



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 578**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04784440 .2**
96 Fecha de presentación : **17.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1663315**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Formulaciones de fármaco-lípido para la administración dirigida de fármacos a células inmunes mieloides y linfoides.**

30 Prioridad: **17.09.2003 US 503769 P**
30.04.2004 US 567376 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2011

73 Titular/es: **Rodos Bio Target GmbH**
Feodor-Lynen-Str. 23
30625 Hannover, DE

72 Inventor/es: **Gieseler, Robert, K.;**
Marquitan, Guido;
Scolaro, Michael, J. y
Sullivan, Sean, M.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 578 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de fármaco-lípido para la administración dirigida de fármacos a células inmunes mieloides y linfoides

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a las artes médicas, y en particular, a la administración dirigida de un fármaco liposomal.

2. Discusión de la técnica relacionada

10 Las células dendríticas mieloides (My-DC) pertenecen al grupo más potente de células especializadas presentadoras de antígenos, con la capacidad única de inducir respuestas inmunes celulares y humorales primarias (revisado en Banchereau J, Paczesny S, Blanco P, Bennett L, Pascual V, Fay J, Palucka AK, Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy, *Ann N Y Acad Sci* 987: 180-7 [2003]). Estas células, que se encuentran en el interior de los órganos y estructuras linfáticas, son también un importante componente del depósito de VIH, junto con otras poblaciones reserva principales, es decir, células dendríticas foliculares, macrófagos, linfocitos T latentes/de recuerdo, y las células del sistema nervioso central. (Por ejemplo, Schrager LK, D'Souza MP, Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy, *JAMA* 280: 67-71 [1998]). Es una característica clave de las células de depósito que el VIH las comprometa y aproveche, pero no las mate, llevando de esta manera a la infección continua de otras células inmunes y no inmunes en una persona infectada. (Gieseler RK, Marquitan G, Scolaro MJ, Cohen MD, Lessons from history: dysfunctional APCs, inherent dangers of STI and an important goal, as yet unmet, *Trends Immunol.* 2003; 24:11).

25 La generación *in vitro* de My-DC ha permitido la caracterización fenotípica y funcional comprehensiva de las My-DC y el estudio de la ontogenia de estas células, que se ha encontrado que comparten, con los macrófagos, un progenitor mielocito común temprano (Gieseler RK, Röber RA, Kuhn R, Weber K, Osborn M, Peters JH, Dendritic accessory cells derived from rat bone marrow precursors under chemically defined conditions *in vitro* belong to the myeloid lineage, *Eur J Cell Biol* 1991; 54: 171-81; Peters JH, Xu H, Ruppert J, Ostermeier D, Friedrichs D, Gieseler RK, Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes *in vitro*, *Adv Exp Med Biol* 1993; 329: 275-80; Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F, Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants, *Immunol Today* 1996; 17: 273-8; Gieseler R, Heise D, Soruri A, Schwartz P, Peters JH, In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes, *Dev Immunol* 1998; 6: 25-39).

30 El descubrimiento de la molécula no integrina de captura de la molécula de adhesión intercelular 3 específica de las My-DC (DC-SIGN) en el año 2000 fue un hito de la investigación inmunológica: DC-SIGN, una de las varias lectinas de tipo C, es una molécula DC clave distintiva y juega un papel esencial en la captura y el transporte migratorio del VIH. Además de la infección de linfocitos T debida a la producción de virus activo mediante las My-DC, la interacción entre VIH y DC-SIGN permite eventualmente a las My-DC infectar en trans linfocitos T auxiliares cooperadores. Análogamente, las variantes de DC-SIGN se expresan mediante macrófagos (otro depósito principal de VIH-1) así como mediante algunos tipos celulares mucosales y placentales (Soilleux, EJ y col. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and *in vitro*, *J Leukoc Biol* 71: 445-57 [2002]; Geijtenbeek, TBH y col., Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens *in vivo*, *Blood* 100: 2908-16 [2002]; Soilleux EJ y col., Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV, *J Pathol.* 195(5): 586-92 [2001]; Soilleux EJ, Coleman N, Transplacental transmission of HIV: a potential role for HIV binding lectins, *Int J Biochem Cell Biol.*; 35(3): 283-7 [2003]; Kämmerer U y col.. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy, *Am J Pathol.* 162(3): 887-96 [2003]). Estas leptinas de tipo C se consideran piezas fundamentales en la transmisión horizontal y vertical del VIH en un individuo dado (Geijtenbeek TB, van Kooyk Y, DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission, *Curr Top Microbiol Immunol* 276: 31-54 [2003]). *In vivo*, la DC-SIGN no solo se expresa por las DC mieloides, sino que también por subpoblaciones de macrófagos, que constituyen otro grupo principal de células de depósito de VIH (Soilleux EJ y col., Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and *in vitro*, *J Leukoc Biol.* 71(3): 445-57 [2002]).

50 Se sabe que DC-SIGN es un receptor de adhesión endocítico.

55 En primer lugar, las partículas unidas a DC-SIGN se transbordan a la ruta de procesamiento y presentación del antígeno MHC de clase II y acceden al mecanismo que genera la inmunidad de los linfocitos T (según sea deseable en el caso de alguna infección vírica), así como, la inmunidad de los linfocitos B (como apoyo en el aclaramiento de virus, mediante mecanismos secundarios para la generación de anticuerpos, tales como la fagocitosis mediada por el receptor Fc o, en el caso de anticuerpos citotóxicos, lisis mediada por el complemento) (por ejemplo, Schjetne KW y col., Mouse C κ -specific T cell clone indicates that DC-SIGN is an efficient target for antibody-mediated delivery of T cell epitopes for MHC class II presentation, *Int Immunol* 14(12): 1423-30 [2002]; Engering, A y col., The dendritic cell-

specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells, *J Immunol.* 168(5): 2118-26 [2002]).

En segundo lugar, Turville *y col.*, demostraron que la infección de células Th mediante las MyDC con VIH-1 es un proceso en dos fases que depende de la etapa de desarrollo de las DC, incluyendo el transporte direccional del virus a la sinapsis inmunológica, así como la síntesis activa de novo de VIH-1 a partir del ADN provírico (Turville SG, Santos JJ, Frank I *y col.* Immunodeficiency virus uptake, turnover, and two-phase transfer in human dendritic cells, *Blood*; online publication ahead of print: DOI 10.1182/blood-2003-09-3129 [2003]). Además, los importantes papeles de DC-SIGN en el transporte migratorio del virus mediante las MyDC (Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y, DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission, *Curr Top Microbiol Immunol*; 276: 31-54 [2003]) y en la infección en trans de los linfocitos T, *Cell*; 100: 587-97 [2000]), apoyan muchísimo un papel clave patogénico para estas células. Curiosamente, se ha demostrado ahora que la transferencia pasiva de las MyDC a las células Th mediante DC-SIGN requiere en primer lugar que VIH-1 se internalice en compartimentos intracelulares resistentes a la tripsina (McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ, Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions, *Science*; 300: 1295-7 [2003]; Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR, DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection, *Immunity*; 16: 135-44 [2002]). De hecho, tras la infección con VIH-1, son demostrables los compartimentos intracitoplasmáticos con virus infeccioso acumulado en MyDC inmaduras y maduras (Frank I, Piatak M Jr, Stoessel H, Romani N, Bonnyay D, Lifson JD, Pope M, Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of viruses in mature and immature DCs, *J Virol*; 76: 2936-51 [2002]).

Se ha demostrado que la Terapia Antirretrovírica Muy Activa (HAART) es eficaz para reducir la carga vírica en plasma a niveles indetectables en individuos infectados con VIH y para disminuir marcadamente el número de copias de ARN de VIH-1 en tejidos linfáticos secundarios (Wong, J.K. *y col.*, Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia, *Science*, 278: 1291-1295 [1997]; Cavert, W. *y col.*, Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection, *Science* 276(5314): 960-964 [1997]). Sin embargo, la capacidad de VIH-1 para establecer una infección latente permite a las partículas víricas persistir en tejidos a pesar de las respuestas inmunes y de la terapia antirretrovírica (Gangne J-F, Désormeaux A, Perron S, Tremblay M.J, Bergeron M.G, Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes, *Biochim Biophys Acta*, 1558: 198-210 [2002]). Se ha teorizado que la susceptibilidad de las células dendríticas de ser infectadas con VIH, junto con su función inmunológica crucial, conduce a la diseminación continua de VIH. Por tanto, se ha sugerido que la dirección de antivíricos a éstas células de depósito es una importante meta para conseguir la reconstitución permanente de la inmunidad adaptativa (Gieseler RK, Marquitan G, Scolaro MJ, Cohen MD, Lessons from history: dysfunctional APCs, inherent dangers of STI and an important goal, as yet unmet, *Trends Immunol* 24: 11 [2003]).

Los liposomas son un vehículo adecuado para administrar específicamente compuestos encapsulados a cualquier tipo de célula dado, con la condición de la existencia de una estructura directora apropiada. Debido a su expresión celular muy restringida, DC-SIGN está cualificada como dicha molécula directora. Los inventores ya habían demostrado inicialmente la inhibición de la propagación de VIH en leucocitos mononucleares de sangre periférica infectados después de la administración liposomal de ADN de sentido directo dirigido hacia el sitio aceptor de corte y empalme 5' *tat* de VIH (Sullivan SM, Gieseler RK, Lenzner S, Ruppert J, Gabrysiak TG, Peters JH, Cox G, Richer L, Martin WJ, Scolaro MJ, Inhibition of human immunodeficiency virus-1 proliferation by liposome-encapsulated sense DNA to the 5' *tat* splice acceptor site, *Antisense Res Dev*; 2: 187-97 [1992]).

Debido al descubrimiento en los años 60 de que la hidratación de películas secas de lípidos forma vesículas o liposomas esféricos encerrados que asemejan orgánulos celulares en miniatura con bicapas de lípidos, se reconoció el uso potencial de complejos de lípido-fármaco como vehículos de fármacos biodegradables o biocompatibles para aumentar la potencia y reducir la toxicidad de las terapias (por ejemplo, Bangham AD, Liposomes: the Babraham connection, *Chem Phys Lipids* 64: 275-285 [1993]). Se ha observado desde hace mucho tiempo a los complejos de lípido-fármaco como un medio potencial para mejorar el Índice Terapéutico (IT) de los fármacos incrementando su localización en los órganos, tejidos o células específicos. Este IT es la relación entre la dosis tóxica promedio (DT50) y la dosis eficaz promedio (DE50) de un fármaco particular. Sin embargo, la aplicación de complejos de lípido-fármaco a sistemas de administración de fármacos no se realizó hasta 30 años después. Únicamente cuando la primera serie de terapéuticas basadas en liposomas fue aprobada para uso humano por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). Se han usado liposomas como vehículos de fármacos en aplicaciones farmacéuticas desde mediados de los años 90 (Lian, T. *y Ho*, R.J.Y., Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems, *J. Pharm. Sci.* 90 (6): 667-80 [2001]).

Aunque el constituyente lípido puede variar, muchas formulaciones usan productos sintéticos de fosfolípidos naturales, principalmente fosfatidilcolina. La mayor parte de las formulaciones de liposomas aprobadas para uso humano contienen fosfatidilcolina (carga neutra), con cadenas de ácido graso de longitudes y grados de saturación variables, como bloque de construcción de la membrana principal. Se incluye a menudo una fracción de colesterol (~30 mol %) en la formulación lípida para modular la rigidez y para reducir la inestabilidad inducida por el suero producida por la unión de las proteínas séricas a la membrana del liposoma.

Basándose en la composición del grupo de cabeza del lípido y el pH, los liposomas pueden soportar una carga negativa, neutra, o positiva en su superficie. La naturaleza y la densidad de la carga en la superficie de los liposomas influencia la estabilidad, la cinética, y la extensión de la biodistribución, así como la interacción con y la captación de liposomas por las células dianas. Los liposomas con una carga superficial neutra tienen una tendencia menor a aclararse por las células del sistema reticuloendotelial (SRE) tras la administración sistémica y la tendencia más elevada a agregarse. Aunque los liposomas cargados negativamente reducen la agregación y tienen aumentada la estabilidad en suspensión, su captación celular no específica está aumentada *in vivo*. Se observó que los liposomas cargados negativamente que contenían fosfatidilserina (PS) o fosfatidilglicerol (PG) experimentaban endocitosis a una velocidad más rápida y en una extensión mayor que los liposomas neutros (Allen TM, y col., Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly (ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*, Biochim Biophys Acta 1066: 29-36 [1991]; Lee RJ, y col., Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin *in vitro*, Biochim. Biophys. Acta 1233: 134-144 [1995]). Una variedad de receptores de diversos tipos celulares reconocen la carga superficial negativa, incluyendo los macrófagos (Allen TM y col. [1991]; Lee RJ, y col., Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis, J Biol Chem 269: 3198-3204 [1994]).

La inclusión de algunos glicolípidos, tales como el gangliósido GM₁ o el fosfatidilinositol (PI), inhibe la captación por los macrófagos y las células de SRE y da como resultado tiempos de circulación más largos. Se ha sugerido que una pequeña cantidad de lípidos cargados negativamente estabilizan los liposomas neutros frente a un mecanismo de captación dependiente de agregación (Drummond DC, y col., Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors, Pharmacol Rev 51: 691-743 [1999]). Los liposomas cargados positivamente (es decir, catiónicos), se usan a menudo como un reactivo de condensación de ADN para la administración del ADN intracelular en la terapia génica, que tienen una elevada tendencia para interactuar con proteínas séricas; esta interacción a como resultado un aumento de la captación por el SRE y un eventual aclaramiento por el pulmón, el hígado, o el bazo. Este mecanismo de aclaramiento del SRE explica en parte la baja eficacia de transfección *in vivo*. Otros factores, que incluyen la inestabilidad del ADN, el aclaramiento inmunomediado, respuestas inflamatorias, y la accesibilidad al tejido, pueden contribuir también a una baja eficacia de transfección en animales. De hecho, elevadas dosis de liposomas cargados positivamente han demostrado producir grados variables de inflamación tisular (Scheule RK, y col., Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to the mammalian lung, Hum Gene Ther 8: 689-707 [1997]).

La superficie de la membrana del liposoma puede estar modificada para reducir la agregación y evitar el reconocimiento por el SRE que usa polímeros hidrófilos. Esta estrategia se denomina a menudo hidratación superficial o modificación estérica. La modificación superficial se lleva a cabo a menudo incorporando gangliósidos, tales como GM₁, o lípidos que están químicamente conjugados a polímeros higroscópicos o hidrófilos, normalmente polietilenglicol (PEG). Esta tecnología es similar a la PEGilación de la proteína. En vez de conjugar el PEG a las proteínas terapéuticas tales como la adenosina desaminasa (Alderasa, para el tratamiento de síndrome de inmunodeficiencia combinada grave) para reducir el inmunorreconocimiento y el aclaramiento rápido (Beauchamp C, y col., Properties of a novel PEG derivative of calf adenosine deaminase, Adv Exp Med Biol 165: 47-52 [1984]), se conjuga PEG a la amina terminal de fosfatidiletanolamina. Esta presencia añadida de polímeros hidrófilos en la superficie de la membrana del liposoma proporciona una capa de hidratación superficial adicional (Torchilin VP, Immunoliposomes and PEGylated immunoliposomes: possible use of targeted delivery of imaging agents, Immunomethods 4: 244-258 [1994]). Los liposomas resultantes no pueden ser reconocidos como partículas extrañas ni por los macrófagos ni por las células del SRE, y de esta manera, escapan al aclaramiento fagocítico. Numerosos estudios sistemáticos han determinado el tamaño óptimo del polímero de PEG y la densidad del lípido de PEG polimérico respectivo en la membrana del liposoma.

Las investigaciones iniciales han demostrado que el tamaño de los liposomas afecta la distribución de vesículas y el aclaramiento tras la administración sistémica. La velocidad de captación de liposomas por el SRE aumenta con el tamaño de las vesículas (Hwang K, Liposome pharmacokinetics, En: Ostro MJ, editor, Liposomes: from biophysics to therapeutics, Nueva York: Marcel Dekker, pp. 109-156 [1987]). Aunque puede saturarse la captación del SRE *in vivo* a elevadas dosis de liposomas o mediante predosificación con grandes cantidades de liposomas del control, esta estrategia puede no ser práctica para uso humano debido a los efectos adversos relacionados con el desequilibrio mantenido de las funciones fisiológicas del SRE. La tendencia general de los liposomas de composición similar es que un aumento de tamaño da como resultado un aumento de la captación por el SRE (Senior J, y col., Tissue distribution of liposomes exhibiting long half-lives in the circulation after intravenous injection, Biochim Biophys Acta 839: 1-8 [1985]). Las investigaciones más recientes han usado vesículas unilamelares, de 50-100 nm de tamaño, para aplicaciones sistémicas de administración de fármacos. Por ejemplo, el producto de liposoma antifúngico AmBisome se formula con la especificación de tamaño de 45-80 nm para reducir la captación del SRE. La unión de la proteína del suero es un importante factor que afecta el tamaño de los liposomas y aumenta la velocidad de aclaramiento *in vivo*. La activación del complemento por los liposomas y la opsonización dependen del tamaño de los liposomas (Devine DV, y col., Liposome-complement interaction in rat serum: Implications for liposome survival studies, Biochim Biophys Acta 1191: 43-51 [1994]; Liu D, y col., Recognition and clearance of liposomes containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin, Biochim Biophys Acta 1235: 140-146 [1995]). Incluso con la inclusión de PEG en las composiciones de liposomas para reducir la unión de la proteína del suero a los liposomas, el límite superior de tamaño de los liposomas de PEG-PE de tiempo prolongado de circulación es de ~200 nm.

Debido a las restricciones biológicas, el desarrollo de grandes liposomas (> 500 nm) con un tiempo prolongado de circulación que usan procedimientos de estabilización estérica, no ha sido satisfactorio. Por tanto, las consideraciones del tamaño de los liposomas y su control en la fabricación en una etapa inicial de desarrollo del fármaco proporcionan un medio para optimizar la eficacia de los sistemas de liposomas para administración de fármacos.

Los mecanismos exactos de biodistribución y disposición *in vivo* varían dependiendo de la composición, el tamaño, la carga, y el grado de hidratación superficial/impedimento estérico de los lípidos. Adicionalmente, la ruta de administración puede influenciar también la disposición *in vivo* de los liposomas. Inmediatamente después de la administración intravenosa, los liposomas se revisten normalmente con proteínas séricas y son captados por células del SRE y eventualmente eliminados (Chonn A, y col., Association of blood proteins with large unilamellar liposomes *in vivo*. Relation to circulation lifetimes, J Biol Chem 267: 18759-18765 [1992]; Rao M, y col., Delivery of lipids and liposomal proteins to the cytoplasm and Golgi of antigen-presenting cells, Adv Drug Deliv Rev 41: 171-188 [2000]). Las proteínas plasmáticas que pueden interactuar con liposomas incluyen albúmina, lipoproteínas (es decir, lipoproteína de elevada densidad [HDL], lipoproteína de baja densidad [LDL], etc) y proteínas asociadas a células. Algunas de estas proteínas (por ejemplo, la HDL¹) pueden eliminar fosfolípidos de la bicapa del liposoma, desestabilizando por tanto los liposomas. Este proceso puede conducir potencialmente a una pérdida o disociación prematura de los fármacos de los liposomas.

Una de las propiedades clave que hacen de los liposomas un sistema de administración de fármacos muy valioso es su capacidad de modular la farmacocinética de fármacos asociados y encapsulados en liposomas (Hwang KJ, Padki MM, Chow DD, Essien HE, Lai JY, Beaumier PL, Uptake of small liposomes by non-reticuloendothelial tissues, Biochim Biophys Acta; 901(1): 88-96 [1987]; Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A, Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*, Biochim Biophys Acta; 1066(1): 29-36 [1991]; Allen TM, Austin GA, Chonn A, Lin L, Lee KC, Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size, Biochim Biophys Acta; 1061(1): 56-64 [1991]; Hwang, K. [1987]; Allen T, y col., Pharmacokinetics of long-circulating liposomes, Adv Drug Del Rev 16: 267-284 [1995]). Con respecto a los mismos fármacos en disolución acuosa, son aparentes cambios significativos en la absorción, biodistribución, y aclaramiento del fármaco asociado a liposoma, dando como resultado drásticos efectos sobre la eficacia y la toxicidad de los compuestos atrapados (Gabizon A, Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy, Adv Drug Del Rev 16: 285-294 [1995]; Bethune C, y col, Lipid association increases the potency against primary medulloblastoma cells and systemic exposure of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) in rats, Pharm Res 16: 896-903 [1999]). Sin embargo, las aplicaciones de liposomas sistémicamente administrados han sido limitadas debido a su rápido aclaramiento del torrente sanguíneo y su captación por el SRE (Alving C, y col., Complement-dependent phagocytosis of liposomes: suppression by 'stealth' lipids, J Liposome Res 2: 383-395 [1992]).

Como ya se ha mencionado, se puede aumentar el tiempo de circulación reduciendo el tamaño del liposoma y modificando el efecto superficial/estérico mediante derivados de PEG. También, están disponibles ahora liposomas con membranas diseñadas para tener una estabilidad suficiente para el aclaramiento por escape mediante el SRE. Por tanto, se pueden usar liposomas de circulación prolongada que reducen también significativamente los perfiles toxicológicos de los fármacos respectivos para mantener y extender los niveles plasmáticos del fármaco. Incluso aunque solo una pequeña fracción de liposomas se acumula eventualmente en sitios dianas, una circulación prolongada puede potenciar indirectamente la acumulación de fármacos asociados a liposomas a los tejidos dianas.

Es un deseo potenciar activamente el direccionamiento de los liposomas con el fin de dirigirlos a las poblaciones celulares de interés antes de que se produzca un aclaramiento sustancial por el SER. Por ejemplo, se han empleado inmunoliposomas para dirigir depósitos de eritrocitos de parásitos intracelulares de la malaria (Owais, M. y col., Chloroquine encapsulated in malaria-infected erythrocyte-specific antibody-bearing liposomes effectively controls chloroquine-resistant Plasmodium berghei infections in mice, Antimicrob Agents Chemother 39(1): 180-4 [1995]; Singh, AM y col., Use of specific polyclonal Antibodies for site specific drug targeting to malaria infected erythrocytes *in vivo*, Indian J Biochem Biophys 30(6): 411-3 [1993]).

Es también un deseo aplicar sistemas de administración de lípido-fármaco para la lucha contra la pandemia del VIH/SIDA. Se estima que más de 42 millones de personas viven actualmente con VIH/SIDA (ONUSIDA [2002; 2003]). Esta figura global ha sido proyectada para aumentar considerablemente ya que si no aumentan los medios para mantener contenida esta infección, se desarrollará e introducirá en la comunidad global (Morens DM, Folkers GK, Fauci AS, The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases, Nature; 430: 242-9 [2004]).

Fármacos anti-VIH, tales como análogos de nucleósidos (por ejemplo, derivados de didesoxinucleósidos, que incluyen 3'-azido-3'-desoxitimidina [AZT], ddC, y ddl), inhibidores de la proteasa, o fosfonoácidos (por ejemplo, ácidos fosfonofórmico y fosfonoacético), han sido previamente derivatizados con lípidos o incorporados en liposomas (por ejemplo, KY y col., Methods of treating viral infections using antiviral liponucleotides, N° de Serie. 09/846.398, documento US 2001/0033862; Patente de los Estados Unidos N° 5.223.263; Hostetler, KY y col., Lipid derivatives of phosphonoacids for liposomal incorporation and method of use, Patente de los Estados Unidos N° 5.194.654; Gagné JF y col., Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes, Biochim Biophys Acta 1558(2): 198-210 [Feb. 2002]). Además, en un informe, la inyección subcutánea de ddl

encapsulado en liposomas a ratones C57BL/6, dio como resultado una baja acumulación de liposomas en los nódulos linfáticos, en comparación con la inyección intravenosa (Harvie, P y col, Lymphoid tissues targeting of liposome-encapsulated 2',3'-dideoxyinosine, AIDS 9(7): 701-7 [1995]).

5 Se ha descrito el uso de moléculas específicas de vectores acopladas a, o incluidas dentro de una superficie de liposoma, para la administración transmembrana potenciada y la captación de compuestos encapsulados en liposomas que se administrarían de otra manera solo insuficientemente en una célula, o que no se administrarían eficazmente a un orgánulo celular específicamente deseable (revisado en: Torchilin VP, Lukyanov AN, Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions, Drug Discov Today 15 de marzo de 2003 ;8(6): 259-66; Sehgal A, Delivering peptides and proteins to tumors, Drug Discov. Today 8(14): 619 [2003]; Koning GA, Storm G, Targeted drug delivery systems for the intracellular delivery of macromolecular drugs, Drug Discov Today 1 de junio de 2003 ; 8(11): 482-3). Dichas moléculas de vectores incluyen los dominios de transducción de proteínas así denominados (PTD), que se derivan de diversos virus o de *Drosophila antennapedia*. De especial interés para la aplicación en la enfermedad por VIH son los Tat de VIH y sus derivados que actúan como PTD (por ejemplo, Schwarze, S.R, y col., In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse, Science 15 285: 1569-72 [1999]).

20 Se han encapsulado fármacos anti-VIH en el núcleo acuoso de inmunoliposomas, que incluyen en sus superficies externas ligandos dianas específicos de antígenos (por ejemplo, Bergeron, MG. y col., *Targeting of infectious agents bearing host cell proteins*, documento WO 00/66173 A3; Bergeron, MG. y col., *Liposomes encapsulating antiviral drugs*, Patente de los Estados Unidos N° 5.773.027; Bergeron, MG. y col., *Liposome formulations for treatment of viral diseases*, documento WO 96/10399 A1; Gagné JF y col., Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes, Biochim Biophys Acta 1558(2): 198-210 [2002]; Dufresne I y col., Targeting lymph nodes with liposomes bearing anti-HLA-DR Fab' fragments, Biochim Biophys Acta 1421(2): 284-94 [1999]; Bestman-Smith J y col., Sterically stabilized liposomes bearing anti-HLA-DR antibodies for targeting the primary cellular reservoirs of HIV-1 Biochim Biophys Acta 1468(1-2): 161-74 [2000]; Bestman-Smith J y col., Targeting cell-free HIV and virally-infected cells with anti-HLA-DR immunoliposomes containing amphotericin B, AIDS 10; 14(16): 2457-65 [2000]).

30 Existen muchos ejemplos de liposomas dirigidos con anticuerpos en modelos animales. Actualmente, existe al menos un liposoma dirigido con anticuerpo, denominado DOXIL, evaluado clínicamente. Empleando un anticuerpo monocatenario que se había estimulado contra HER2/neu, se dirige a algunos tipos de cáncer de mama. Desarrollada por Papahadjopoulos y sus colaboradores en la UCSF, esta variante directora mediada por anticuerpo se está evaluando actualmente en ensayos clínicos en el National Cancer Institute (por ejemplo, Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Moore D, Papahadjopoulos D, Benz CC, Anti-HER2 Immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery, Clin Cancer Res. Abril de 2002; 8(4):1172-81 [2002]).

35 Los intentos para dirigir de manera activa liposomas contra poblaciones de células linfáticas han tenido cierto éxito. Bestman-Smith y col. (2000) informaron que tras la inyección subcutánea de inmunoliposomas que llevaban fragmentos Fab' contra-HLA-DR en ratones, se produjo una acumulación de inmunoliposomas en tejidos linfáticos (Bestman-Smith J y col., Targeting cell-free HIV and virally-infected cells with anti-HLA-DR immunoliposomes containing amphotericin B, AIDS 10; 14(16): 2457-65 [2000]). Gagné JF y col. [2002] informaron que las inyecciones subcutáneas de fármacos anti-VIH encapsulados en inmunoliposomas dio como resultado una acumulación del fármaco en los nódulos linfáticos de los ratones inyectados con toxicidad relativamente baja, en comparación con la administración del fármaco libre; no hubo diferencia significativa informada en la capacidad de los inmunoliposomas dirigidos contra HLA-DR que contenían indinavir de inhibir la replicación de VIH-1 en células OPM1 infectadas, en comparación en comparación con indinavir libre o complejos de liposomas-indinavir no dirigidos. Copland y col, dirigieron los receptores de la manosa de células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DC) e informaron que los liposomas manosilados se unían preferentemente y eran capturados por Mo-DC a 37°C, en comparación con liposomas neutros no manosilados y liposomas cargados negativamente (Copland, MJ y col., Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells, Vaccine 21: 883-90 [2003]).

50 La presente invención proporciona un complejo de lípido-fármaco que comprende un fármaco y que comprende además en la superficie externa unos ligandos directores que unen específicamente en la superficie de una célula inmune al menos una de las siguientes combinaciones de marcadores

CD209 y CD4; o

CD209 y CD45R0

55 La presente invención se dirige por tanto, *entre otras*, a la necesidad de hacer diana en los depósitos del VIH, el virus de la hepatitis C (VHC) en células mieloides, particularmente en células dendríticas y macrófagos, así como en células dendríticas foliculares de origen mieloides, de las personas infectadas con VIH y de aquellas que padecen SIDA, o de las personas infectadas o infectadas simultáneamente con VHC y las que padecen de alteraciones patológicas del hígado dependientes de VHC. Además, la presente invención puede permitir el direccionamiento indirecto de células linfáticas, particularmente de linfocitos T, tras su interacción física con células mieloides.

Además, la presente invención puede permitir la eliminación específica, o la modulación con disminución, de células de tumores malignos o de células inmunes que median la autoinmunidad; la potenciación de la inmunización tumoral autóloga dependiente de DC; la regulación en disminución terapéutica de las enfermedades autoinmunes; o la estimulación trópica de DC de la inmunidad adaptativa específica (ambas en términos de vacunación o tratamiento) contra patógenos comunes, o patógenos potencialmente empleados como agentes de bioterrorismo, para los cuales no existe actualmente protección eficaz. La presente invención puede permitir también el avance biotecnológico, tal como, *entre otros*, dirigiendo las DC para aumentar la producción de anticuerpos monoclonales, o permitiendo la producción de dichas inmunoglobulinas que no se pueden inducir en ausencia de dirección de DC liposómica inductiva.

10 **Resumen de la invención**

La presente invención se refiere a un complejo de lípido-fármaco que comprende un fármaco y que comprende además unos ligandos directores en la superficie externa que unen específicamente en la superficie de una célula inmune al menos una de las siguientes combinaciones de marcadores

CD209 y CD4; o

15 CD209 y CD45R0

en el que dicho fármaco es un agente inmunomodulador que es activo en una célula inmune dirigida mediante dicho ligando director y en el que dicho ligando director es un anticuerpo monoclonal.

Los liposomas dirigidos de la invención son útiles para dirigir células inmunes, tales como células dendríticas.

La presencia de VIH-1 en células de depósito, por ejemplo, células dendríticas, conduce a la infección continua *de novo* de los linfocitos T indiferenciados en el interior de los órganos y tejidos linfáticos de una persona infectada. Se ha teorizado que la erradicación de dichos sitios de reserva puede eliminar eventualmente el VIH-1 del individuo. La presente invención proporciona un sistema director que, mediante ligandos directores tales como la molécula DC-SIGN específica de célula dendrítica, administra compuestos químicos directamente en el interior de estas células. De esta manera, la presente invención es particularmente ventajosa para administrar fármacos antivíricos, empaquetados en inmunoliposomas, a células inmunes derivadas de células mieloides y linfoides que albergan VIH-1 o VIH-2, tales como el depósito de VIH en las células dendríticas. Otro beneficio de la presente invención, al dirigir activamente células inmunes, está en proporcionar estrategias de vacunación contra VIH (por ejemplo, Steinman RM, Granelli-Piperno A, Pope M, Trumpfheller C, Ignatius R, Arrode G, Racz P, Tenner-Racz K, The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells, *Curr Top Microbiol Immunol* 276: 1-30 [2003]; Pope M, Dendritic cells as a conduit to improve HIV vaccines, *Curr Mol Med* 3: 229-42 [2003]). Los beneficios adicionales proporcionados por la presente invención incluyen la utilidad en el tratamiento de dolencias que implican la proliferación anormal de células inmunes, por ejemplo, cánceres linfáticos primarios y metastásicos (linfomas y leucemias), tumores sólidos o sus restos postquirúrgicos, o enfermedades autoinmunes, que incluyen específicamente la dirección de células inmunes en aplicaciones de terapia génica. La presente invención proporciona también un medio de dirigir células dendríticas para facilitar la producción de vacunas antiinfecciosas, vacunas anti-bioterrorismo, vacunas anticancerosa, o herramientas biotecnológicas y terapéuticas tales como anticuerpos monoclonales

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el direccionamiento dependiente del tiempo de liposomas marcados con calceína a las Mo-DC mediado por DC-SIGN u otros ligandos directores, que incluyen combinaciones biespecíficas, La columna titulada "Expresión del antígeno" muestra la expresión fenotípica del(de los) marcador(es) respectivo(s), tal como se ensayó solo con los mAb. La detección se realizó mediante citometría de flujo con colorante fluorescente conjugado con mAb, isotiocianato de fluoresceína-5 (FITC); la columna "Unión/captación de LS" muestra el direccionamiento y la captación satisfactorios, tal como se evidenció mediante la administración intracelular de un colorante fluorescente encapsulado en liposoma, la calceína.

La Fig. 2 muestra el direccionamiento liposómico mono-específico con respecto a la cinética y a la eficacia. Se generaron MoDC maduras de acuerdo con el protocolo descrito en el presente documento y se investigaron para la captación de diferentes construcciones de liposomas-proteínas A dianas dotados con mAb dirigidos contra CD4, CD14, CD45R0 o CD209. Las MoDC se incubaron simultáneamente con los liposomas durante 1, 3 o 24 h y a continuación se cosecharon y se ensayaron mediante citometría de flujo. Se usaron los mAb del control para detectar la expresión superficial celular de los respectivos antígenos (columna encabezada por "Marcador de expresión"). Las curvas vacías indican los controles del isotipo; las curvas sombreadas indican las condiciones del ensayo. Los dos paneles llevan cruces en negrita que muestran las intensidades de fluorescencia promedio más elevadas, que indican las tasas más elevadas de captación de calceína.

La Fig. 3 ilustra el direccionamiento liposómico de las DC mediante dos marcadores celulares (denominados de direccionamiento biespecífico), que incluyen la dependencia del tiempo de la eficacia del direccionamiento durante un periodo de 24 h. Se generaron MoDC maduras de acuerdo con el protocolo descrito en el presente documento y se investigaron para la captación de diferentes construcciones de liposomas-Proteínas A dianas dotados con

combinaciones de 2 miembros de mAb dirigidos contra CD4, dirigidos contra CD45R0 y dirigidos contra CD209. Se incubaron simultáneamente las MoDC con los liposomas durante 1, 3 o 24 h y a continuación se cosecharon y se ensayaron mediante citometría de flujo. Se usaron los mAb del control para detectar la expresión superficial celular de los respectivos antígenos (columna encabezada por "Marcador de Expresión"). Las curvas vacías indican los controles del isotipo; las curvas sombreadas indican las condiciones del ensayo. La Fig. 3A muestra los resultados de la combinación de los ligandos directores anti-CD4 más anti-CD45R0. La Fig. 3B muestra los resultados de la combinación de los ligandos directores anti-CD4 más anti-CD209. La Fig. 3C muestra los resultados de la combinación de los ligandos directores anti-CD45R0 más anti-CD209.

La Fig. 4 ilustra los valores calculados para el direccionamiento y la unión superficial de los inmunoliposomas aplicados a las MoDC. Se proporcionan en la Fig. 4A y en la Fig. 4B los porcentaje de las MoDC que expresan los marcadores de selección (fluorescencia FTTC; la Fig. 4A muestra los promedios aritméticos y los extremos superiores de n = 2 experimentos independientes; la Fig. 4B muestra los factores derivados de los promedios aritméticos), y las MoDC dirigidas con los correspondientes inmunoliposomas (fluorescencia con calceína).

La Fig. 5 muestra la unión superficial frente a la internalización de los liposomas dirigidos tal como se determinó mediante microscopio de fluorescencia. Aumentos del original: x 1000 (paneles 1 y 2) y x 400 (paneles 3-8)

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

La presente invención se refiere a un complejo de lípido-fármaco que comprende un fármaco y que comprende además unos ligandos directores en la superficie externa que unen específicamente en la superficie de una célula inmune al menos una de las siguientes combinaciones de marcadores

CD209 y CD4; o

CD209 y CD45R0

En algunas formas de realización, la administración del fármaco es *in vitro*, y en otras formas de realización, la administración del fármaco es *ex vivo*.

Las células inmunes diana incluyen células progenitoras mieloides, monocitos, células dendríticas (DC), macrófagos y linfocitos T.

Los monocitos son uno de los tipos de células producidos mediante el linaje de diferenciación mieloides de la médula ósea. Se ha demostrado que las DC se pueden derivar igualmente de monocitos o de otros tipos de células, es decir, principalmente de células progenitoras, generadas dentro del linaje mieloides (por ejemplo, Peters JH, Ruhl S, Friedrichs D, Veiled accessory cells deduced from monocytes, *Immunobiology* 176(1-2): 154-66 [1987]; Gieseler R, Heise D, Soruri A, Schwartz P, Peters JH, In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes, *Dev. Immunol.* 6(1-2): 25-39 [1998]; Gieseler R, Röhler R-A, Kuhn R, Weber K, Osborn M, Peters JH, Dendritic accessory cells derived from rat bone marrow precursors under chemically defined conditions *in vitro* belong to the myeloid lineage, *Eur J Cell Biol* 54(1): 171-81 [1991]). Como consecuencia, las células dendríticas derivadas de monocitos (MoDC) son un subconjunto de MyDC.

Una célula dendrítica incluye una "célula dendrítica mieloides" (My-DC), es decir, una "DC derivada de linaje mieloides", que incluye una célula dendrítica derivada de monocito (Mo-DC) así como otros tipos de DC tales como, por ejemplo, células dendríticas derivadas de promonocitos (por ejemplo, Steinbach F, Gieseler R, Soruri A, Krause B, Peters JH, dedujeron DC Mieloides procedentes de monocitos, los datos *in vitro* e *in vivo* apoyan un origen monocítico de las DC, *Adv Exp Med Biol.* 1997; 417: 27-32 [1997]). Una célula dendrítica incluye también una "célula dendrítica linfoides" (Ly-DC), es decir, una "DC derivada de linaje linfoides": el único tipo de DC actualmente conocido que deriva del linaje linfoides es la célula dendrítica plasmacitoide (pc-DC) (Facchetti F, Vermi W, Mason D, Colonna M, The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells, *Virchows Arch;* 443(6): 703-17. E pub 28 de Oct de 2003 [2003]). Una célula dendrítica incluye también una célula dendrítica folicular (FDC). Siguen existiendo actualmente controversias sobre si las FDC derivan del linaje mieloides, linfoides o uno diferente; (Haberman AM, Shlomchik MJ, Reassessing the function of immune-complex retention by follicular dendritic cells, *Nat Rev Immunol;* 3(9): 757-64 [2003]). Para una visión de conjunto de todos los tipos de células dendríticas, consultar a Donaghy H, Stebbing J, Patterson S, Antigen presentation and the role of dendritic cells in HIV, *Curr Opin Infect Dis;* 17(1): 1-6 [2004].

Un macrófago denota un tipo de célula que comprende varios subtipos residentes en órganos que incluyen adicionalmente los macrófagos más típicos de los órganos y tejidos linfoides y no linfoides (por ejemplo, Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M, Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors, *Dev Comp Immunol* 3; 28(5): 509-54 [2004]).

Un linfocito T incluye, un linfocito T cooperador o un linfocito T de recuerdo (Woodland DL, Dutton RW, Heterogeneity of CD4+ and CD8+ T cells, *Curr Opin Immunol;*15(3): 336-42 [2003]).

En algunas formas de realización, la célula inmune está infectada con, o es susceptible a la infección con, un agente infeccioso, tal como un virus, una bacteria, un hongo, un protozoo, o un prión. Ejemplos de agentes infecciosos

víricos son VIH-1 y VIH-2 (incluyendo todos sus revestimientos), VHS, VEB, CMV, virus Ébola y Marburg, VHA, VHB, VHC y VPH

En algunas formas de realización, la célula inmune está, en presencia o ausencia de infección, asociada con la incidencia de una enfermedad autoinmune específica de órgano o sistémica. Ejemplos de dichas entidades de enfermedad son la enfermedad de Graves, la oftalmopatía asociada a tiroides (conocida también como oftalmopatía de Graves, conocida también como oftalmopatía endocrina); y la esclerosis múltiple (conocida también como EM).

Un "complejo" es una mezcla o aducto resultante de la unión química o enlace entre sus constituyentes o componentes, incluyendo los lípidos, el fármaco, y otros componentes opcionales del complejo de lípido-fármaco inventivo. La unión química o el enlace pueden tener la naturaleza de un enlace covalente, enlace iónico, enlace de hidrógeno, enlace de van der Waal, enlace hidrófobo, o cualquier combinación de estos tipos de unión que enlazan los constituyentes del complejo a cualquiera de sus partes o restos, de los cuales un constituyente puede tener una multiplicidad de restos de varias clases. Cada constituyente de un complejo no necesita unirse a cada constituyente diferente, pero cada constituyente tiene al menos un enlace químico con al menos un constituyente diferente del complejo. De acuerdo con la presente invención, los ejemplos de complejos de lípidos-fármacos incluyen liposomas (vesículas lípidas), o complejos lámina disco de lípido-fármaco. Los fármacos conjugados con lípidos pueden ser también una parte del complejo lípido-fármaco de acuerdo con la invención. Sin embargo, se pueden asociar también los fármacos con un lípido o un complejo lípido en ausencia de cualquier tipo de unión química o unión, de tal manera que se proporciona en el caso de liposomas que encapsulan un fármaco soluble en su espacio interior acuoso.

El complejo de lípido-fármaco, por ejemplo, el liposoma, comprende como agente activo un agente inmunomodulador (es decir, un inmunoadivador, un inmunógeno, un inmunosupresor o un agente antiinflamatorio), tal como ciclosporina, esteroides y derivados de esteroides. Otros ejemplos de fármacos útiles, de acuerdo con la invención, incluyen agentes citotóxicos terapéuticos (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y anfotericina), vectores de expresión de ADN puro, proteínas terapéuticas, oligonucleótidos terapéuticos o análogos de nucleótidos, interferones, citocinas, o agonistas o antagonistas de citocinas. También útil como fármaco es un agente alquilante citotóxico, tal como, pero sin limitarse a, busulfan (dimetanosulfonato de 1,4-butanodiol; Myleran, Glaxo Wellcome), clorambucilo, ciclofosfamida, melfalano o ácido etil etanosulfónico. Dichos fármacos o agentes son particularmente útiles en el tratamiento de dolencias que implican la proliferación patológica de células inmunes, por ejemplo, cánceres linfáticos o enfermedades autoinmunes.

En otras formas de realización, el agente activo es una sustancia natural con propiedades o beneficios terapéuticos, tal como sustancias derivadas de vegetales en forma purificada o recombinante. Los ejemplos de sustancias derivadas de vegetales incluyen extracto IDS 30 de hoja, lectina UDA derivada de rizoma, y MHL.

La presente invención contempla el empleo selectivo de sustancias naturales que se conocen desde hace mucho tiempo por sus propiedades y potenciales terapéuticos en muchos cultivos a nivel mundial. Una de dichas sustancias derivadas de vegetales, el ácido salicílico, que se encuentra a concentraciones variables en la corteza de muchos árboles, ha servido como sustancia iniciadora de uno de los grandes remedios actuales, el ácido acetil salicílico (ASS), o Aspirina, respectivamente. Como para la presente invención, la ortiga (*Urtica dioica*) es un destacado ejemplo de las numerosas plantas que se han conocido a lo largo del tiempo que tienen grandes beneficios terapéuticos. Una reciente investigación científica referida a la acción de algunos de los componentes de *Urtica dioica* proporciona una oportunidad para su aplicación dirigida.

Por ejemplo, las MyDC juegan un importante papel en el inicio de la artritis reumatoide (AR) que es un ejemplo de una enfermedad que se encuentra en el límite entre una dolencia autoinmune y una inflamatoria. Broer y Behnke han demostrado que el extracto IDS 30 (Hox- α) de hoja de *Urtica dioica*, que se ha recomendado para la terapia potenciadora de la AR, evita la maduración fenotípica/funcional de las MyDC; disminuye la secreción del factor α de necrosis tumoral; y reduce la capacidad estimuladora de linfocitos T de las MyDC, mientras aumenta la expresión dependiente de la dosis del receptor 5 de la quimiocina y de CD36 así como la capacidad endocítica de estas células. Los autores sugirieron que estos efectos de IDS 30 pueden contribuir a su efecto terapéutico sobre las enfermedades autoinmunes/inflamatorias mediadas por los linfocitos T tales como la AR (Broer J, Behnke B, Immunosuppressant effect of IDS 30, a stinging nettle leaf extract, on myeloid dendritic cells *in vitro*, J Rheumatol; 29(4): 659-66 [2002]). Es razonable suponer que la inhibición del factor de la transcripción NF- κ B está implicada en este proceso (Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K, Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF- κ B, FEBS Lett; 442(1): 89-94 [1999]), de tal manera que este extracto o sus ingredientes activos purificados pueden inhibir un gran número de dolencias debilitantes o patológicas con riesgo para la vida que dependen de la hiperactivación de NF- κ B.

Las lectinas son otro ejemplo de una sustancia natural que tiene propiedades y potenciales terapéuticos. Las lectinas (es decir, las proteínas de unión a carbohidratos con propiedades aglutinantes) se producen por numerosas plantas, principalmente en sus raíces o rizomas, como componentes vitales de su propio sistema inmune. Shibuya y col. describieron en primer lugar las propiedades de unión a azúcares de la lectina de ortiga (Shibuya N, Goldstein IJ, Shafer JA, Peumans WJ, Broekaert WF, (Carbohydrate binding properties of the stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizome lectin, Arch Biochem Biophys; 249(1): 215-24 [1986]). La lectina (GlcNAc) n específica procedente de la

ortiga, denominada aglutinina de *Urtica dioica* (UDA), ha demostrado inhibir VIH-1, VIH-2, CMV, VSR, y la citopaticidad inducida por el virus de la gripe A, a una CE50 que oscila de 0,3 a 9 µg/ml así como la formación del sincitio entre células HUT-78 infectadas con VIH-1 y VIH-2 persistentemente y células CD4⁺ Molt/4 (clon 8) (CE50: 0,2-2 µg/ml). Se ha sugerido que UDA puede actuar como inhibidor de la fusión del virión/célula diana (Balzarini J, Neyts J, Schols D, Hosoya M, Van Damine E, Peumans W, De Clercq E. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine) n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. *Antiviral Res* 18(2): 191-207 [1992]). Dicha acción, si se verifica, puede estar relacionada con la naturaleza del superantígeno de UDA (Galelli A, Truffa-Bachi P, *Urtica dioica* agglutinin. A superantigenic lectin from stinging nettle rhizome, *J Immunol*; 151(4): 1821-31 [1993]).

De nuevo, la lectina UDA derivada de rizoma, además del extracto IDS-30 derivado de hoja, actúa terapéuticamente en algunas enfermedades autoinmunes. Este superantígeno ha demostrado inducir una rápida delección de una gran fracción de linfocitos T maduros que expresan el receptor Vβ8.3 de los linfocitos T (Delcourt M, Peumans WJ, Wagner MC, Truffa-Bachi P, Vβ-specific deletion of mature thymocytes induced by the plant superantigen *Urtica dioica* agglutinin, *Cell Immunol*; 168(2): 158-64 [1996]). En ratones, esta actividad ha demostrado evitar el desarrollo del lupus sistémico eritematoso, ya que los animales tratados con UDA no desarrollan signos clínicos manifiestos de lupus y nefritis (Musette P, Galelli A, Chabre H, Callard P, Peumans W, Truffa-Bachi P, Kourilsky P, Gachelin G, *Urtica dioica* agglutinin, a Vβ8.3-specific superantigen, prevents the development of the systemic lupus erythematosus-like pathology of MRL lpr/lpr mice, *Eur J Immunol*; 26(8): 1707-11 [1996]).

Estos son solo dos de algunos de los ejemplos de sustancias derivadas de *Urtica dioica*, así como los constituyentes de otras muchas plantas, que actúan terapéuticamente, tanto como moléculas individuales, como sus oligómeros, como en combinación, en células inmunes definidas (tales como las MyDC). Las dolencias patológicas con las que estas sustancias interfieren incluyen enfermedades infecciosas, neoplásicas, y autoinmunes. Se puede utilizar el sistema liposomal descrito en el presente documento para encapsular específicamente dichos componentes vegetales moleculares en forma purificada o recombinante, y dirigir células que han sido, o serán, identificadas como sus dianas específicas, de tal manera que aumentan drásticamente su efecto y utilizan su potencial a la vez que reducen considerablemente el riesgo de efectos secundarios tóxicos.

Además, los liposomas transferidos a compartimentos celulares, tales como los endosomas, pueden administrar lectinas de manera adecuada para aglutinar patógenos almacenados intracelularmente (que incluyen VIH-1, VHC, virus Ébola, *Mycobacterium tuberculosis*, y otros), con el fin de generar grandes complejos de lectina-patógeno que la célula infectada puede reconocer de esta manera y, posteriormente, degradarse enzimáticamente o de manera dependiente del pH. Por ejemplo, una lectina que es muy adecuada para este objetivo cuando se dirige a los depósitos de VIH-1 es la lectina de *Myrianthus holstii* (MHL, conocida también como. Miriantina) que se obtiene de las raíces de la planta *Myrianthus holstii* de Tanzania. MHL comprende diversas características favorables, concretamente la aglutinación de VIH-1, la falta de toxicidad en más de dos órdenes de magnitud por encima de la dosificación eficaz en un 50% de células infectadas (CE₅₀); y la carencia de mitogenicidad para los leucocitos humanos (Charan RD, Munro MH, O'Keefe BR, Sowder RCII, McKee TC, Currens MJ, Pannell LK, Boyd MR, Isolation and characterization of *Myrianthus holstii* lectin, a potent HIV-1 inhibitory protein from the plant *Myrianthus holstii*, *J Nat Prod* agosto de 2000; 63(8): 1170-4).

Compuestos tales como UDA, MHL y muchas otras lectinas o aglutininas, respectivamente, pueden estar encapsulados dentro de liposomas, con el fin de desplegar sus propiedades selectivamente dentro de una célula diana dada y, más específicamente, en el interior de un(os) compartimento(s) celular(es) especificado(s) de dicha célula o tipos de células.

Algunas formas de realización de la solución descrita de direccionamiento preferente de un liposoma a una célula inmune de mamífero se refieren a medios mejorados de vacunación. En este caso, se usa el direccionamiento activo de células dendríticas, de acuerdo con la invención para la vacunación contra el cáncer, o contra un virus tal como VIH. (Por ejemplo, Nair, S y col. Soluble proteins delivered to dendritic cells via pH-sensitive liposomes induce primary cytotoxic T lymphocyte responses *in vitro*, *J. Exp. Med.* 175(2): 609-12 [1992]; Philip, R y col., Transgene expression in dendritic cells to induce antigen-specific cytotoxic T cells in healthy donors, *Cancer Gene Ther.* 5(4): 236-46 [1998]; Ludewig, B y col., Protective antiviral cytotoxic T cell memory is most efficiently maintained by restimulation via dendritic cells, *J. Immunol.* 163(4): 1839-44 [1999]; Chikh, G y Schutze-Redetmeier, MP, Liposomal delivery of CTL epitopes to dendritic cells, *Biosci. Rep.* 22(2): 339-53 [2002]; Grünebach, F y col. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes, *Gene Ther.* 10(5): 367-74 [2003]).

El direccionamiento de células dendríticas de acuerdo con la invención es también útil para mejorar las estrategias de vacunación en general mediante el acceso a los compartimentos endosómicos intracelulares que procesan antígenos MHC de clase I y/o MHC de clase II. (E.g. Zhou F and Huang L, Liposome-mediated cytoplasmic delivery of proteins: an effective means of accessing the MHC class I-restricted antigen presentation pathway, *Immunomethods* 1994; 4(3): 229-35 [1994]; Owais M y col., Use of liposomes as an immunopotentiating delivery system: in perspective of vaccine development, *Scand. J. Immunol.* 54 (1-2): 125-32 [2001]; Mandal M y Lee KD, Listeriolysin O-liposome-mediated cytosolic delivery of macromolecule antigen *in vivo*: enhancement of antigen-specific cytotoxic T lymphocyte frequency, activity, and tumor protection, *Biochim. Biophys. Acta* 1563(1-2): 7-17

[2002]).

Se puede usar también la solución descrita de dirigir preferentemente una célula inmune de mamífero con un liposoma para dirigirlo a células dendríticas y permitir la producción de anticuerpos monoclonales (Véase, por ejemplo, Berry JD y col., Rapid monoclonal antibody generation via dendritic cell targeting *in vivo*, Hybrid. Hybridomics 22(1): 23-31 [2003]).

Se puede incorporar más de un fármaco por el complejo lípido-fármaco, o el liposoma, de acuerdo con la solución descrita de tal manera que los complejos de lípido-fármaco, por ejemplo, los liposomas, pueden incorporar un primer fármaco y un segundo fármaco, o más fármacos, en combinación, según sirva a las necesidades particulares del especialista. Por ejemplo, los liposomas útiles pueden comprender una combinación de un fármaco dirigido contra VIH y un fármaco antifúngico y/o antibacteriano.

Se conocen en la materia técnicas útiles para preparar complejos de lípido-fármaco, tales como liposomas (por ejemplo, Sullivan SM, Gieseler RKH, Lenzner S, Ruppert J, Gabrysiak TG, Peters JH, Cox G, Richer, L, Martin, WJ, y Scolaro, MJ, Inhibition of human immunodeficiency virus-1 proliferation by liposome-encapsulated sense DNA to the 5' TAT splice acceptor site, Antisense Res Develop 2: 187-197 [1992]; Laverman P, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM, Storm G, In vivo applications of PEG liposomes: unexpected observations, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 18(6): 551-66 [2001]; Oussoren C, Storm G, Liposome to target the lymphatics by subcutaneous administration, Adv Drug Deliv Rev 50(1-2): 143-56 [2001]; Bestman-Smith J, Gourde P, Désormeaux A, Tremblay MJ, Bergeron MG, Sterically stabilized liposomes bearing anti-HLA-DR antibodies for targeting the primary cellular reservoirs of HIV-1, Biochim Biophys Acta 1468(1-2): 161-74 [2000]; Bestman-Smith J, Désormeaux A, Tremblay MJ, Bergeron MG, Targeting cell-free HIV and virally-infected cells with anti-HLA-DR immunoliposomes containing amphotericin B, AIDS 14(16): 2457-65 [2000]; Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR, Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, Biochim Biophys Acta 858: 161-168 [1986]; Kinman, L. y col., Lipid-drug associations enhanced HIV protease inhibitor indinavir localization in lymphoid tissues and viral load reduction: a proof of concept study in HIV-infected macaques, J AIDS;34: 387-97 [2003]; Harvie P, Désormeaux A, Gagne N, Tremblay M, Poulin L, Beauchamp D, Bergeron MG, Lymphoid tissues targeting of liposome encapsulated 2',3'-dideoxyinosine, AIDS; 9: 701-7 [1995]; Patente de los Estados Unidos N° 5.773.027; Patente de los Estados Unidos N° 5.223.263; Documento WO 96/10399 A1).

Algunos procedimientos útiles de preparación de liposomas incluyen extrusión, homogeneización, carga remota, y evaporación en fase inversa. En la extrusión, se forma una película lípida compuesta únicamente de fosfolípidos, o en combinación con colesterol y/u otros aditivos, evaporando el disolvente orgánico (tal como cloroformo) de la disolución de lípidos. Se añaden fármacos hidrófobos a la disolución de lípidos antes de la evaporación del disolvente. Para atrapar los fármacos solubles en agua, se hidrata la película seca de lípidos con una disolución acuosa isotónica que contiene el fármaco mediante agitación (ultrasonidos, vórtice, agitador motorizado, etc). Se congela y se descongela 3-4 veces la suspensión de lípidos. A continuación se pasa la suspensión a través de una serie de filtros de policarbonato que contienen poros de un diámetro definido, tales como 0,8 µm, 0,4 µm, 0,2 µm, o 0,1 µm. Para fármacos solubles en agua, se eliminan los fármacos no encapsulados mediante cromatografía en columna de permeación en gel, diálisis o diafiltración. Los liposomas pueden filtrarse en estéril (por ejemplo, a través de un filtro de 0,22 µm).

Se puede añadir un crioprotector, tal como lactosa, glucosa, sacarosa, trehalosa o maltosa a los liposomas estériles siempre que se mantenga la isotonicidad. A continuación se pueden congelar los liposomas y liofilizarse y almacenarse indefinidamente como una torta liofilizada (por ejemplo, Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR, Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, Biochim Biophys Acta 858: 161-168 [1986]; Tsvetkova NM y col., Effect of sugars on headgroup mobility in freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: solid-state ³¹P NMR and FTIR studies, Biophys J 75: 2947-2955 [1998]; Crowe JH, Oliver AE, Hoekstra FA, Crowe LM, Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification, Cryobiology 35: 20-30 [1997]; Sun WQ, Leopold AC, Crowe LM, Crowe JH, Stability of dry liposomes in sugar glasses, Biophys J 70: 1769-1776 [1996]).

La homogeneización es adecuada para la fabricación a gran escala. Se prepara la suspensión de lípidos tal como se ha descrito anteriormente. Las etapas de congelación y de descongelación a gran escala pueden ser un problema. El diámetro de los liposomas se reduce precipitando la suspensión de lípidos como una corriente tanto en una corriente en el mismo sentido de la misma suspensión de lípidos (microfluidización) como contra una placa de acero (gualinización). Se ha usado esta última tecnología por la industria láctea para la homogeneización de la leche. Los fármacos solubles en agua no atrapados se eliminan mediante diafiltración. Los fármacos hidrófobos están atrapados completamente y normalmente no son fármacos libres que se vayan a eliminar (por ejemplo, Paavola A, Kilpelainen I, Yliruusi J, Rosenberg P, Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia, Int J Pharm 199: 85-93 [2000]; Zheng S, Zheng Y, Beissinger RL, Fresco R, Liposome-encapsulated hemoglobin processing methods, Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol 20: 355-364 [1992]).

Otro procedimiento de atrapar un fármaco es la carga remota. El fármaco que se va a atrapar debe tener una carga. El grado de protonación o de desprotonación está controlado por el pK del grupo ionizable. Un ácido o base conjugada se atrapa en el interior de los liposomas. Se añade el fármaco ionizable al exterior de los liposomas. Se

hace bajar el pH de tal manera que el fármaco sirve como la sal neutralizante de la sustancia ionizable atrapada en el interior de los liposomas. Debido al cambio en el pH, el contraíón de la molécula ionizable atrapada puede difundirse hacia el exterior de los liposomas. Esto crea un gradiente con suficiente energía para hacer que el fármaco se difunda en los liposomas. Un ejemplo es la carga de doxorubicina en liposomas preformados.

5 En la evaporación en fase inversa, se solubiliza una película de lípidos en dietiléter hasta una concentración final de normalmente aproximadamente 30 mM. Normalmente, se añade una parte de agua con el fármaco atrapado a tres partes de disolución de éter lípido. Se aplica energía en forma de sonicación forzando la suspensión en una emulsión homogénea. Después que se ha formado una emulsión estable (que no se separa cuando descansa durante 1-3 h), se elimina el éter mediante evaporación, dando como resultado normalmente liposomas con
10 aproximadamente 200 nm de diámetro y una elevada eficacia de atrapamiento.

Se preparan liposomas de etanol/calcio para atrapar ADN, dando como resultado normalmente liposomas de 50 nm de diámetro, mediante cualquiera de los anteriores procedimientos (extrusión, homogeneización, sonicación). Los liposomas se mezclan con ADN plásmido, o fragmentos de ADN lineal, más cloruro de calcio 8 mM. Normalmente, se añade etanol a la suspensión para dar como resultado una concentración de aproximadamente el 40%. Se
15 elimina el etanol mediante diálisis y los liposomas resultantes tienen generalmente menos de 200 nm de diámetro con aproximadamente un 75% del ADN atrapado en los liposomas.

Para el direccionamiento celular, de acuerdo con la presente invención, se pueden preparar liposomas mediante cualquiera de los anteriores procedimientos. Los liposomas pueden contener un lípido al cual se pueden reticular proteínas. Los ejemplos de estos lípidos son: N-glutarilfosfatidiletanolamina, N-succinil-fosfatidiletanolamina, maleimido-fenil-butiril-fosfatidiletanolamina; succinimidil-acetiltioacetato-fosfatidiletanolamina, SPDP-fosfatidiletanolamina. La glutaril y succinimidil fosfatidiletanolamina se pueden unir a un nucleófilo, tal como una amina, usando ciclocarbodiimida. Las maleimido, acetiltioacetato y SPDP fosfatidiletanolaminas se pueden hacer reaccionar con tioles en las proteínas, péptidos o ligandos de pequeño peso molecular de < 1000 g/mol. Se puede derivatizar la proteína con los liposomas tras la formación. Se puede eliminar la proteína no derivatizada mediante
20 cromatografía de permeación en gel. Se pueden derivatizar los péptidos y ligandos de bajo peso molecular con los lípidos y añadirse a la disolución de lípidos orgánicos antes de la formación de la película de lípidos.

De acuerdo con la presente invención, los ejemplos de lípidos útiles incluyen cualquier lípido formador de vesícula, tal como, fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (denominada a partir de ahora en el presente documento como "PC"), que se producen naturalmente y ácido fosfatídico preparado de manera sintética (denominado a partir de ahora en el presente documento como "PA"), lisofosfatidilcolina, fosfatidilserina (denominada a partir de ahora en el presente documento como "PS"), fosfatidiletanolamina (denominada a partir de ahora en el presente documento como "PE"), esfingolípidos, fosfatidilglicerol (denominado a partir de ahora en el presente documento como "PG"), esfingomielina, cardiolipina, glucolípidos, gangliósidos o cerebrósidos y similares usados tanto singularmente como entremezclados de tal manera como en fosfolípidos de soja (por ejemplo, Asolectina, Associated Concentrates). La PC, el PG, el PA y la PE se pueden derivar de yema de huevo purificada y de sus derivados hidrogenados.
35

Opcionalmente, se pueden entremezclar otros lípidos tales como esteroides, diferentes isómeros de colesterol, aminas alifáticas tales como aminas alifáticas de cadena larga y ácidos carboxílicos, sulfatos y fosfatos de cadena larga, diacetil fosfato, hidroxitolueno butilado, tocoferoles, retinoles y compuestos isoprenoides, con los componentes fosfolípidos para conferir algunas propiedades deseadas y conocidas en las vesículas formadas. Además, se pueden sustituir o entremezclar fosfolípidos sintéticos conteniendo tanto porciones alifáticas alteradas tales como grupos hidroxilo, cadenas de carbonos ramificados, ciclodervados, derivados aromáticos, éteres, amidas, derivados poliinsaturados, derivados halogenados o porciones hidrofílicas alteradas que contienen grupos carbohidrato, glicol, fosfato, fosfonato, amina cuaternaria, sulfato, sulfonato, carboxilo, amina, sulfidrido o imidazol y combinaciones de dichos grupos, con los fosfolípidos anteriormente mencionados y usarse de acuerdo con la invención. Se conocen algunos de estos componentes por aumentar la fluidez de la membrana liposomal, lo que conlleva de esta manera una captación más eficaz, otros se conocen por tener un efecto directo sobre, por ejemplo, células tumorales, afectando su diferenciación potencial. Se apreciará de lo anterior que se puede variar mucho la composición química del componente lípido preparado mediante el procedimiento de la invención sin una disminución apreciable del porcentaje de captura del fármaco, aunque el tamaño de una vesícula puede estar afectado por la composición de lípidos.
40
45
50

Se pueden usar también PG y PC sintéticos saturados, tales como dipalmitoílo. Otros lípidos anfifáticos que se pueden usar, ventajosamente con PC, son gangliósidos, globósidos, ácidos grasos, estearilamina, alcoholes de cadena larga. Se pueden incluir también lípidos PEGilados, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos. Son también útiles fosfolípidos acilados y diacilados.

55 Por medio de ejemplo adicional, en algunas formas de realización, los fosfolípidos útiles incluyen fosfatidilcolina de huevo ("EPC"), dilauriloilfosfatidilcolina ("DLPC"), dimiristoilfosfatidilcolina ("DOPC"), dipalmitoifosfatidilcolina ("DPPC"), diestearoilfosfatidilcolina ("DSPC"), 1-miristoil-2-palmitoifosfatidilcolina ("MPPC"), 1-palmitoil-2-miristoil fosfatidilcolina ("PMPC"), 1-palmitoil-2-estearoil fosfatidilcolina ("PSPC"), 1-estearoil-2-palmitoifosfatidilcolina ("SPPC"), dioleoilfosfatidilcolina ("DOPC"), dilauriloilfosfatidilglicerol ("DLPG"), dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dipalmitoifosfatidilglicerol ("DPPG"), distearoilfosfatidilglicerol ("DSPG"), diestearoil esfingomielina ("DSSP"),
60

distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoilfosfatidilglicerol ("DOPG"), ácido dimiristoil fosfatídico ("DMPA"), ácido dipalmitoil fosfatídico ("DPPA"), dimiristoil fosfatidiletanolamina ("DMPE"), dipalmitoil fosfatidiletanolamina ("DPPE"), dimiristoil fosfatidilserina ("DMPS"), dipalmitoil fosfatidilserina ("DPPS"), fosfatidilserina de cerebro ("BPS"), esfingomielina de cerebro ("BSP"), y dipalmitoil esfingomielina ("DPSP").

5 En una forma de realización, se emplean fosfatidilcolina y colesterol. Sin embargo, se puede emplear opcionalmente cualquier relación molar adecuada de lípido no esteroideo a lípido esteroideo (por ejemplo, colesterol) para promover la estabilidad de un complejo de lípido-fármaco particular durante el almacenamiento y/o la administración a un sujeto mamífero.

10 La mezcla del fármaco y los lípidos puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica conocida útil, por ejemplo, mediante sonicación, vortización, extrusión, microfluidización, homogeneización, uso de un detergente (eliminados posteriormente, por ejemplo, mediante diálisis). El fármaco y el lípido se mezclan a una relación molar de lípido a fármaco de aproximadamente 3:1 a 100:1 o más que es especialmente útil para los fármacos que son relativamente más tóxicos, y más preferiblemente de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 10:1, y los más preferible de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 7:1.

15 Para algunos fármacos, el uso de un disolvente orgánico puede facilitar la producción del complejo de lípido-fármaco, tal como un liposoma. Tras la mezcla del fármaco y los lípidos, se elimina el disolvente orgánico mediante cualquier medios de eliminación conocido adecuado, tal como evaporando a vacío, o mediante la aplicación de calor, usando, por ejemplo, un secador de pelo o un horno, o una inyección de etanol caliente (por ejemplo, Deamer, Patente de los Estados Unidos N° 4.515.736), siempre que los componentes del lípido y el fármaco sean estables a la temperatura usada. Se pueden emplear también la diálisis y/o la cromatografía, incluyendo la cromatografía de afinidad, para eliminar el disolvente orgánico. Se lleva a cabo la hidratación del fármaco con agua o cualquier tampón acuoso biocompatible, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato, HEPES, o TRIS, que mantiene una osmolaridad fisiológicamente equilibrada. Se puede llevar a cabo la rehidratación del liposoma simultáneamente eliminando el disolvente orgánico o, alternativamente, se puede retrasar hasta un momento más conveniente para usar los liposomas (por ejemplo, Papahadjopoulos y col., Patente de los Estados Unidos N° 4.235.871). La vida en almacenamiento de los liposomas rehidratables ("secos") es normalmente de aproximadamente 8 meses a aproximadamente un año. Se puede aumentar este plazo de tiempo mediante liofilización.

20 En una forma de realización, el complejo de lípido-fármaco es un liposoma unilamelar. Los liposomas unilamelares proporcionan la exposición más elevada del fármaco al exterior del liposoma, en la que puede interactuar con las superficies de las células dianas. El uso de liposomas PEGilados queda también comprendido dentro de la presente invención.

25 "Anticuerpos" incluye anticuerpos completos así como fragmentos de anticuerpos, con una capacidad específica de unión a diana de interés, es decir, ligandos directores específicos de antígenos o específicos de haptenos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, o F(v). Los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos incluyen también ligandos directores específicos de antígenos o específicos de haptenos complejados con restos enlazantes solubles en lípidos. En algunas formas de realización, los anticuerpos se acoplan al complejo de lípido-fármaco, tal como un complejo de liposoma-fármaco, mediante la proteína A del *Staphylococcus aureus* tipo, o mediante la proteína G que es típica de algunas otras especies bacterianas.

30 Opcionalmente, el complejo de lípido-fármaco comprende además uno o más componentes de biomembrana que pueden potenciar adicionalmente la capacidad directora específica (es decir, activa), la citotoxicidad, u otro parámetro terapéutico del liposoma. Dichos componentes de biomembrana incluyen una proteína asociada a membrana, una proteína integral o transmembrana (por ejemplo, una glicoforina o un canal de membrana), una lipoproteína, una glucoproteína, una toxina peptídica (por ejemplo, toxina de abeja), una lisina bacteriana, una proteína A de *Staphylococcus aureus*, un anticuerpo, un receptor superficial específico, o un ligando de unión a receptor superficial. El uso de moléculas específicas de vectores acopladas a, o incluidas dentro de una superficie lisosomal, está también abarcado dentro de la presente invención para potenciar la administración transmembrana y para la captación de los compuestos encapsulados en liposomas que de otra manera se administraría únicamente de forma insuficiente a o en el interior de una célula, o que no se administran eficazmente a un orgánulo intracelular específicamente deseable (por ejemplo, tal como se revisó en: Torchilin VP, Lukyanov AN, Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions, *Drug Discov Today* 15 de mar de 2003; 8(6): 259-66; Sehgal A, Delivering peptides and proteins to tumors, *Drug Discov Today* 15 de jul de 2003; 8(14): 619; Koning GA, Storm G, Targeted drug delivery systems for the intracellular delivery of macromolecular drugs, *Drug Discov Today* 2003 Jun 1; 8(11):482-3). Dichas moléculas de vectores pueden incluir los dominios de transducción de la proteína así denominados (PTD) que se derivan de diversos virus o de *Drosophila antennapedia*. Para aplicación en la enfermedad por VIH, la proteína Tat de VIH, o un derivado o fragmento que actúa como un PTD, es también útil (por ejemplo, Schwarze, S.R., y col., In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse, *Science* 285: 1569-72 [1999]).

60 El complejo de lípido-fármaco, tal como un liposoma, es preferible, pero no necesariamente, de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 nanómetros de diámetro, y más preferiblemente de aproximadamente 50 a

aproximadamente 80 nanómetros de diámetro.

De acuerdo con la presente invención, se pueden preservar los complejos de lípido-fármaco para posterior uso mediante cualquier procedimiento de conservación conocido, tal como la liofilización (por ejemplo, Crowe y col., Patente de los Estados Unidos N° 4.857.319). Normalmente, la liofilización u otras técnicas de crioconservación útiles implican la inclusión de un agente de crioconservación, tal como un disacárido (por ejemplo, trehalosa, maltosa, lactosa, glucosa o sacarosa).

El complejo de lípido-fármaco, por ejemplo, un liposoma, se va a administrar a un sujeto mediante cualquier medio adecuado tal como, por ejemplo mediante inyección. La administración y/o la inyección puede ser intraarterial, intravenosa, intratecal, intraocular, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, o mediante inyección directa (por ejemplo, estereotáctica) en un tejido linfóide particular, o en un tumor u otra lesión. La introducción del complejo de lípido-fármaco en los vasos linfáticos, preferiblemente, es mediante inyección subcutánea o intramuscular.

De acuerdo con la presente invención, "tejido linfóide" es un nódulo linfático, tal como nódulo linfático inguinal, mesentérico, ileocecal, o axilar, o tejido linfóide del bazo, del timo, o asociado a mucosal (por ejemplo, en el pulmón, lámina propia de la pared intestinal, placas de Peyer del intestino delgado, o amígdalas linguales, palatinas y faríngeas, o anillo de Waldeyer en el cuello).

La inyección puede ser también cualquier procedimiento no intravenoso que drene directamente, o preferentemente, en el sistema linfático en oposición al torrente sanguíneo. Lo más preferido es la inyección subcutánea, empleando normalmente un calibre de aguja de jeringuilla más grande que el del complejo lípido-fármaco. Es también útil la inyección intraperitoneal. Normalmente, la inyección del volumen inyectado (generalmente de aproximadamente 1-5 cm³) es en el brazo, pierna, o abdomen del sujeto, pero se puede escoger cualquier sitio conveniente para la inyección subcutánea. Debido a que el fármaco administrado subcutáneamente, de acuerdo con algunas formas de realización de la presente invención, entra en el sistema linfático antes de entrar en la circulación sanguínea sistémica, los beneficios incluyen

1) Distribución a través del sistema linfóide y localización en los nódulos linfáticos; y

2) Evitar o minimizar la desestabilización mediada por la proteína de los complejos de lípido-fármaco.

Normalmente, en el tratamiento del VIH/SIDA, la frecuencia de inyección es lo más preferible de una vez por semana, pero se pueden proporcionar más o menos inyecciones frecuentes (por ejemplo, mensualmente), según sea apropiado.

De acuerdo con esto, la presente invención facilita un régimen de tratamiento que puede implicar una inyección semanal conveniente más bien que múltiples dosis de fármaco diarias, como regímenes practicados normalmente en el tratamiento actual del SIDA. Esta característica puede conducir a la mejora de la adhesión del paciente al tratamiento con el curso completo de tratamiento para algunos pacientes individuales.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y procedimientos

Preparación de liposomas. Se formó una película de lípidos 30 μmol compuesta por DOPC/Chol/DOPE-MBP (36,5:33,0:2,5 mol:mol:mol) (se adquirió el colesterol de Calbiochem, San Diego, CA, EE.UU; y DOPE y DOPE-MBP de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EE.UU). Se hidrataron las películas de lípidos con 1 ml de calceína 50 mM (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU) en PBS (pH 7,0), se sonicaron en un baño sonicador (5 min) y se extrudieron x5 a través de un filtro de tipo nucleopore de 0,1 μm (Avanti Polar Lipids) usando una extrusora manual. También, se pueden emplear ciclos de congelación-descongelación. Se determinó el tamaño promedio del liposoma mediante dispersión cuasieléctrica de luz con un Nicomp 380 ZLS Zeta-Potential Particle Sizer (Particle Sizing Systems, Santa Bárbara, CA, EE.UU), dando como resultado un diámetro promedio de 146,7 ± 31,0 nm.

Proteína A-liposomas. Para ser capaces de probar la capacidad directora de diferentes anticuerpos con un liposoma normalizado, se acoplaron moléculas de inmunoglobulina a liposomas mediante la proteína A de *Staphylococcus aureus*. La proteína A es un componente de la pared celular bacteriana que consiste en una única cadena polipeptídica de un peso molecular de 42 kDa. La Proteína A tiene la capacidad de unirse específicamente a la región Fc de las moléculas de inmunoglobulina, especialmente IgG. Una molécula de proteína A puede unirse al menos a 2 moléculas de IgG simultáneamente (Sjöquist J, Meloun B, Hjelm H, Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin, Eur J Biochem 29: 572-578 [1972]). Se formaron liposomas que transportaban la proteína A y se probó su funcionalidad en la unión de moléculas a anticuerpos. Se consiguió el direccionamiento de DC-SIGN y otros marcadores de membranas con Proteína A-liposomas preincubados con concentraciones de anticuerpos establecidas tanto de algunos mA b específicos de DC-SIGN (todos los isotipos de IgD1κ), como de mA b del control de igG1κ irrelevantes (MOPC-21/P3), o anticuerpos específicos de los otros marcadores de membrana

Se derivatizó la Proteína A con tioacetato de succinimidilacetilo (SATA, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU) a una relación molar de 10:1 de SATA a proteína en PBS, pH 9,0 durante 1 h. Se eliminó el SATA sin reaccionar de la proteína A usando una columna de giro superfino Sephadex G-25 equilibrada con PBS (pH = 7,4). Se eliminó el grupo protector de tiol incubando la proteína A derivatizada con 0,2 ml de NH₂OH 0,5 M (Sigma), HEPES 0,5 M (pH = 7,4) y EDTA 25 mM (Fisher) durante 15 min. Se eliminaron los reactivos y se cambió el tampón usando una segunda columna de giro Sephadex G-25 equilibrada con PBS (pH = 6,5). En el mismo momento, se centrifugaron también los liposomas que contenían la calceína a través de una columna de giro Sephadex equilibrada con PBS (pH = 6,5) para eliminar la calceína sin atrapar. Se añadió inmediatamente la proteína A derivatizada a los liposomas a una relación molar de 100 de lípido a proteína. Tras 2 h de incubación a TA, se separó el liposoma x el conjugado de la proteína A de la proteína libre usando una columna CL.4B de sefarosa equilibrada con PBS. Se verificó el número de tioles/proteína A mediante su reacción con ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) 2 mM (Aldrich, Milwaukee, WI, EE.UU). Como medida de la eficacia de encapsulación de la calceína y de la estabilidad liposómica, se determinó la detención rápida (Q) [%] de la preparación combinada en ausencia y presencia de Triton Tx-100 de acuerdo con:

$$Q = \frac{(\text{Combinado+Tx-100})_{\text{Dose0nm}} - (\text{Combinado-Tx-100})_{\text{Dose0nm}}}{(\text{Combinado+Tx-100})_{\text{Dose0nm}}} \times 100 \text{ [\%]} (2)$$

Normalmente, Q ≈ 80% indicó que la pérdida de calceína fue insignificante.

Inmunoliposomas y anticuerpos. Se almacenaron los proteína A-liposomas que atrapaban la calceína a 4°C en la oscuridad y se usaron durante hasta 3 meses. Se prepararon inmunoliposomas mediante incubación durante 30 min a TA de la proteína A-liposomas con los anticuerpos monoclonales de prueba (mAb; véase a continuación) o la IgG irrelevante del control negativo (mAb MOPC-21/P3; eBioscience, San Diego, CA, USA); Reeves, JP y col., Anti-Leu3a induces combining site-related anti-idiotypic antibody without inducing anti-HIV activity, AIDS Res Hum Retroviruses 7: 55-63 [1991]) a una relación molar 5:1 de mAb:proteína A. La relación molar de lípido a proteína A fue aproximadamente de 1000. Se podría eliminar el anticuerpo no unido con perlas magnéticas de Proteína A (New England Biolabs, Beverly, MA, EE.UU). Sin embargo, no se observó efecto significativo sobre el marcado celular.

Se probó la unión de los anticuerpos monoclonales a la proteína A-liposomas mediante flotación en gradiente de Ficoll. Específicamente, se incubaron los anticuerpos con liposomas (30 min, TA) a la relación mAb:lípido usado para el marcado celular. Se añadió anticuerpo policlonal de ratón dirigido contra conejo X fosfatasa alcalina (AP) a la incubación. Se preparó la mezcla a partir de Ficoll 400 al 20% usando una disolución madre de Ficoll al 30% en PBS con un volumen final de 0,4 ml, transferido a un tubo de microfuga, y se distribuyeron en capas 0,4 ml de Ficoll/PBS al 10% sobre la parte superior y se añadió posteriormente una capa de 0,4 ml de PBS. Se centrifugaron los tubos a 15.000 rpm durante 15 min a TA. Se evaluó la interfase de PBS/Ficoll al 10% para la actividad de la AP. La incubación con Ab secundario X AP dio como resultado una actividad 10 veces más baja que la incubación con mAb primario y anticuerpo secundario, indicando que el mAb primario se había unido a la proteína A en los liposomas (no se muestran los resultados).

Con el fin de identificar un mAb que asegure la eficacia máxima para el direccionamiento de DC-SIGN, se preincubaron la proteína A-liposomas tanto con tres diferentes mAb específicos de CD209 derivados de los clones 120507 (IgG2b), 120526 (IgG2a) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) y DCN46 (IgG1κ) (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.). El direccionamiento con mAb 120507 resultó superior, y los resultados descritos en el presente documento se han obtenido exclusivamente con este anticuerpo. Además, los anticuerpos para la Fenotipación (empleados como mAb primarios) y para la generación de inmunoliposomas fueron específicos para CD1a (BL6; Coulter Immunotech, Miami, FL, EE.UU.), CD4 (SIM4) (NIH/McKesson; véanse los Agradecimientos), CD14 (UCHM-1), CD45R0 (UCHL1) y CD83 (HB15a17.11) (todos de Serotec, Oxford, Reino Unido).

Estudios de unión/captación celular. Se cosecharon las células maduras en el día 7 de cultivo aglomerando las células dendríticas inmaduras no adherentes procedentes de los sobrenadantes y desunido las células débilmente adherentes con EDTA al 1% en PBS durante 30 min a 4°C; se obtuvieron células fuertemente adherentes aplicando suavemente un rascador de células (TPP). Se combinaron todas las fracciones, se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio 80/20 más FBS al 1% en hielo hasta que se usaron. Para el ensayo se plaquearon las células en medio de cultivo reciente con FBS al 1% a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Para obtener la dependencia del tiempo del direccionamiento de las células dendríticas, las 2×10^5 MoDc por pocillo o el comienzo en el mismo medio se incubaron con liposomas a una concentración de lípidos 50 μM a 37°C durante 1, 3 y 24 horas u otros tiempos y temperaturas, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Tras la incubación, se lavaron las células tres veces con disolución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2; sin cationes bivalentes) y se analizaron mediante análisis de clasificación celular mediante fluorescencia activada (FACS; es decir, "citometría de flujo", véase a continuación). En todos los experimentos, la relación liposoma a célula fue constante.

Citometría de flujo. Se puede emplear la citometría de flujo: (1) para determinar los fenotipos de las My-DC y de los linfocitos T en diferentes momentos a través de la diferenciación de DC y del cultivo simultáneo de las DC/linfocitos T (es decir, cultivos mixtos de leucocitos o estimulación específica de antígeno) con o sin infectarse las DC con cepas trópicas de M y/o T de VIH-1, y/o tratadas con liposomas específicos de DC-GIGN o del control; y (2) para

determinar la administración simultánea de calceína/fármaco(s) a las My-DC infectadas o, más específicamente, a las MoDC infectadas. Se analizaron las MoDC marcadas en un citómetro de flujo Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, CA de acuerdo con las instrucciones del fabricante, inmediatamente después de la tinción indirecta con (i) mAb primarios e IgG policlonal secundaria conjugada con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (eBioscience) (Gieseler, R y col., *In vitro* differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes, Dev. Immunol. 6: 25-39 [1998]), (ii) incubación con los respectivos inmunoliposomas que contenían calceína, o (iii) controles negativos. Se llevó a cabo la citometría de flujo; únicamente se evaluaron las células clasificadas para la expresión del antígeno, así como para los estudios de direccionamiento y captación liposomal. De manera breve, las células se clasificaron mediante dispersión con dot blot para excluir los desechos. Se establecieron los histogramas de las células clasificadas, según fue adecuado para el FITC y la calceína, es decir $\lambda_{EX} = 488$ nm y $\lambda_{EM} = 525$ nm. Se volvieron a introducir los datos, y se superpusieron los histogramas correspondientes para muestras de ensayo y controles y se analizaron con el software WinMDI 2.8 (J. Trotter; facs.scripps.edu). Se determinó la eficacia del direccionamiento directamente después de incubar las DC (o, cuando se emplearon, macrófagos) con la respectiva construcción liposoma/Proteína A/mAb, o con controles negativos liposomales que empleaban el anticuerpo MOPC-21/P3 del control del isotipo irrelevante. Los resultados de los controles negativos que empleaban proteína A-liposomas no cargados con mAb fueron idénticos a los obtenidos con la IgG irrelevante del control. Se podría excluir de esta manera una influencia mediante la captación no específica de liposomas por las MyDC

Eficacia del direccionamiento de inmunoliposomas. Para determinar la expresión de un marcador dado por un mAb específico, se calculó su intensidad de fluorescencia promedio eficaz (ΔMFI_{mAb}) como la diferencia de su MFI medida (MFI_{mAb}) y la MFI medida de la IgG del control negativo (MFI_{Co-IgG}), es decir

$$\Delta MFI_{mAb} = MFI_{mAb} - MFI_{Co-IgG} \text{ (II)}$$

y se expresó como porcentaje de las MyDC que expresaban este Marcador ($MyDC_{mAb} + [\%]$).

Para determinar la captación de un inmunoliposoma cargado con un mAb dado (ILS_{mAb}), se MFI eficaz (ΔMFI_{ILS}) es el resultado de la diferencia de su MFI medida ($MFI_{ILS-mAb}$) y de la MFI obtenida para el control negativo del inmunoliposoma ($MFI_{ILS-Co-IgG}$), es decir

$$\Delta MFI_{ILS} = MFI_{ILS-mAb} - MFI_{ILS-Co-IgG} \text{ (III)}$$

proporcionando de esta manera el porcentaje de MyDC positivas a inmunoliposomas ($MyDC_{ILS}^+ [\%]$).

La expresión del marcador y la unión y la captación inmunoliposomal no están necesariamente correlacionadas. Por ejemplo, aunque expresan claramente un antígeno dado cuando se identifican con un mAb específico, la interacción del mismo antígeno con inmunoliposomas mucho más grandes marcados con la misma especificidad de mAb puede conducir a la supresión del marcador superficial, lo que dará como resultado una pérdida de la señal de fluorescencia. Basándose en las Ecuaciones (II) y (III), se determinó de esta manera la *eficacia directora neta inmunoliposomal* (TE_{ILS}) como

$$TE_{ILS} = \frac{MyDC_{ILS} \times 100}{MyDC_{mAb}} [\%] \text{ (IV)}$$

en la que un resultado cercano a 100% indica la unión similar de un mAb y su correspondiente inmunoliposoma; un resultado más bajo indica una pérdida de señal tras el encastre liposomal; y un resultado claramente por encima del 100% muestra acumulación de fluoróforo administrado liposomalmente, sugiriendo por tanto la captación activa del tipo respectivo de inmunoliposoma. La ecuación (IV) se transforma fácilmente para la fluorescencia relativa de los inmunoliposomas frente a los mAb marcados fluorescentemente (RF_{ILS})

$$RF_{ILS} = \frac{MyDC_{ILS} \times 100}{MyDC_{mAb}} - 100 [\%] \text{ (V)}$$

en la que los resultados negativos indican una pérdida, y los resultados positivos una ganancia, en la señal de fluorescencia.

Leucocitos de sangre periférica (PBL). Se prepararon leucocitos mononucleares (MNL) y/o linfocitos T tal como se ha descrito anteriormente (Gieseler, R, y col., *In-vitro* differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes, Dev. Immunol. 6: 25-39 [1998]). De manera breve, se enriquecieron los MNL a partir de sangre completa diluida 1:1 con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) sin Ca^{2+}/Mg^{2+} (Cambrex, Walkersville, MD, EE.UU.) mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre Lymphoprep ($\rho = 1,077$ g/cm³; Nyegaard, Oslo, Noruega). Se cosecharon las capas leucocitarias y se combinaron, y se eliminaron las plaquetas residuales mediante 3-4 lavados con PBS. Estos procedimientos implicaron varias etapas de centrifugación de 10 min a 260 x g y 4 grados C.

Separación celular activada por magnetismo (MACS) de monocitos, linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Se aislaron monocitos mediante separación celular activada por magnetismo negativa (MACS; Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Alemania y Auburn, CA, EE.UU.) eliminando las células CD3⁺, CD7⁺, CD19⁺, CD45RA⁺, CD56⁺ y mlgE⁺ con microperlas

magnéticas recubiertas con mAb. Se ha escogido la separación negativa de monocitos para evitar la activación celular y se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De manera breve, el procedimiento implicó 2 lavados con PBS suplementado con albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA, calidad de cultivo celular, endotoxina < de 0,1 ng/mg; ICN, Irvine, CA, EE.UU.) y EDTA 2 mM (Sigma, San Luis, MO, EE.UU.), y las células lavadas se pasaron a través de una microcolumna LS magnética colocada en un campo magnético definido (Miltenyi), enriqueciendo de esta manera los monocitos hasta una pureza del 98,6-99,9% (intervalo de n = 3), tal como se determinó mediante citometría de flujo para CD14.

Diferenciación de células dendríticas mieloides. Se generaron MyDC maduras e inmaduras a partir de monocitos de sangre periférica. De manera breve, se aislaron los monocitos mediante centrifugación sucesiva en gradiente de densidad de la sangre completa diluida con PBS sobre Lymphoprep ($\rho = 1,077 \text{ g/cm}^3$) (Nyegaard, Oslo, Noruega) y, sucesivamente, mediante separación celular magnética negativa (MACS), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi). A continuación se sembraron los monocitos a $1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ en placas de microvaloración de 96 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza). De acuerdo con dos protocolos generalmente aceptados, los inventores diferenciaron dos fenotipos diferentes de DC funcionalmente competentes. Ambos protocolos empleaban el factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), e interleucina 4 (IL-4) como factores básicos de diferenciación de DC, conduciendo de esta manera a un estado inmaduro de la DC, que captura antígeno (Peters JH, Xu H, Ruppert J, Ostermeier D, Friedrichs D & Gieseler RK, Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes *in vitro*, *Adv Exp Med Biol*; 329: 275-80 [1993]; Ruppert J, Schütt C, Ostermeier D y Peters JH, Down-regulation and release of CD14 on human monocytes by IL-4 depends on the presence of serum or GM-CSF, *Adv Exp Med Biol*; 329: 281-6 [1993]).

A continuación se obtuvieron DC maduras que presentaban antígeno, añadiendo factor de necrosis tumoral (TNF)- α , lo que condujo a un tipo de DC capaz de iniciar la inmunidad dependiente de linfocitos T colaboradores (Th)-1 y Th2 (Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D y Banchereau J, GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells, *Nature*; 360: 258-61 [1992]; Sallusto F y Lanzavecchia A, Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha, *J Exp Med*; 179: 1109-18 [1994]; Banchereau J y Steinman RM, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature*; 392: 245-52 [1998]).

Alternativamente, se generaron DC maduras en presencia de interferón (IFN)- γ (Gieseler R, Heise D, Soruri A, Schwartz P y Peters JH, In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes, *Develop Immunol*; 6: 25-39 [1998]). Dichas DC parecen inducir principalmente células Th1, activando de esta manera los linfocitos T citotóxicos que estimulan la inmunidad antitumoral (Soruri, A. y co., Specific autologous anti-melanoma T cell response *in vitro* using monocyte-derived dendritic cells, *Immunobiology*; 198: 527-38 [1998]) y, presumiblemente, respuestas inmunes antivíricas, debido a la presentación del antígeno restringida a la MHC de clase I. En la mayor parte de los casos, las DC se diferenciaron durante 7 días. Sin embargo, las DC se mantuvieron durante hasta 21 días en experimentos de selección. Se obtuvieron todos los factores de diferenciación de Sigma (San Luis, MO, EE.UU.).

Cosecha de DC e incubación de liposomas. Las MyDC cosechadas y las preparaciones de liposomas se incubaron a diferentes concentraciones relativas (dependiendo del contexto experimental) durante 3 horas a temperatura ambiente, seguido por la evaluación genotípica, fenotípica y funcional (PCR, citometría de flujo, ELISA, cultivo mixto de leucocitos y estimulación para antígenos de recuerdo). Se cosecharon las DC maduras no adherentes y adherentes en el día 7.

En primer lugar, se recogió el medio de diferenciación, se centrifugó, y se cosechó la fracción DC aglomerada de las células dendríticas inmaduras no adherentes. En segundo lugar, se desunieron las DC adherentes procedentes de los pocillos incubándolas con PBS/EDTA durante 30 min a 4°C, y empleando una espátula de goma sucesivamente. Las DC adherentes desunidas se combinaron con la fracción no adherente, se ajustaron los números de células y se incubaron con las concentraciones de liposomas indicadas para cada experimento.

Tal como se ha descrito anteriormente, se analizaron las células dendríticas mieloides obtenidas mediante los protocolos que emplean TNF- α o INF- γ mediante citometría de flujo para la expresión de CD1a, CD4, CD14, CD40, CD45RA, CD45R0, CD68, CD69, CD83, CD184, CD195, CD206, CD207, CD208, y/o CD209 (es decir., DC-SIGN) con mAb de ratón dirigidos contra IgG1 κ humana.

(MOPC-21/P3 como control). Dependiendo de si se emplearon únicamente uno o dos mAb, se tiñeron los antígenos tanto directamente con FTTC, PE, o anticuerpos marcados con PC5, como se tiñeron indirectamente con mAb en primer lugar sin marcar más IgG policlonal secundaria x FITC (disponible de eBioscience).

Se empleó MOPC-21/P3 como el isotipo IgG1 κ del control. Los resultados sirvieron a tres objetivos, es decir

- (a) Para verificar que las células diferenciadas *in vitro* presentaban fenotipos DC genuinos
- (b) Para definir sus diferencias fenotípicas e interindividuales, y
- (c) Para comparar la expresión de un marcador dado con el modelo del histograma presentado tras la incubación con liposomas dirigidos por el mismo anticuerpo.

Antes del direccionamiento de DC, y para cada comienzo de ensayo, se incubaron 20 µl de un anticuerpo dirigido contra CD209 (DC-SIGN) y/u otro anticuerpo a dilución de trabajo con 30 µl de liposomas en un rotador durante 1 h a TA. Se incubaron alícuotas de suspensión celular de al menos 5×10^4 DC (o, cuando se emplean, macrófagos) con liposomas en condiciones de saturación durante 3 h a TA en condiciones de agitación, y a continuación se examinaron mediante citometría de flujo (las condiciones ensayadas fueron 1 h, 3 h y 24 h. Los resultados más fiables y reproducibles se obtuvieron mediante incubación simultánea durante 3 h).

Cepas de VIH. Se obtuvieron cepas de VIH del NIH Repository (Rockville Pike, Bethesda, MD), es decir, M-(R5-) trópica Ada-M y Ba-L; y T-(X4-) trópica HXB3, Lai, Lai/IIIB y HTLV-IIIB. Se ensayaron cepas de VIH para su "dosificación infectiva del 50% del cultivo de tejido" (DICT50) de acuerdo con los protocolos conocidos en la materia. De acuerdo con los resultados de DICT50, se diluyeron los sobrenadantes víricos, se distribuyeron en alícuotas y se congelaron a -80°C hasta que se emplearon para la infección a diferentes cinéticas de dosis-infección.

Crioalmacenamiento de linfocitos T. Se almacenaron linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ separados, linfocitos T completos, o linfocitos totales (comprendiendo linfocitos T y B) individualmente o como combinados de dos a cuatro donantes (para estimulación alogénica) a -80°C o -196°C, de acuerdo con los procedimientos conocidos en la materia. Dichas células se descongelaron cuando se necesitaron para los cultivos mixtos de leucocitos autólogos o alogénicos, o para los ensayos de antígenos de recuerdo.

Liposomas y fármacos antivíricos. Para los objetivos experimentales principales, se marcaron superficialmente los liposomas con Proteína A de tal manera que se unen indistintamente anticuerpos específicos para diferentes antígenos. Se atraparon estos liposomas en calceína como colorante trazador fluorescente. Para encontrar un sistema director de fármaco adecuado, se puede emplear un intervalo de fármacos individuales o combinados que interfieren con la propagación de VIH (por ejemplo, Viread® [tenofovir], Retrovir® [AZT], Epiriv® [3-TC], Zerit® [d4T], Videx® [didanosine], Emtriva® [emtricitabine], Sustiva® [efavirenz], Viramun® [nevirapine], Rescriptor® [delavirdine], Norvir® [ritonavir], Agenerase® [amprenavir], Hivid® [ddC], lopinavir, Kaletra® [lopinavir + ritonavir], Viracept® [nelfinavir], Crixivan® [indinavir sulfate], Fortovase® [saquinavir], Invirase® [mesilato de saquinavir] y/o Atazanavir®), así como otros fármacos que se encuentran todavía en fase experimental de investigación terapéutica para obtener pruebas de la eficacia anti-VIH.

ELISA para el antígeno núcleo p24 de VIH. Se pueden ensayar sobrenadantes de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la presencia de p24 mediante un ELISA comercialmente disponible (Abbott Laboratories).

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para VIH. Se puede determinar el grado de integración del ADN provírico de VIH en el ADN de la célula dendrítica hospedadora usando parejas de cebadores anidadas (qPCR semianidada) para las secuencias províricas de VIH, tales como los siguientes:

Cebadores externos: 5'-agt-ggg-ggg-aca-tca-agc-agc-cat-gca-aat-3' //(SEQ ID NO: 1)

5'-tca-tct-ggc-ctg-gtg-caa-3' //(SEQ ID NO: 2)

Cebadores internos: 5'-cag-ctt-aga-gac-cat-caa-tga-gga-agc-5g-3' (5-FAM) //(SEQ ID NO:3); este es un cebador LUX marcado con 5-carboxifluoresceína, es decir, 5-FAM; "5" = 5-FAM).

5'-ggt-gca-ata-ggc-cct-gca-t-3' //(SEQ ID NO:4).

Se puede llevar a cabo el aislamiento del ADN de acuerdo con las instrucciones del fabricante ("Kit Easy-ADN", en el protocolo nº 3 "Pequeñas cantidades de células, tejidos, u hojas de plantas", Invitrogen). La mezcla de reacción de la PCR incluye normalmente lo siguiente: Tampón (5 µl de 10Xtampón Rxn de PCR, Invitrogen); MgCl₂ (3 µl de MgCl₂ 50 mM, Invitrogen); dNTP (1 µl de una mezcla de dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 10 mM, de cada uno); Cebador externo (SEQ ID NO: 1; 1 µl de 10 pmol/µl); Cebador externo (SEQ ID NO: 2; 1 µl de 10 pmol/µl); Taq (0,2 µl de 5 Unidades/µl, ADN Polimerasa Platino Taq, Invitrogen); agua bidestilada (37 µl); muestra de ADN (2 µl). Un perfil de ciclación térmica normalizada fue el siguiente: 5 min a 95°C; (20 s a 95°C; 30 s a 55°C; 30 s a 72°C) x 25; 2 min a 72°C; mantener a 4°C. Se repitió generalmente la PCR usando dos microlitros de ADN amplificado transferido desde la primera reacción en una mezcla de reacción de PCR reciente, excepto que se usaron los cebadores internos (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) en vez de los cebadores externos, y empleando un perfil de ciclación térmica diferente; 5 min a 95°C; (20 s a 95°C; 30 s a 55°C; 30 s a 72°C) x 35; 2 min a 72°C (curva de fusión a 95°C hasta 55°C en etapas de 0,5°C).

En una muestra dada, se puede conseguir la cuantificación del ADN mediante comparación con una dilución en serie de una muestra de ADN de cantidad conocida de ADN provírico de VIH. Para permitir la cuantificación del ADN provírico de VIH procedente de las muestras con diferentes contenidos de ADN celular total (por ejemplo, de células dendríticas), se puede llevar a cabo una PCR Multiplex. De manera breve, se puede llevar a cabo una segunda PCR anidada en la misma reacción, con un cebador LUX marcado con succinimil éster de 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, de una secuencia de cromosoma humano (equivalente del genoma). Esto permite la cuantificación del contenido de ADN total por muestra. Se pueden calcular los números de copias províricas por equivalente del genoma humano a partir de dichos datos.

Ejemplo 2. Direccionamiento activo de células inmunes con inmunoliposomas mono-específicos o biespecíficos

Se evaluaron células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) de acuerdo con su tamaño (dispersión hacia adelante) y la granularidad (dispersión lateral) y de esta forma se clasificaron como linfocitos T y B inmaduros; los linfocitos T y los linfocitos B activados; y los monocitos, incluyeron una pequeña proporción de células dendríticas de la sangre (no se muestran los datos). Se ensayaron células dendríticas derivadas de monocitos cultivados (MoDC) para la expresión de marcadores que delineaban su etapa de desarrollo (madurez), así como para los marcadores del subtipo DC. Las DC expresaron marcadores típicos de los fenotipos DC de la piel y la mucosa que se considera que juegan un papel clave en la infección por VIH. Cuando se infectan por ruta mucosal, las DC mucosales son el primer tipo de célula inmune que se va a infectar directamente por el VIH (e integra su información genética como ADN provírico) y/o cosecha VIH en su superficie mediante DC-SIGN y/o capta VIH mediante diversos mecanismos para retener éste en los compartimentos intracitoplasmáticos (por ejemplo, endosomas, fagoendosomas fusionados, o fagolisosomas). A continuación dichas células migran a los nódulos linfáticos regionales y locales en donde pasan en VIH o en otros tipos de células, más principalmente linfocitos T colaboradores (es decir, "células CD4") así como otras células de depósito, que incluyen la siguiente generación de DC que configuran el nódulo linfático. Considerando todo esto, las DC generadas en el sistema *in vitro* de los inventores proporcionan de esta manera un modelo ideal para probar la presunta eficacia directora de dichas células *in vivo*.

Las MoDC maduraron el día 7 del cultivo con GM-CSF, se probaron IL-4 y TNF- α posteriormente por citometría de flujo para la expresión de los marcadores generalmente expresados por las DC o subpoblaciones de las mismas. Aparte de DC-SIGN (CD-209), los inventores escogieron marcadores que delineaban las DC maduras *in vitro* e *in vivo* (CD40, CD45R0, CD83), así como las células de Langerhans dendríticas de la epidermis (CD1a) y de la mucosa intestinal (CD4) y nasal (CD14). La Fenotipación sirvió de esta manera (i) para verificar las MoDC generadas *in vitro* como maduras; (ii) para proporcionar una fuerte expresión de DC-SIGN (CD209) como la diana preconcebida para la administración inmunoliposomal del compuesto a las MyDC; (iii) para identificar los potenciales antígenos dianas conforme a los requerimientos de una expresión muy consistente; y (iv) para determinar si las MoDC generadas expresaban CD1a y/o CD14 como estructuras directoras potenciales expresadas por las células de Langerhans epidérmicas y mucosales *in vivo*.

Las intensidades de fluorescencia promedio relativas (Δ MF1) de las condiciones de ensayo frente a los controles negativos (n = 3) caracterizaron el perfil fenotípico de las MoDC maduras como CD1a⁺⁺⁺, CD4[±], CD14^{± a+++}, CD40^{++ a+++}, CD45R0^{+ a+++}, CD83⁺ y CD209⁺⁺⁺ [con: (-), anticuerpo de ensayo congruente con el control negativo; (±) pico de Δ MF1 \leq x5 por encima del control negativo, (+), pico de Δ MF1 \leq 10 por encima del control negativo; y (+++), pico de Δ MF1 \geq 250 el control negativo. De todos los marcadores ensayados, la expresión de CD14 varió más considerablemente entre los donantes. En contraste, DC-SIGN (CD209) y CD1a (un marcador de las células de Langerhans) desvelaron consistentemente una elevada expresión en todos los donantes examinados.

La Fig. 1 muestra el direccionamiento de los liposomas marcados con calceína a las MoDC mediadas por DC-SIGN u otros ligandos directores. Se generaron MoDC maduras *in vitro* durante 7 días. Se incubaron los liposomas tanto con uno como con dos anticuerpos monoclonales (mAb) específicos de marcadores clave expresados por las MoDC, con el fin de obtener liposomas mono-específicos (de CD1a, CD83, o CD209) o liposomas biespecíficos (de CD1a + CD83, CD1a + CD209, o CD 83 + CD209) (Zhou LJ, Tedder TF, CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells, Proc Natl Acad Sci USA.; 93 (6):2588-92 [1996]; Gieseler R, Heise D, Soruri A, Schwartz P, Peters JH, In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes, Develop Immunol.; 6(1-2): 25-39 [1998]. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG, Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses, Cell; 100(5): 575-85 [2000]; Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y, DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells, Cell;100(5): 587-97 [2000]).

Se obtuvieron mejores resultados cuando se incubaron las MoDC maduras con liposomas durante 3 h a 37°C con agitación suave continua. Empleando el protocolo anteriormente descrito, las variantes directoras adicionales incluyeron ahora CD1a y CD83 como dianas potenciales expresadas por las células de Langerhans en los tejidos que se forman en la superficie (Teunissen MBM, Dynamic nature and function of epidermal Langerhans cells *in vivo* and *in vitro*: a review, with emphasis on human Langerhans cells, Histochem. J. 24:697-716 [1992]), as well as mature intralymphoid MyDCs (Zhou LJ, Tedder TF, CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells, Proc Natl Acad Sci USA 93: 2588-92 [1996]; Gieseler R y col., In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes, Dev Immunol 1998; 6:25-39 [1998]). Los marcadores CD1a y CD83 volvieron a ser comparativamente diferentes de las estructuras directoras. En contraste, el direccionamiento de DC-SIGN mostró de Nuevo una elevada unión y captación liposomal del fluorocromo (Fig. 2).

Los anticuerpos monoclonales (mAb) y los inmunoliposomas marcados con mAb ensayados fueron específicos de CD4, CD45R0 y CD209 (DC-SIGN). Los experimentos mostraron el tiempo de incubación más favorable para las MyDc maduras con inmunoliposomas e investigaron si la incubación tanto con uno como con dos tipos de

inmunoliposomas (el último a la mitad de las concentraciones empleadas tras el direccionamiento individual) podía ofrecer una ventaja decisiva. La unión de los mAb específicos visualizados con anticuerpos secundarios marcados con FITC (columna a mano izquierda) desveló el grado de expresión del antígeno (Ag). Las MyDc maduras generadas procedentes de los mismos donantes se incubaron durante 1, 3 o 24 h con inmunoliposomas a 37°C [un experimento preliminar había probado que a 37°C era superior que a 4°C o a TA (no se muestra)] (Fig. 1, columna derecha). Los histogramas citométricos de flujo para la Fenotipación o el direccionamiento (curvas sombreadas) y los controles negativos (curvas vacías) desvelaron la mejor relación señal a ruido, una captación más consistente y una reproducibilidad más elevada durante la incubación de 3 h. Se encontró una tinción más intensa para los anticuerpos dirigidos contra CD209 y, secundariamente, para los anticuerpos dirigidos contra CD45R0. La combinación de ambas condiciones no tuvo ventaja sustancial sobre el direccionamiento Monoespecífico de DC-SIGN. Como se muestra en la Fig. 1, el direccionamiento y la administración más eficaces de los contenidos liposomales se consiguió con el direccionamiento monoespecífico liposomal de CD209 (DC-SIGN). Cuando se compararon las eficacias directoras de los mAb solos y de los mAb acoplados a LS, resultó evidente que la administración liposomal condujo a una fluorescencia (intra)celular aumentada. Esto demostró que la administración liposomal de calceína condujo a un desplazamiento a la derecha en comparación con el FITC conjugado con el anticuerpo.

La Fig. 2 muestra el direccionamiento liposomal monoespecífico con respecto a la cinética y a la eficacia. A diferencia de los experimentos anteriores (véase la Fig. 1) en los que se habían incubado las células con liposomas durante 2 h antes de la cosecha y la medida, los inventores investigaron aquí la cinética temporal de y la captación liposomal, es decir, la captación de calceína en numerosos puntos temporales durante un periodo de 24 horas. Aunque las MoDC expresaron CD14 en un amplio intervalo de densidades de membrana (véase a mano izquierda de la gráfica), este modelo fenotípico no se reflejó tras el direccionamiento. Por el contrario, el direccionamiento de CD209 (DC-SIGN) desveló de nuevo la velocidad de captación más elevada; también, los modelos de expresión del antígeno (a mano izquierda de la gráfica) y la eficacia del direccionamiento (gráfica de 3 h) fueron muy similares. Esto implica que tras la unión de los liposomas dirigidos a CD209, los complejos de DC-SIGN-liposoma estaban aparentemente casi completamente internalizados, administrando de esta manera el contenido liposomal a los compartimentos intracelulares. Esta conclusión es consistente con una función principal conocida para el receptor de CD209, es decir, la captación de partículas infecciosas más grandes en un amplio intervalo de tamaño que incluyen antígenos, VIH, *Candida albicans*, y *Leishmania amastigotes* (por ejemplo, Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Franssen J, Figdor CG, Pigué V, van Kooyk Y., The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells, *J Immunol.* 168(5): 2118-26 [2002]; Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR, DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection, *Immunity* 16(1): 135-44 [2002]; Cambi A, Gijzen K, de Vries JM, Torensma R, Joosten B, Adema GJ, Netea MG, Kullberg BJ, Romani L, Figdor CG, The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells, *Eur J Immunol.* 33(2): 532-8 [2003]; Colmenares M, Puig-Kroger A, Pello OM, Corbi AL, Rivas L, Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania amastigotes*, *J Biol Chem.* 277(39): 36766-69, [2002]).

La Fig. 4A (panel izquierdo) y la Fig. 4B (panel izquierdo) muestran los valores calculados de direccionamiento y de unión superficial de los inmunoliposomas monoespecíficos aplicados a las MoDC; los resultados representados gráficamente son representativos de al menos tres experimentos independientes. En la Fig. 4A se proporcionan los porcentajes de las MoDC que expresan marcadores de selección (fluorescencia con FTTC), y las MoDC dirigidas con los correspondientes inmunoliposomas (fluorescencia con calceína). Como las concentraciones de FTTC y la calceína fueron equimolares en todas las condiciones de mAb o liposomas, se podría determinar la eficacia de direccionamiento neta liposomal (TE_{ILS}) y la fluorescencia relativa de los inmunoliposomas frente a los mAb (RF_{ILS}) (ecuaciones IV y V Fig. 4B). De todas las variantes ensayadas Los inmunoliposomas monoespecíficos que dirigen DC-SIGN desvelaron la TE_{ILS} más elevada y fueron la única preparación que mostró un valor de RF_{ILS} positivo (indicando la acumulación liposomal en o dentro de las MoDC dirigidas).

La eficacia directora liposomal de los liposomas acoplados a CD209 fue de 83,31% (Fig. 4A, panel izquierdo), y la gráfica de unión/captación de LS respectiva de la Fig. 1 demuestra para todas las células un desplazamiento a la derecha (curva sombreada) en relación con el pico del control (curva abierta). Esto indica que el 100% de las células se ha dirigido eficazmente, incluso cuando solo expresaban débilmente DC-SIGN. Segundo, a primera vista, las combinaciones de liposomas anti-DC-SIGN con liposomas anti-CD1 o anti-CD83 (liposomas biespecíficos) no tiene por efecto un aumento de la captación. Sin embargo, en los comienzos combinatorios, las concentraciones de anticuerpos fueron solo la mitad de las empleadas cuando se llevaba a cabo el direccionamiento únicamente con un anticuerpo. Por tanto, por tanto, se indagaron investigaciones adicionales para determinar si el direccionamiento biespecífico puede, de hecho, potenciar la eficacia del direccionamiento, cuando se compara con el direccionamiento monoespecífico.

La Fig. 3 ilustra el direccionamiento liposomal de las DC mediante dos marcadores celulares (denominado "direccionamiento biespecífico", que incluyen la dependencia del tiempo de la eficacia del direccionamiento en un periodo de 24 h. Se llevó a cabo el direccionamiento biespecífico con todas las combinaciones de 2 miembros, o las permutaciones, de CD4, CD45R0 y CD209. Como en la Fig. 2, los mejores resultados fueron, de nuevo aquí,

obtenidos tras la incubación de 3 h de las células con liposomas dirigidos.

La Fig. 3A muestra los resultados de la combinación de los ligandos directores anti-CD4 más anti-CD45R0. Sin tener en cuenta el tiempo de incubación, cuando se compara con el experimento que se muestra en la Fig. 2, se obtuvo un efecto sustractivo sobre la captación liposomal. La combinación de un direccionamiento específico anti-CD4 y anti-CD45R0, por tanto, no parece apoyar una potenciación de la captación por un subconjunto de células doble positivo, por ejemplo, la población de linfocitos T de recuerdo en reposo que residen en los órganos linfáticos. Se observó un resultado similar para los liposomas que transportaban la combinación de ligandos directores anti-CD209 más anti-CD45R0 (Fig. 3C).

La Fig. 3B muestra los resultados de la combinación de los ligandos directores anti-CD4 más anti-CD209. Cuando se comparó con el experimento que se muestra en la Fig. 2, hubo un efecto aditivo sobre la captación liposomal como resultado de la combinación de los ligandos directores. Para resaltar, la abscisa en la Fig. 3B muestra la captación liposomal como un incremento *logarítmico* en la fluorescencia. Por tanto, la mejora de la captación mediante el direccionamiento combinado de CD4 y CD209 fue al menos en un factor de 2 y de esta manera, de acuerdo con la invención, el direccionamiento liposomal de células dendríticas que emplea una combinación de ligandos directores anti-CD4 y anti-CD209 puede ser un opción útil, por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad por VIH. Los adipocitos, otro depósito de VIH, pueden dirigirse también mediante el direccionamiento de CD4 y CD45 (por ejemplo, Hazan, U. y col., Human adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 receptors: a new target cell type for the immunodeficiency virus-1? FASEB J. 16, 1254-1256 [2002; Erratum in: FASEB J. 16: 4 (2000); Kannisto, K. y col., Expression of adipogenic transcription factors, peroxisome proliferator activated receptor γ and co-activator 1, IL-6 and CD45 in subcutaneous adipose tissue in lipodystrophy associated with highly active antiretroviral therapy, AIDS 17, 1753-1762 [2003]).

A la mitad de la concentración de saturación en los comienzos biespecíficos, pareció que el direccionamiento de CD209 compensaba en gran manera la ausencia de eficacia de direccionamiento de las variantes dirigidas a CD1a o CD83 (B; biespecífico: barras de línea sólida). Sin embargo, la comparación entre los comienzos monoespecíficos y biespecíficos de CD209 (Fig. 4^a) desveló que, incluso en condiciones medias de saturación, se han marcado *todas* las células que expresan DC-SIGN, lo que dio como resultado una TE_{ILS} de 107,46% para CD1a/CD209 y una TE_{ILS} de 112,17% para CD83/CD209 (Fig. 4B; biespecífico; barras de raya discontinua; aproximaciones debidas a la condición de saturación del anti-CD209 de referencia en la Fig. 4A). Ambos resultados para la saturación y sin saturación de los liposomas específicos de CD209 sugieren para las MyDC una cinética de captación limitando a TE_{ILS} a aproximadamente 110%.

En la Fig. 4B (panel derecho) una eficacia de direccionamiento neta on un valor (+) positivo indica que el porcentaje de células dirigidas eficazmente fue mayor que el porcentaje reconocido solo por el anticuerpo; los valores (-) negativos indican un direccionamiento menos eficaz que con el anticuerpo; un valor de -100% indica que no se han dirigido todas las células. Todos los valores se refieren a 3 horas de incubación simultánea de las células y los liposomas dirigidos. Las tres mejores condiciones de direccionamiento fueron CD209 > CD83 + CD209 > CD1a + CD209. La eficacia de direccionamiento para los inmunoliposomas biespecíficos que se dirigían a CD4 + CD45R0 fue del 58,54%; la eficacia de direccionamiento para los inmunoliposomas biespecíficos que se dirigían a CD4 + CD209 fue del 68,74% la eficacia de direccionamiento para los inmunoliposomas biespecíficos que se dirigía a CD4R0 + CD209 fue del 62,21%.

Los datos presentados en el presente documento indican que un sistema dirigido a DC-SIGN puede dirigir diferentes poblaciones de depósito de VIH, es decir, subconjuntos de células dendríticas mieloides y macrófagos, para administrar compuestos inhibidores de VIH de alguno o de todos los tipos actualmente conocidos. De acuerdo con la presente invención, se pueden dirigir estas poblaciones de depósitos para integrar los virus unidos a DC-SIGN para la generación sucesiva de inmunidad así como para eliminar los virus de las superficies celulares, y se puede evitar la transferencia del virus de madre a hijo durante el embarazo. DC-SIGN está fuertemente expresado por los tipos mucosal y de la piel de las células dendríticas en seres humanos y macacos (Geijtenbeek, TB y col., DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission, Curr Top Microbiol Immunol. 2003; 276: 31-54 [2003]; Yu Kimata MT y col., Capture and transfer of simian immunodeficiency virus by macaque dendritic cells is enhanced by DC-SIGN, J Virol. 76(23): 11827-36 [2002]). De esta manera, tratando los individuos infectados por VIH con liposomas dirigidos a DC-SIGN, de acuerdo con la presente invención, se ofrece el beneficio de dirigir activamente la primera población celular infectada y afectada en la etiología de la enfermedad por VIH.

DC-SIGN se expresa además por las células dendríticas y otras localizadas en el interior de algunas estructuras anatómicas placentales. (Por ejemplo, Soilleux EJ y col., Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV, J Pathol. 195(5): 586-92 [2001]; Soilleux EJ, Coleman N, Transplacental transmission of HIV: a potential role for HIV binding lectins, Int J Biochem Cell Biol. Mar de 2003; 35(3): 283-7 [2003]; Kämmerer U y col., Unique appearance of proliferating wrogen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy, Am J Pathol. 162(3): 887-96 [2003]). De esta manera, si se administra mediante aplicación intravenosa, subcutánea, o directa *en el útero*, el procedimiento inventivo ofrece el beneficio de dirigir aquellas células que aparentemente juegan un papel principal en la transferencia del VIH de madre a hijo, denominada también transmisión vertical.

Ejemplo 3. Estudios de captación mediante microscopio de fluorescencia.

Tras infección por VIH-1, se puede demostrar la existencia de compartimentos intracitoplasmáticos con acumulación de virus infecciosos en MyDC tanto inmaduras como maduras (Frank, I y col., Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs, *J Virol* 76:2936-51 [2002]). De este modo y para comparación, se incubaron MoDC inmaduras o maduras durante 3, 4 o 5 h a 37°C con liposomas dirigidos contra CD209 marcados (cada uno a n = 3). A continuación las células se cosecharon como se ha indicado anteriormente y se pipetearon suavemente para disociar las agrupaciones homotípicas (según se controla por el microscopio de fases). Las células individuales aglomeradas se disolvieron sucesivamente en 100 µl de medio de montaje ProLong antiapagamiento al que se había añadido en 5 µM el colorante de ADN de unión a AT positivamente cargado, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ambos de Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU). Cincuenta ml de cada preparación se transfirieron a portas revestidos con poli-L-lisina (Labscientific, Livingston, NY, EEUU), se taparon con un porta, se sellaron y mantuvieron en la oscuridad durante al menos 15 min antes de someterse a observación. Considerando aproximadamente 100 por preparación, las MoDC se cribaron a continuación con un microscopio Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Thornwood, NY, EEUU para determinar la fluorescencia superficial e intracelular de la calceína (verde) y del ADN/núcleos (azul). Se tomaron tomografías fotomicrográficas de las MyDC que mostraban una tinción representativa en paso se 0,5 mm, consiguiendo 27-35 secciones en serie por célula (lo que implica de este modo un intervalo de diámetros para las MyDC de 13,5-17,5 µm a n = 12). La fotografía digital se llevó a cabo mediante una cámara ORCA-1 CCD (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, EEUU). El procesamiento fotográfico, unión de la fluorescencia verde y azul, así como la edición de las microtomografías para generar una película de video que representaras las MyDCs con profundidad óptica se llevó a cabo con el programa informático Northern Elite V.6.0 (Empix Imaging, Cheek Towaga, NY, EEUU). Las células muertas quedaron excluidas de la evaluación por tinción nuclear con yoduro de propidio así como por su tinción nuclear DAPI extraordinariamente brillante. Los inmunoliposomas que llevaban el mAb MOPC21/P3 se tomaron como controles negativos; los controles positivos emplearon anticuerpos dirigidos contra CD209 mAb X FITC.

La Figura 5 ilustra la unión superficial frente a la internalización de liposomas dirigidos determinados por microscopía de fluorescencia como se ha descrito anteriormente. Para distinguir entre la fluorescencia intracelular de la producida en la membrana externa, los autores tomaron, en pasos de 0,5 mm, de 27 a 35 microtomografías por cuerpo MoDC. Tras 3 h de incubación con liposomas específicos de CD209 (correspondiente al estado de CD209 mostrado en la Figura 4B), el marcado de calceína verde se observó únicamente sobre la superficie celular y quedó principalmente confinada a los montones de DC-SIGN más grandes ricos en lípidos (Figura 5, panel 1; representa la sección óptica media). La superposición de todas las secciones en serie de la misma célula revela otro montón DC-SIGN de lípidos superpuesto sobre la parte inferior del primer plano y algo de fluorescencia dispersada correspondiente al tamaño de los liposomas (Figura 5, panel 2). Sin embargo, tras 5 h de incubación, la calceína atrapada en los liposomas se había internalizado por completo. En todas las aproximadamente 100 MoDC observadas por dolencia, las células revelaron zonas de fluorescencia intracelular tanto difusas como concentradas (Figura 5, paneles 3-8). De forma importante, las zonas que mostraban una intensidad de fluorescencia mucho menor (Figura 5, panel 3; punta de flecha) se identificaron siempre como núcleos, demostrando claramente la administración intracelular del compuesto trazador (Figura 5, panel 4; que representa la célula mostrada en la Figura 5, panel 3, unida a la tinción azul nuclear con DAPI). Ocasionalmente, se continuó observando cierta tinción de los liposomas en los montones de superficie enriquecida en CD209 (Figura 5, panel 5; flecha) mientras que la mayor parte de la calceína fue internalizada (Figura 5, panel 5; punta de flecha). En ese momento, se observaron compartimentos fuertemente enriquecidos en calceína en todas las MoDC (Figura 5, panel 6; punta de flecha), y aproximadamente la cuarta parte de estos revelaron una prominente fluorescencia perinuclear (Figura 5, panel 7). Dependiendo de la cantidad de captación, a veces esta zona cubrió una gran parte del espacio extranuclear (Figura 5, panel 8). Aunque los resultados obtenidos con MyDC inmaduras incubadas en las mismas condiciones fueron esencialmente análogos, la captación intracelular de liposoma/calceína se observó aproximadamente tras 4 h de incubación (no se muestra por separado). La extinción rápida de la fluorescencia extracelular con azul de tripano bloqueó completamente la fluorescencia cuando las células se habían incubado durante 3 h, pero no tuvo efecto tras 5 h de incubación, confirmando de esta forma los resultados representados en la Figura 5.

Los controles negativos no mostraron unión superficial ni captación, mientras que los controles positivos quedaron rápidamente unidos e internalizados (no se muestra). Al añadir mAb conjugado con FITC específico de DC-SIGN a las MyDC humanas maduras con lipopolisacáridos, Schjetne y col. Habían demostrado que se localizaba extracelularmente 15 min después, e intracelularmente tras 45 min (Schjetne KW y col., A mouse Ck -specific T cell clone indicates that DC-SIGN is an efficient target for antibody-mediated delivery of T cell epitopes for MHC class II presentation, *Int Immunol* 14: 1423-30 [2002]). Al emplear DC generadas por un protocolo ligeramente distinto, los resultados en los controles positivos de los inventores con mAb dirigido contra DC-SIGN marcado con FITC fueron similares.

Por el contrario, la captación intracelular de los liposomas dirigidos más grandes tardó más, hasta 5 horas, dependiendo de la etapa de madurez de las MoDC. Aunque estos resultados implican que el tamaño de las partículas unidas a DC-SIGN se correlacionan inversamente con el tiempo necesario para la captación, el tamaño de los liposomas empleados en el presente documento (con un diámetro promedio de aproximadamente 150 nm) no

imposibilita su captación. De este modo, al sustituir el compuesto trazador por fármacos adecuados, estos liposomas, de acuerdo con la invención son valiosos vehículos de direccionamiento a DC. Este razonamiento queda adicionalmente respaldado por la expresión superficial muy consistente de CD209 (DC-SIGN) con, por ejemplo, al menos 1×10^5 moléculas por MoDC proporcionando de esta forma una diana muy fiable (Baribaud F y col., Quantitative expression and virus transmission analysis of DC-SIGN on monocyte-derived dendritic cells, *J Virol* 76:913 5-42 [2002]). De forma importante, la eficacia directora demostrada por los inventores se consiguió en presencia de lectina unida a manano o manosa (MBL) que muy probablemente –ya que se trata de una sustancia hepatoadministrada (Downing, I y col., Immature dendritic cells possess a sugar-sensitive receptor for human mannanbinding lectin, *Immunology* 109:360-4 [2003])- constituye un componente de la pequeña cantidad de suero fetal bovino empleado durante el cultivo y la incubación. En cualquier caso, se ha demostrado recientemente que MBL se secreta siempre de forma autóloga mediante las MoDC inmaduras humanas (Downing I y col., Immature dendritic cells possess a sugar-sensitive receptor for human mannan-binding lectin, *Immunology* 2003;109:360-4 [2003]). Además, MBL, mediante su propio dominio de lectina tipo C, puede evitar que el VIH-1 se una a DC-SIGN (Spear GT y col., Inhibition of DC-SIGN-mediated trans infection of T cells by mannose-binding lectin, *Immunology* 2003;110:80-5 [2003]). Así, las MBL solubles (y quizás otras moléculas no identificadas que muestran propiedades similares) no eviten que los liposomas específicos de DC-SIGN de la invención interactúen con la lectina de tipo C unida a la membrana.

Con el uso de un trazador atrapado en el liposoma, la calceína, los inventores han demostrado mediante citometría de flujo y matemáticamente una eficacia de direccionamiento superior para DC-SIGN, en comparación con otros marcadores MyDC seleccionados (CD1a, CD4, CD45R0, CD83). La microscopía de fluorescencia reveló además una unión a la superficie dependiente del tiempo y una captación intracelular de liposomas específicos de DC-SIGN por las MyDC tanto inmaduras como maduras. La eficacia de direccionamiento neta encontrada por los autores de los inmunoliposomas específicos de DC-SIGN, así como los estudios de captación fluoromicrográfica, revelaron claramente una unión, internalización y administración intracelular del compuesto eficaces. Los inventores han demostrado que los inmunoliposomas dirigidos a DC-SIGN (es decir, incluyendo el ligando director que se une específicamente a CD209) llevan su contenido a MyDC tanto inmaduras como maduras, y que, además de la distribución citoplasmática, su contenido se acumula fuertemente en compartimentos intracelulares discretos (Figura 5), o en endosomas, respectivamente. Estas observaciones, junto con el hecho de que el VIH-1 y los liposomas administrados tienen un tamaño comparable, permiten que el sistema de administración de la invención alcance exactamente los mismos compartimentos en los que el VIH-1 altamente infeccioso se ubica y queda a salvo de cualquier ataque sistémico hasta su liberación para infectar otras células Th adicionales. Los agentes adecuados administrados inmunoliposomalmente, de acuerdo con la presente invención, alcanzarán así un importante santuario al que no se había accedido todavía con ninguna estrategia terapéutica. Otra ventaja importante es que, debido al hecho de que estos liposomas quedan retenidos en la superficie de las MyDC durante tiempo prolongado, las células Th que interactúan con las DC dentro de los órganos y tejidos linfoides en el curso de la estimulación específica de antígeno también pueden alcanzarse terapéuticamente mediante esta estrategia (Gieseler RK, Marquitan G, Hahn MJ, Perdon LA, Driessen WHP, Sullivan SM, Scolaro MJ, DC-SIGN-specific liposomal targeting and selective intracellular compound delivery to human myeloid dendritic cells: implications for HIV disease, *Scand J Immunol*;59:415-24 [2004]; Marquitan G, Gieseler RK, Driessen WHP, Perdon LA, Hahn MJ, Wader T, Sullivan SM, Scolaro MJ, Intracellular compound delivery to human monocyte-derived dendritic cells by immunoliposomal targeting of the C-type lectin DC-SIGN. *MACS & MORE*, en prensa [2004]).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Gieseler, Robert K.
 Marquitan, Guido
 Scolaro, Michael J.
 5 Sullivan, Sean M.
 <120> FORMULACIONES DIRIGIDAS A LÍQUIDOS PARA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS A CÉLULAS INMUNES MIELOIDES Y LINFOIDES
 <130> 23046-81110
 <150> US 60/503.769
 10 <151> 17-09-2003
 <150> US 60/567.376
 <151> 30-04-2004
 <160> 4
 <170> FastSEQ para windows Versión 4.0
 15 <210> 1
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador
 <400> 1
 agtgggggga catcaagcag ccatgcaaat 30
 <210> 2
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 30 tcatctggcc tgggcaa 18
 <210> 3
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador; marcado con 5-carboxifluoresceina
 <400> 3

cagcttagag accatcaatg aggaagcg 28
<210> 4
<211> 19
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 4
ggtgcaatag gccctgcat 19
10

REIVINDICACIONES

1.- Un complejo lípido-fármaco que comprende un fármaco y que comprende además ligandos directores en una superficie exterior que unen específicamente a la superficie de una célula inmune al menos una combinación de los siguientes marcadores:

5 CD209 y CD4; o
CD209 y CD45R0

en el que dicho fármaco es un agente inmunomodulador que se activa en una célula inmune a la que se dirige dicho o ligando director y en el que dicho ligando director es un anticuerpo monoclonal.

10 2.- El complejo lípido-fármaco de la reivindicación 1 en el que dicho complejo lípido-fármaco es un complejo liposoma-fármaco.

3.- El complejo lípido-fármaco de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho complejo lípido-fármaco comprende además en la superficie externa una proteína A de *Staphylococcus aureus* adaptada para unirse específicamente a la inmunoglobulina G (IgG).

15 4.- El complejo lípido-fármaco de la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo monoclonal queda específicamente unido por dicha proteína A de *Staphylococcus aureus*.

5.- El complejo lípido-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho complejo lípido-fármaco comprende uno o más fármacos secundarios.

6.- El complejo lípido-fármaco de la reivindicación 1, en el que dicho agente inmunomodulador es un inmunosupresor.

20 7.- El complejo lípido-fármaco de la reivindicación 1, en el que dicho agente inmunomodulador es un agente inmunoactivador.

8.- El complejo lípido-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha célula inmune se selecciona entre el grupo que consiste en una célula progenitora mieloide, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago y un linfocito T.

9.- El complejo lípido-fármaco de la reivindicación 8 en el que dicho linfocito T es un linfocito T de recuerdo.

25 10.- El complejo lípido-fármaco de la reivindicación 8 en el que dicha célula dendrítica se selecciona entre el grupo que consiste en una célula dendrítica mieloide, una célula dendrítica plasmacitoide, y una célula dendrítica folicular.

30 11.- Un procedimiento *ex vivo* o *in vitro* para administrar preferentemente un fármaco a una célula de mamífero del tipo seleccionado entre el grupo que consiste en una célula progenitora mieloide, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago y un linfocito T, en el que el fármaco se dirige al tipo de célula seleccionado mediante el complejo lípido-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12.- El procedimiento *in vitro* de la reivindicación 11 en el que dicho tipo celular es infectado por un agente infeccioso.

13.- El complejo lípido-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso para prevenir o tratar una dolencia infecciosa o inmune.

35 14.- El uso del complejo lípido-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una infección por un agente infeccioso.

15.- El uso de la reivindicación 14 en el que dicho agente infeccioso es un virus, una bacteria, un hongo, un protozoo o un prión.

40 16.- El uso de la reivindicación 15 en el que dicho virus se selecciona entre el grupo que consiste en VIH, VSH, VEB, CMV, virus Ebola y Marburg, VHA, VHB, VHC y VPH.

17.- El uso de la reivindicación 16 en el que dicho virus se selecciona entre el grupo que consiste en VIH-1 y VIH-2.

18.- Uso del complejo lípido-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una dolencia infecciosa o inmune; opcionalmente una dolencia organoespecífica o autoinmune sistémica.

45 19.- Uso del complejo lípido-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la fabricación de un medicamento para tratar una proliferación patológica de células inmunes, un cáncer linfoide primario o metastásico o una dolencia autoinmune.

Figura 1

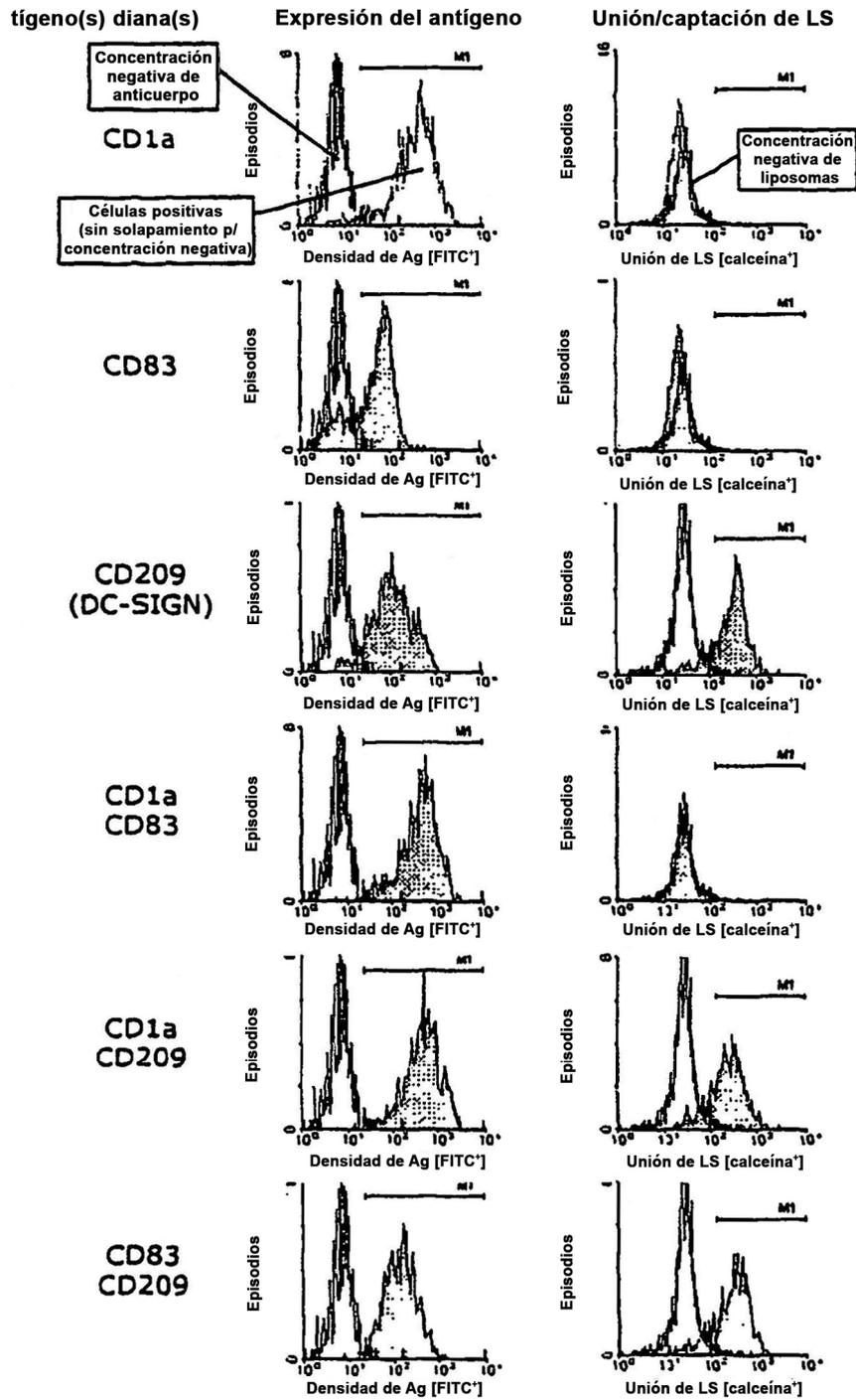
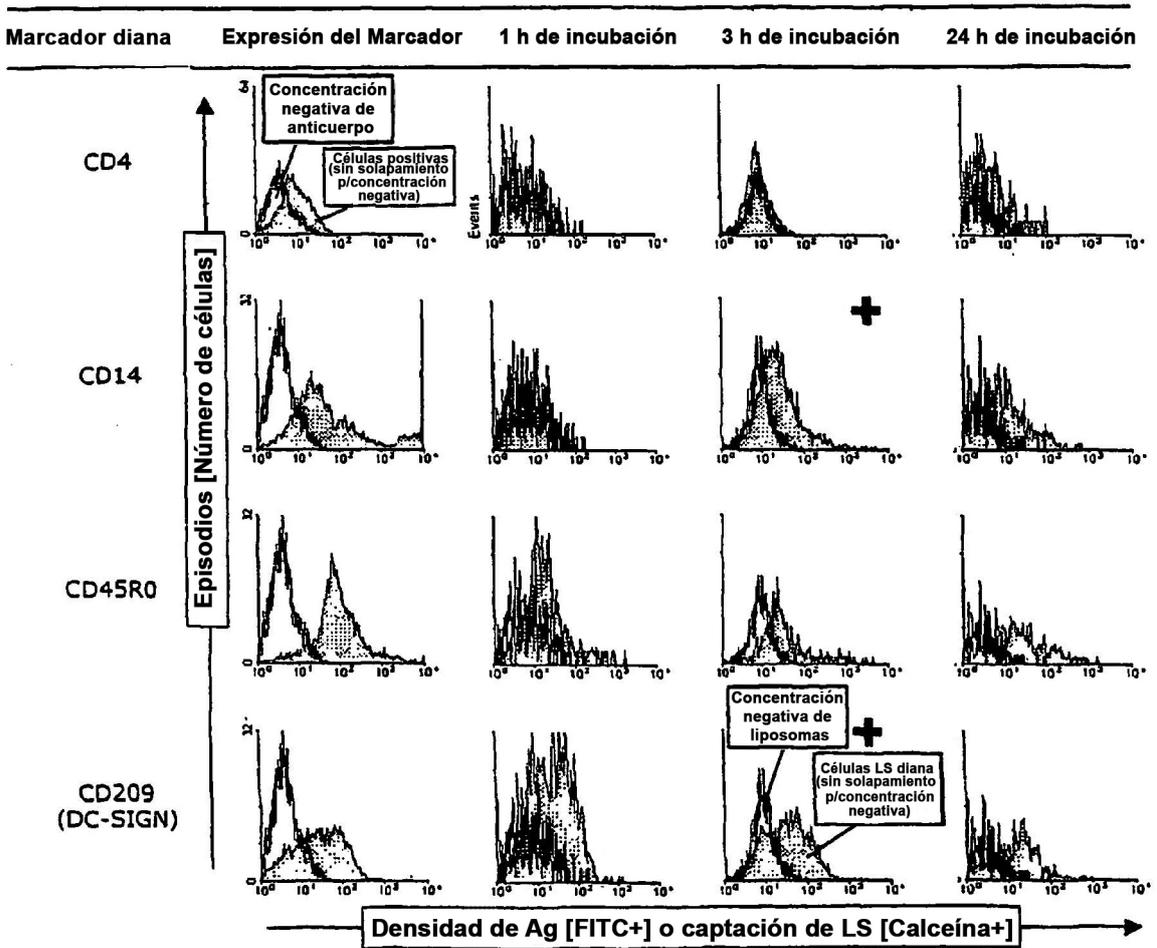


Fig. 2



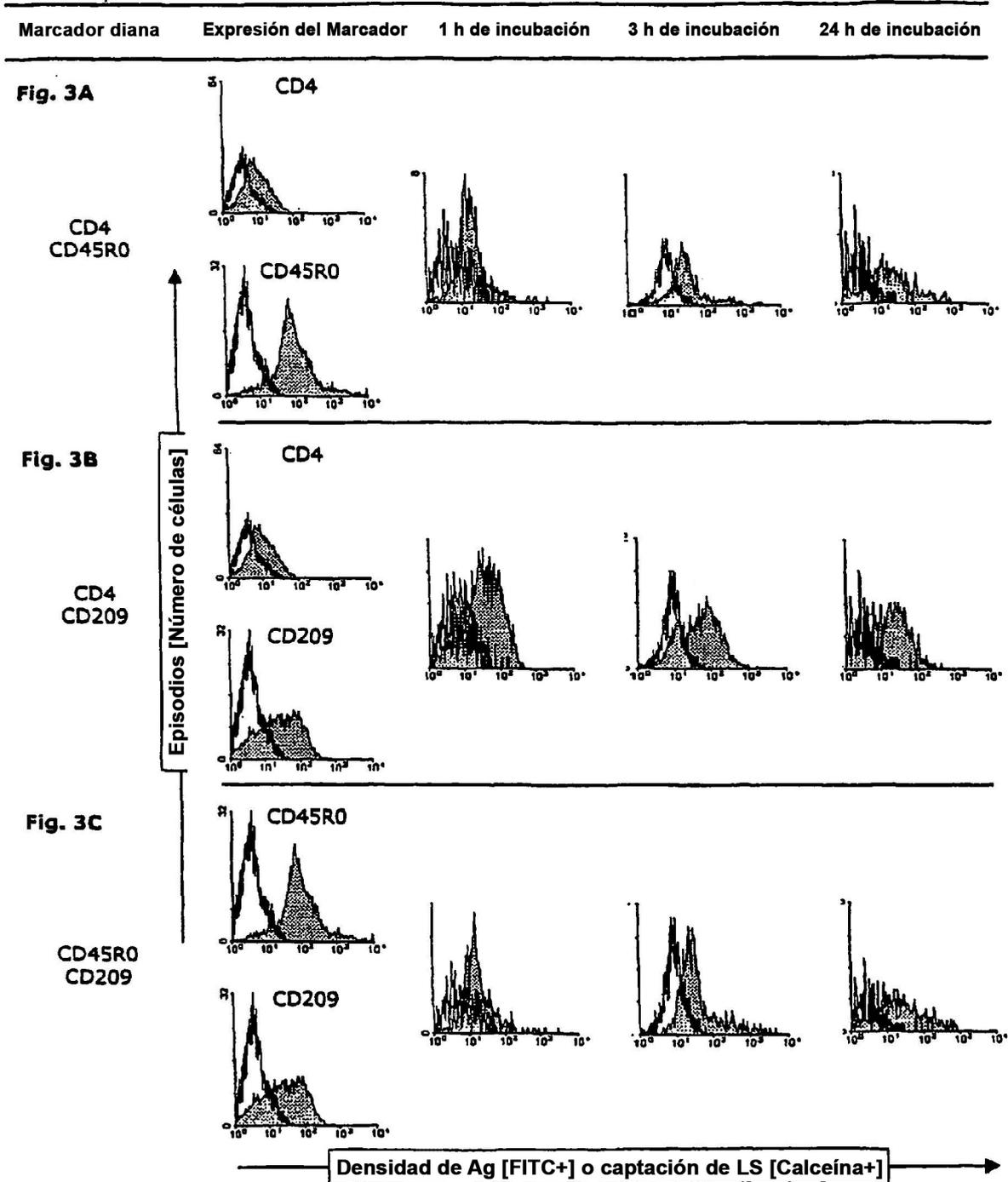


FIG. 4A

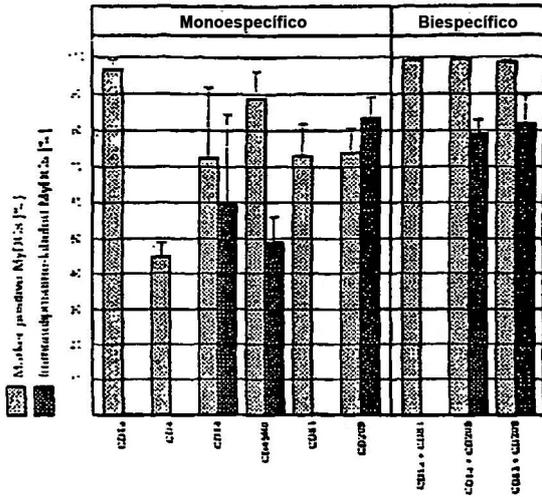


FIG. 4B

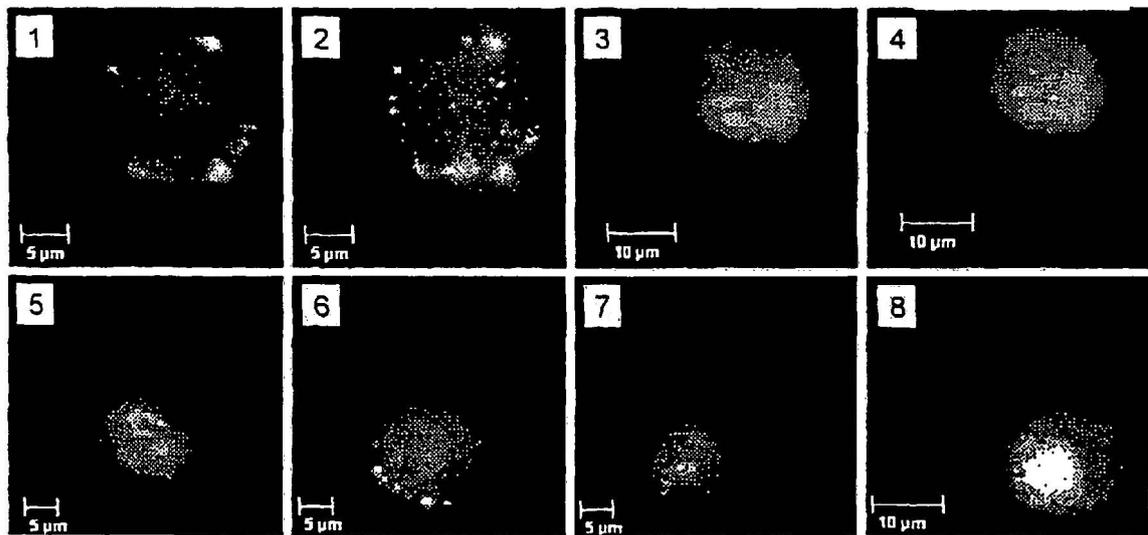
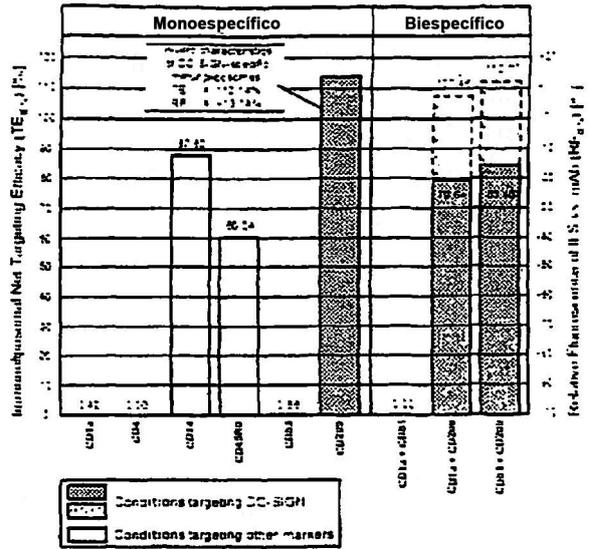


FIG. 5