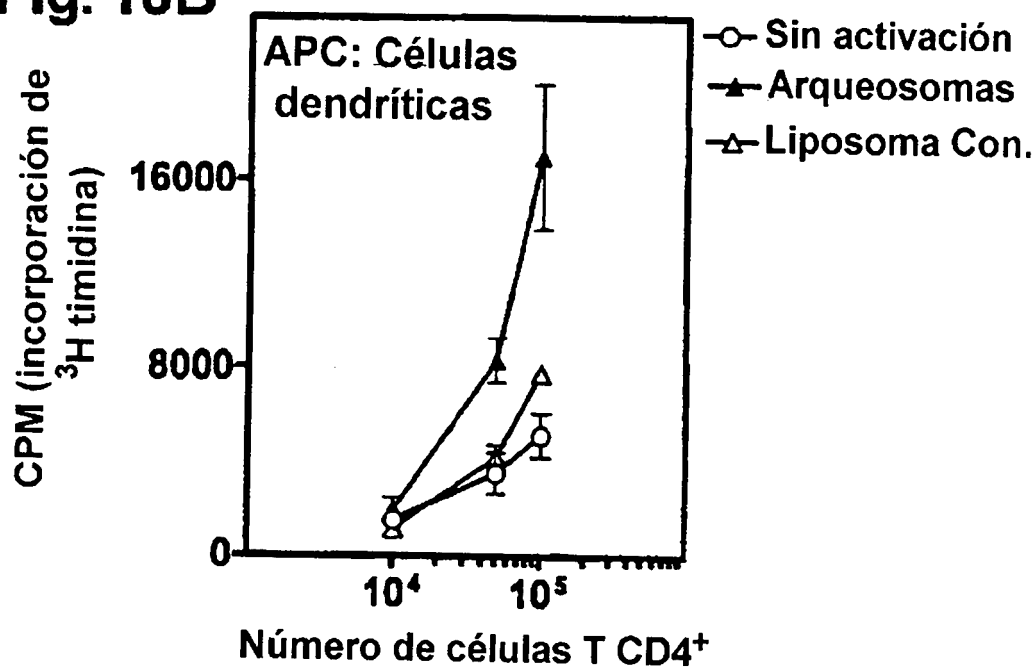
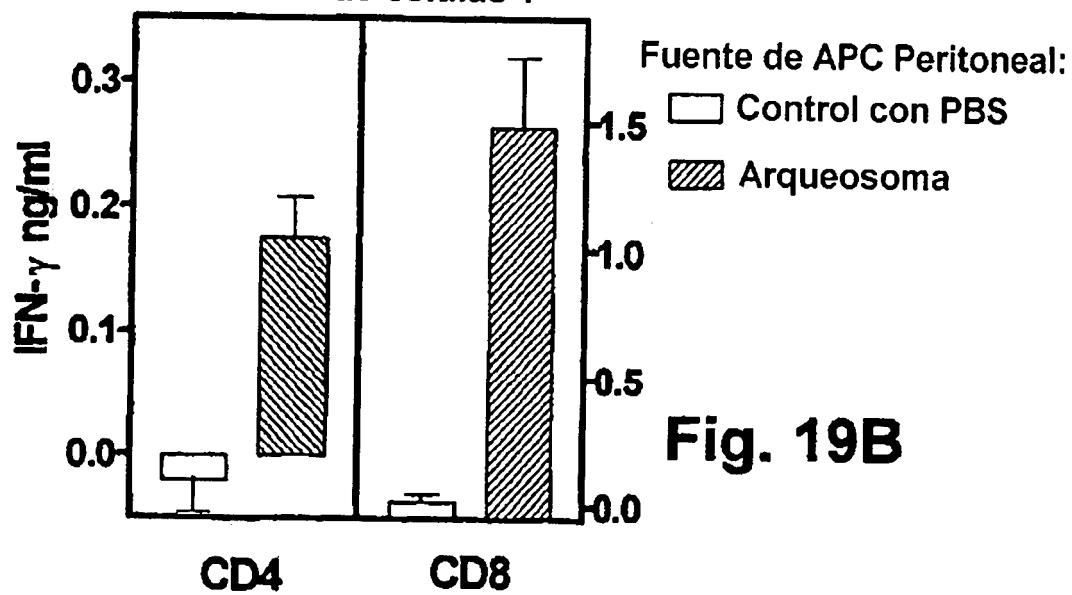
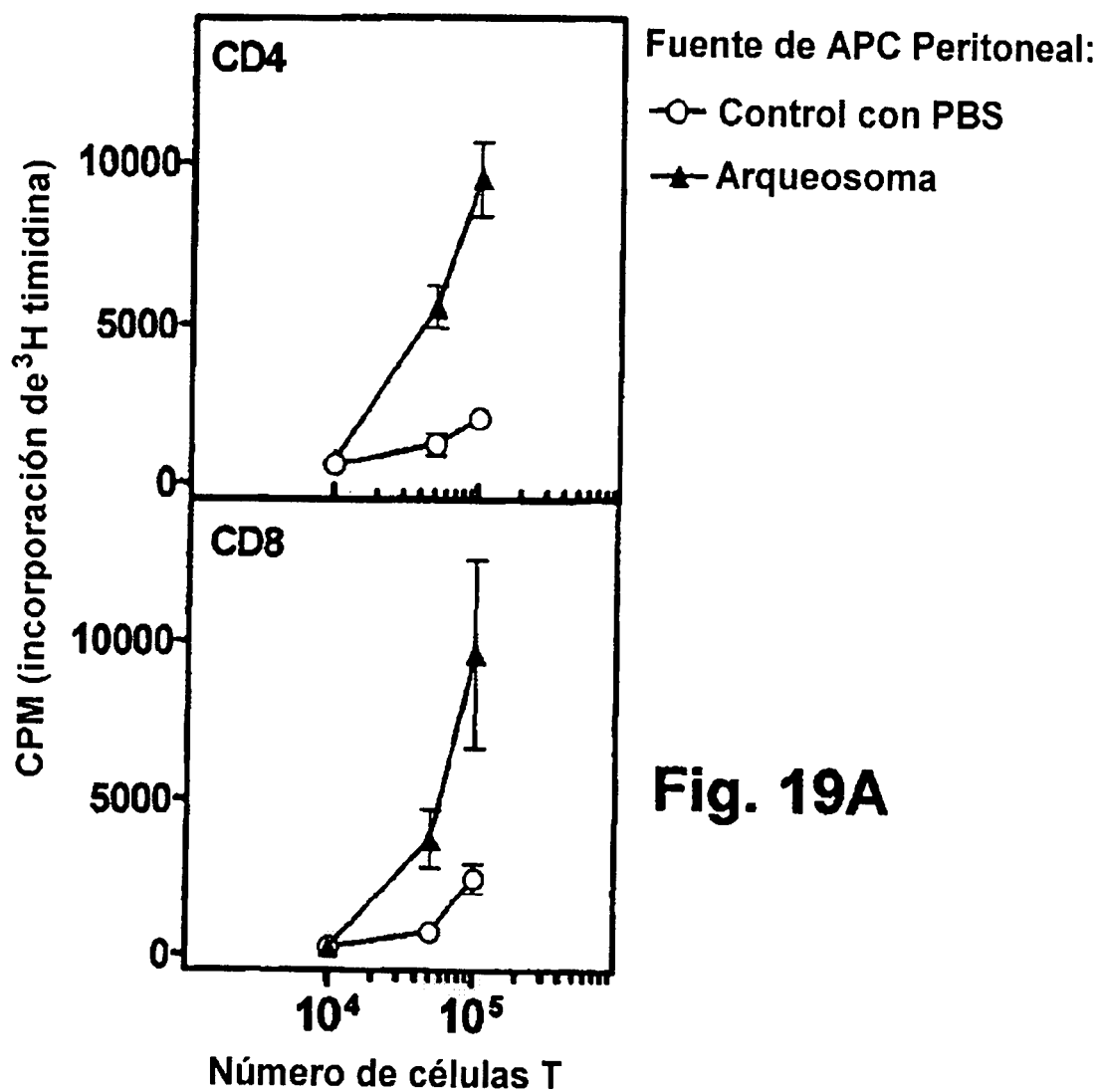


Fig. 18B





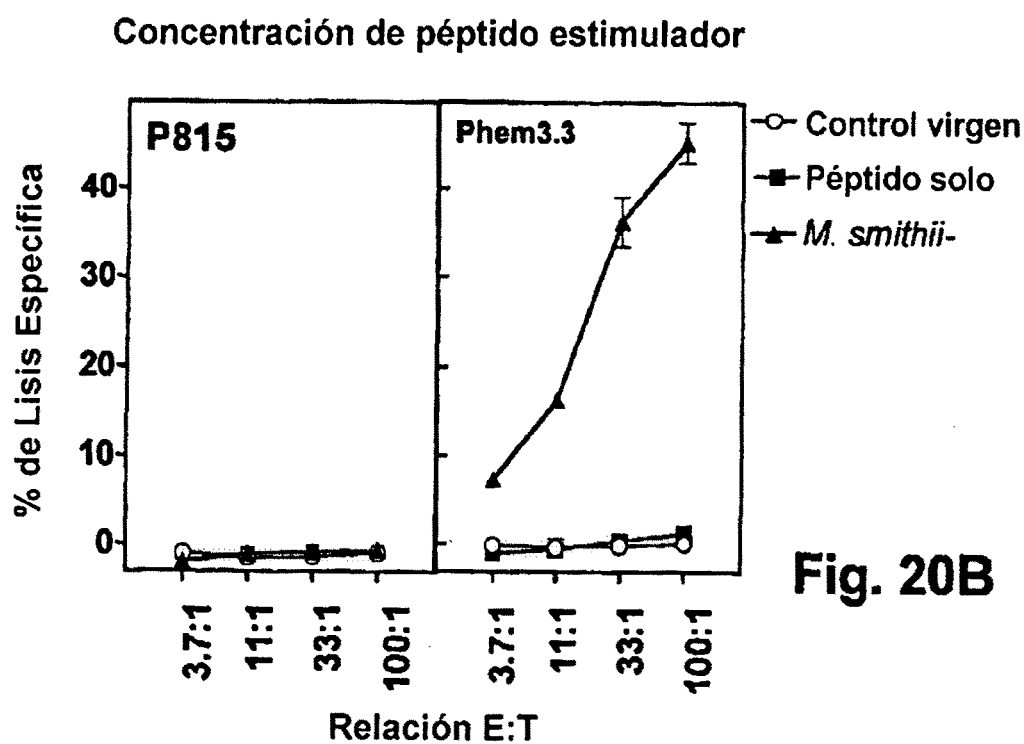
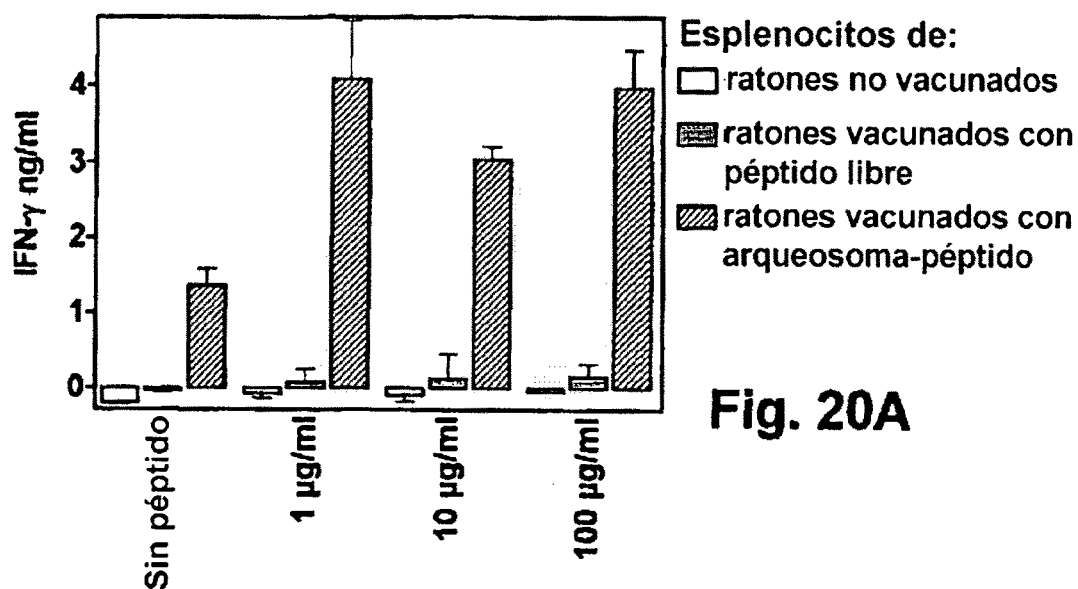


Fig. 21A

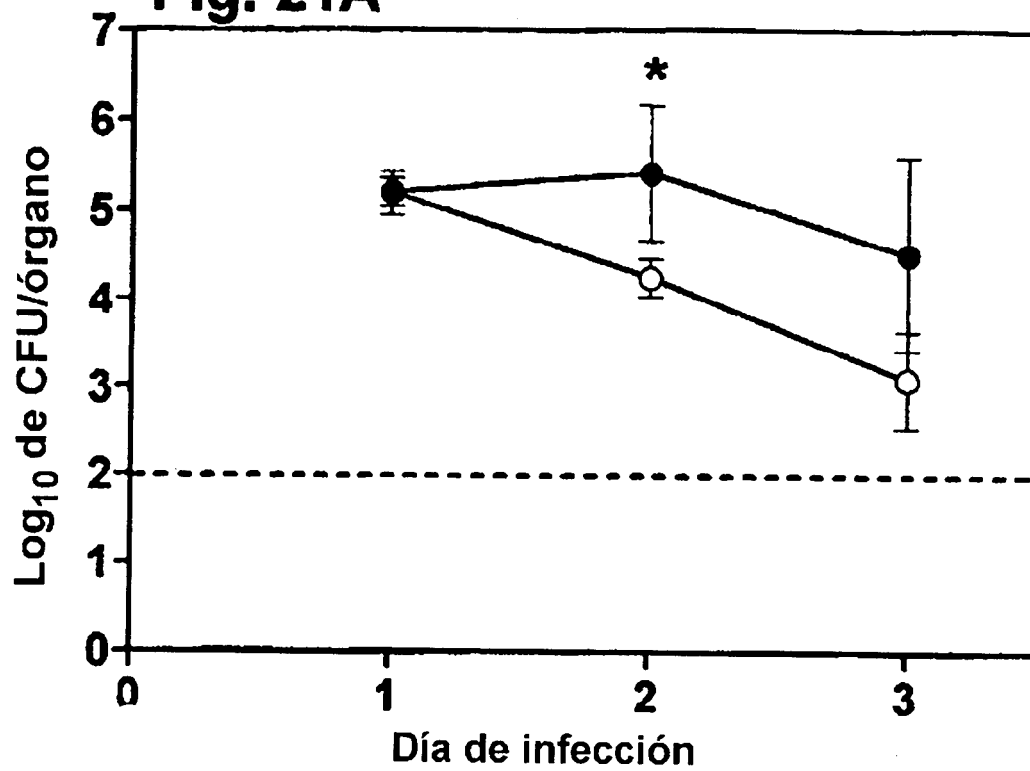
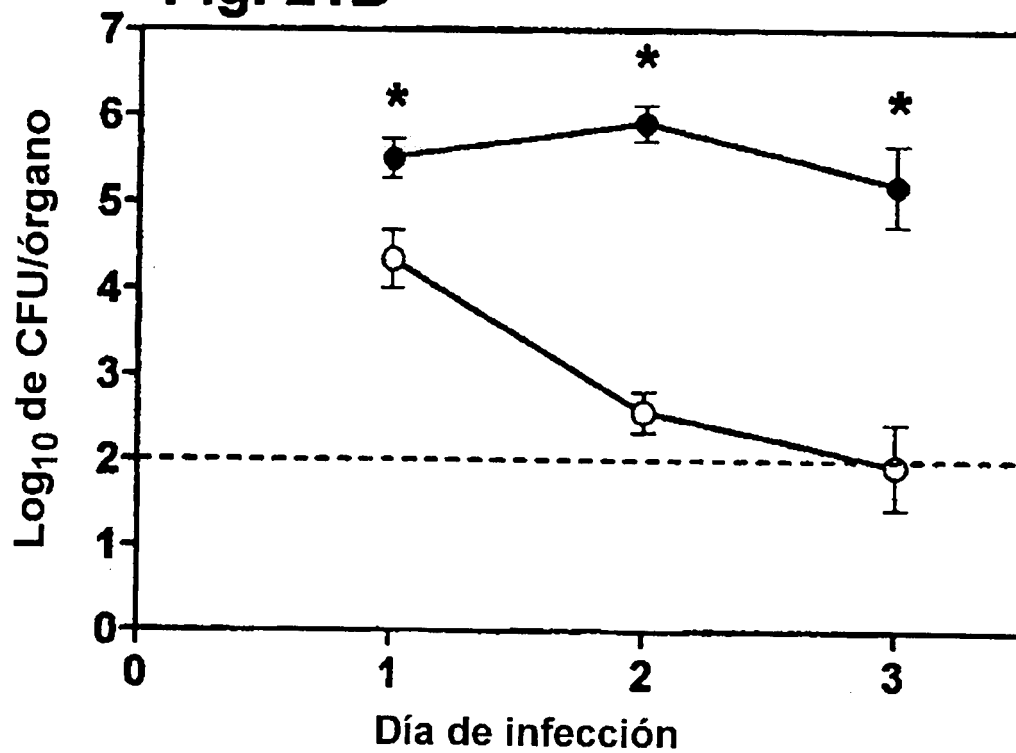


Fig. 21B



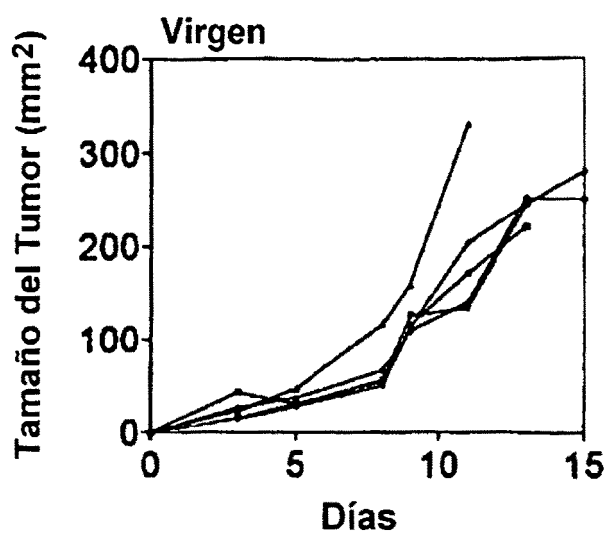


Fig. 22A

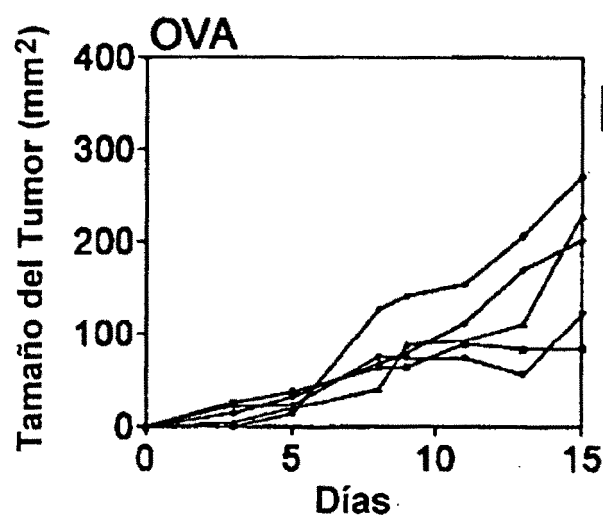


Fig. 22B

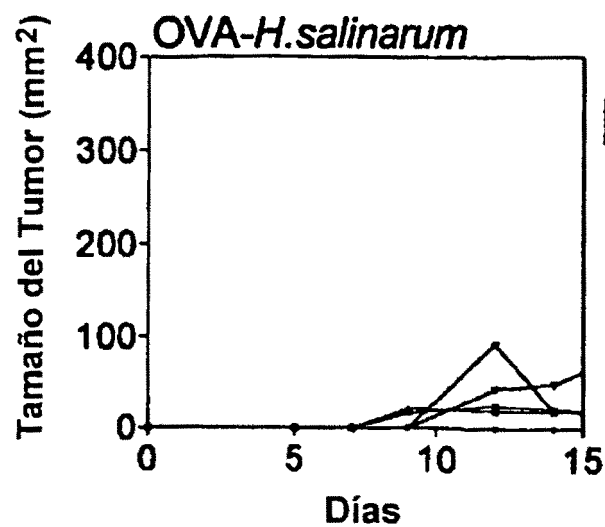
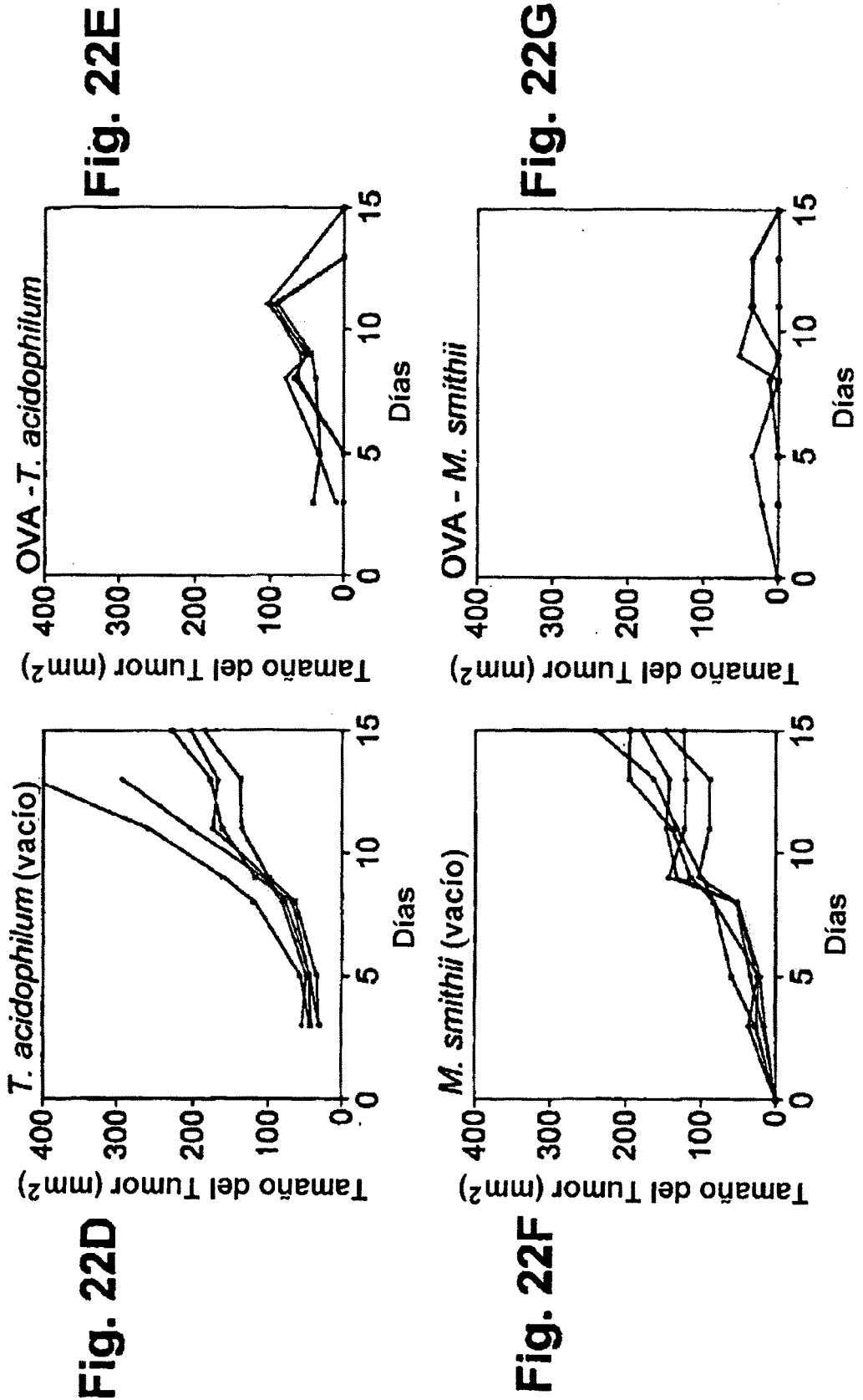


Fig. 22C



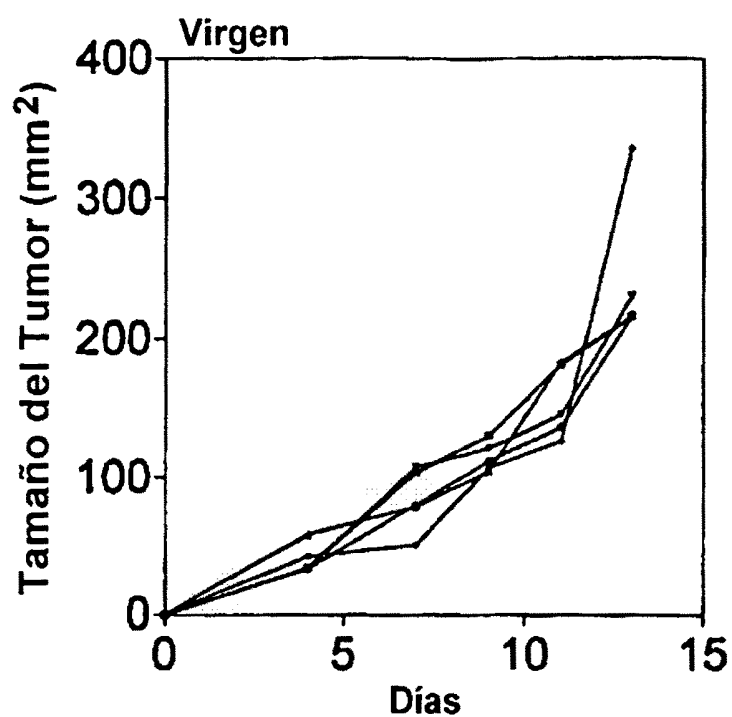


Fig. 23A

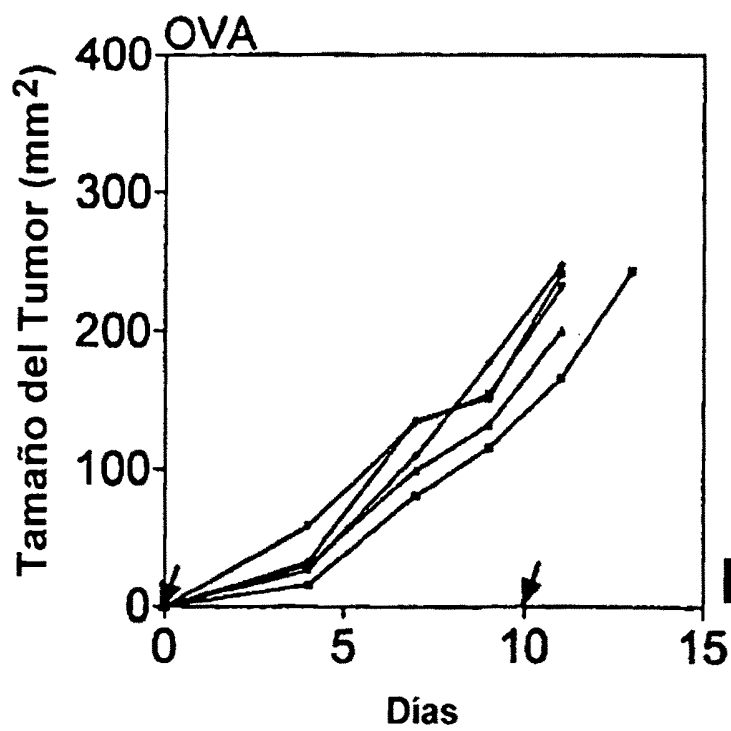


Fig. 23B

