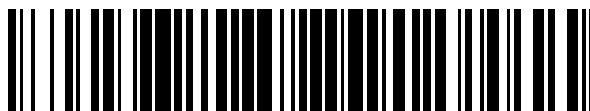


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 531**

51 Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05725950 .9**
96 Fecha de presentación: **21.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1761248**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2007**

54 Título: **Liposomas derivatizados con hidratos de carbono para la selección como diana de dominios de reconocimiento de hidratos de carbono celulares de lectinas CTL/CTLD y suministro intracelular de compuestos terapéuticamente activos**

30 Prioridad:
19.03.2004 US 554790 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2012

73 Titular/es:
**RODOS BIOTARGET GMBH
FEODOR-LYNEN-STR. 23
30625 HANNOVER, DE**

72 Inventor/es:
**GIESELER, Robert K.;
MARQUITAN, Guido;
SCOLARO, Michael J. y
SCHWARZ, Andreas**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 388 531 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

Liposomas derivatizados con hidratos de carbono para la selección como diana de dominios de reconocimiento de hidratos de carbono celulares de lectinas CTL/CTLD, y suministro intracelular de compuestos terapéuticamente activos

Antecedentes de la invención

1. Campo de la Invención

La presente invención se refiere a las técnicas médicas, y en particular, al suministro liposómico dirigido de agentes activos.

2. Discusión de la técnica relacionada

I. Enfermedades infecciosas crónicas: VIH/SIDA y otras enfermedades infecciosas

Los agentes infecciosos llaman a la acción a un sistema inmunitario. En un sistema avanzado evolutivamente tal como el de un ser humano o un animal vertebrado, esto implica normalmente que se active la inmunidad específica de antígeno, y se conforme en y se dirija contra, el invasor. En este sentido, las células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) son las primeras células inmunitarias que reconocen y procesan el agente infeccioso, de modo que inician respuestas específicas de antígeno primarias. Tal como se comenta en el presente documento, tales CPA también portan receptores de lectinas CRD que se unen (e internalizan) al invasor. Por una parte, tal acoplamiento es un medio poderoso para ayudar a que una CPA conforme la respuesta protectora requerida; por otra parte, un patógeno también puede aprovecharse de este mecanismo en beneficio propio.

En el sentido específico comentado en el presente documento, esto puede significar que el agente infeccioso utiliza el receptor integrador para entrar en la CPA, paraliza o dirige erróneamente las funciones reguladoras del sistema inmunitario de las CPA, y reside además dentro de compartimentos intracitoplasmáticos, tales como endosomas, en forma intacta. Una CPA de este tipo, normalmente ubicada dentro de un órgano linfóide, se acopla físicamente de manera continua por multitud de células T que solicitan instrucciones. Esto significa que una célula T, una vez que establece contacto, corre un alto riesgo de llegar a infectarse por patógenos liberados desde la CPA. En esencia, esta es la naturaleza de un reservorio de patógenos (es decir, en el ejemplo de una CPA como célula reservorio).

En efecto, puesto que las CPA presentan determinadas partículas procesadas del agente en su superficie, parece muy probable que una CPA alterada por un agente de formación de reservorio se acoplará, con probabilidad aumentada, por células T específicas para este agente. Como consecuencia, podría esperarse además que tales células T llegasen a infectarse más probablemente y, como en el caso de enfermedad por VIH, se destruyeran más frecuentemente. En efecto, Douek y colaboradores han mostrado que las células T cooperadoras de memoria específicas de VIH contienen más ADN proviral de VIH que aquellas células de memoria no específicas para VIH (Douek, D.C. *et al.* HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 2002; 417:95-8). Estos resultados destacan que el mayor peligro de un reservorio de patógenos, además de establecer un estado crónico de enfermedad, pueden ser la desactivación completa de la inmunidad protectora frente al invasor. Esto puede ser mortal.

Según el conocimiento actual, las CPA profesionales comprenden cuatro clases principales de células, es decir, (i) células dendríticas mieloides (CDm); (ii) células dendríticas plasmocitoides (CDp); (iii) células dendríticas foliculares (CDF); y (iv) macrófagos (MF). En el organismo de mamíferos, estas células se ubican tanto en órganos como tejidos no linfoides (determinados subconjuntos de CDm inmaduras; determinados subconjuntos de CDp; y determinados subconjuntos de MF), así como tejidos y órganos linfoides (determinados subconjuntos de CDm maduras [también denominadas CD interdigitantes, o CDI]; determinados subconjuntos de CDp; determinados subconjuntos de MF; y CDF) (Imai Y, Yamakawa M, Kasajima T. The lymphocyte-dendritic cell system. *Histol Histopathol* 1998; 13:469-510; y Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5:919-23).

Entre las CPA profesionales, las CDm son los estimuladores más potentes de inmunidad específica de antígeno, y también tienen la capacidad única para inducir respuestas inmunitarias humorales y celulares primarias (por ejemplo, en la mucosa intestinal, tal como se revisa en Telemo E, Korotkova M, Hanson LA. Antigen presentation and processing in the intestinal mucosa and lymphocyte homing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 90(Supl. 3):28-33, o en el microentorno del ojo Novak N, Siepmann K, Zierhut M, Bieber T. The good, the bad and the ugly – APCs of the eye. *Trends Immunol* 2003; 24:570-4).

En cuanto a los MF, la presentación de antígenos es una de las varias funciones de estas células. Los MF pueden desencadenar respuestas específicas de antígeno secundarias iniciadas con más antelación por las CDm (tales como, por ejemplo, en el cerebro, tal como se revisa en Thomas WE. Brain macrophages: on the role of pericytes

and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 31:42-57).

La principal función conocida de las CDp es producir potentes interferones de tipo I antivirales (Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5:919-23).

Finalmente, al menos en condiciones sanas, la presencia de las CDF se limita estrictamente a los folículos dentro de tejidos y órganos linfoides en los que instruyen a células B para la producción de inmunoglobulinas específicas de antígeno. De manera importante, las CDF proporcionan una potente memoria a largo plazo para antígenos, o patógenos intactos completos tales como virus, reteniendo estas estructuras dentro de sus abundantes proyecciones citoplasmáticas (revisado en van Nierop K, de Groot C. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin Immunol* 2002; 14:251-7).

Es digno de mención que las CDm y los MF median la inmunidad de células T (o celular) y su memoria (Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96; y Banchereau J, Pacesny S, Blanco P *et al.* Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987:180-7), mientras que las CDF realizan la inmunidad de células B (o humoral) y su memoria (Burton G F, Conrad DH, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cells (FDC) and B cell co-stimulation. *J Immunol* 1993; 150:31; y Qin D, Wu J, Carroll MC, Burton GF, Szakal AK, Tew JG. Evidence for an important interaction between a complement-derived CD21 ligand on follicular dendritic cells and CD21 on B cells in the initiation of IgG responses. *J Immunol* 1988; 161:4549).

En el contexto de la invención descrita en el presente documento ha de hacerse hincapié en que las CPA profesionales pueden proporcionar un reservorio a largo plazo para agentes infecciosos, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC) y bacterias persistentes de manera intracelular, tales como *Mycobacterium tuberculosis* (Cambi A, Figdor CG. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:539-46; y Kaufmann SHE, Schaible UE. A Dangerous liaison between two major killers: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV target dendritic cells through DC-SIGN. *J Exp Med* 2003; 197; 1-5). Además, tras la infección, también pueden establecerse reservorios de patógenos latentes similares en linfocitos T distintos de las CPA, tales como de memoria, en reposo y/o senescentes (Voehringer D, Blaser C, Brawand P, Raulet DH, Hanke T, Pircher H. Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells. *J Immunol* 2001; 167:4838-43; Douek, D.C. *et al.* HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 2002; 417:95-8).

Por definición, diversos términos, es decir, reservorio, santuario, latencia y dormancia, se utilizan actualmente en la bibliografía para describir el fenómeno patológico de que pueden almacenarse agentes infecciosos intactos durante tiempos indefinidos en células y sitios anatómicos diferenciados (por ejemplo, Schragger LK, D'Souza MP. Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *JAMA* 1998; 280:67-71; y Savla U. Reservoir: a dirty word in HIV. *J Clin Invest* 2004; 113:146). En cuanto a la invención descrita en el presente documento, debido al hecho de que los términos santuario, latencia, y dormancia también se usan en diferentes contextos, la definición de Nickle *et al.*, en la que "los reservorios virológicos son tejidos y tipos celulares en los que existe una restricción relativa de replicación" se usa en el presente documento (Nickle DC, Jensen MA, Shriner D, Brodie SJ, Frenkel LM, Mittler JE, Mullins JI. Evolutionary indicators of human immunodeficiency virus type 1 reservoirs and compartments. *J Virol* 2003; 77:5540-6). El término, reservorio, se emplea además cuando se hace referencia a los compartimentos intracelulares específicos en los que se almacenan agentes infecciosos estructuralmente intactos.

Con el fin de idear y concebir terapias causales para la enfermedad por VIH y otras enfermedades infecciosas en las que se establecen santuarios infecciosos, debe ser el objetivo final eliminar el agente patógeno de sus reservorios celulares. Tal como se comenta de nuevo en el ejemplo de VIH-1, ahora se está de acuerdo ampliamente en que la formación, y persistencia, de reservorios celulares de VIH es el factor más importante para prevenir que el tratamiento antiretroviral altamente activo (HAART) del estado de la técnica elimine el VIH del sistema (revisado en Stebbing J, Gazzard B, Douek CD. Where does HIV live? *N Engl J Med* 2004; 350:1872-80). Esto se debe al hecho de que, en estos sitios reservorio, un agente infeccioso, tal como VIH-1, no se replica activamente (Nickle DC, Jensen MA, Shriner D, Brodie SJ, Frenkel LM, Mittler JE, Mullins JI. Evolutionary indicators of human immunodeficiency virus type 1 reservoirs and compartments. *J Virol* 2003; 77:5540-6).

A la inversa, HAART sólo interfiere con VIH-1 en replicación activa. Normalmente, además de un inhibidor de proteasa (IP) de VIH, los protocolos de HAART implican un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa inversa (INTI) y/o un inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa (INNTI). Ambos, los INTI y los INNTI, bloquean específicamente el mecanismo de transcripción genómica viral activa (por ejemplo, Ena J, Amador C, Benito C, Fenoll V, Pasquau F. Risk and determinants of developing severe liver toxicity during therapy with nevirapine-and efavirenz-containing regimens in HIV-infected patients. *Int J STD AIDS* 2003; 14:776-81). Por tanto, por diseño, los viriones no replicantes, confinados en reservorios permanecen sin verse afectados por tal tratamiento que, por tanto, nunca pueden eliminar el VIH del sistema.

- Se aplica exactamente la misma conclusión a otros agentes infecciosos que establecen reservorios intracelulares, y para los que el tratamiento se basa en la interferencia con la replicación activa únicamente. Por ejemplo, éste es el caso para el virus de la hepatitis C (VHC) en el que el tratamiento del estado de la técnica, además de aplicar interferón- α como inmunoestimulante, emplea ribavirina (McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER *et al.* Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339:1485-92; y Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V *et al.* Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339:1493-9).
- Además, la aplicación de HAART en la enfermedad por VIH conlleva diversos efectos secundarios. Por ejemplo, el tratamiento actual actúa de manera perjudicial metabólicamente (Lee GA, Seneviratne T, Noor MA, Lo JC, Schwarz J-M, Aweeka FT, Mulligan K, Schambelan M, Grunfeld C. The metabolic effects of lopinavir/ritonavir in HIV-negative men. *AIDS* 2004; 18:641-9), quizá ejemplificado de la manera más destacada por el desarrollo de lipodistrofia, es decir, el síndrome de redistribución del tejido adiposo asociado a VIH (Pond CM. Paracrine relationships between adipose and lymphoid tissues: implications for the mechanism of HIV-associated adipose redistribution syndrome. *Trends Immunol* 2003; 24:13-8). Además, se descubrió recientemente que, en pacientes infectados por VIH con HAART, las redes de citocinas de células T se preactivan de forma tónica debido a la hiperactivación endógena dependiente del fármaco de la ruta de AMPc/PKA de tipo I (Johansson CC, Bryn T, Yndestad T, Eiken HG, Bjerkeli V, Frøland SS, Aukrust P, Taskén K. Cytokine networks are pre-activated in T cells from HIV-infected patients on HAART and are under the control of cAMP. *AIDS* 2004; 18:171-9). Por tanto, como la activación de una célula T que alberga ADN proviral coactiva la transcripción y propagación de VIH, el propio tratamiento actual puede agravar el transcurso de la enfermedad.
- La replicación productiva de VIH requiere la transcripción inversa de su genoma de ARN, la integración (parcial) en el ADN bicatenario de la célula huésped, y la transcripción a partir del molde de ADN proviral integrado, así como a partir de determinadas formas de ADN viral no integrado (Wu Y. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* 2004; 1:13). De manera importante, los virus de ARN tales como VIH y VHC eluden eventualmente el tratamiento con inhibidores de la transcriptasa inversa desarrollando cepas resistentes como resultado de la frecuente mutación debido a su carencia de un mecanismo de corrección de lectura (por ejemplo, Major ME, Reherrmann B, Feinstone S. Hepatitis C Viruses. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds.). *Fields Virology*. 4ª ed., Vol. I. Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore; 2001: págs. 1127-62). Por tanto, rutas adecuadas para inactivar retroviriones infecciosos estructuralmente intactos antes de la transcripción inversa prometen reducir significativamente, o prevenir por completo, la aparición de cepas resistentes a fármacos. Esto puede lograrse mediante rutas para inactivar tales viriones cuando están almacenados en células reservorio virales (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* 2003; 300:1295-7. Epub 1 de mayo de 2003; Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, Dable J, Stössel H, Romani N, Piatak M Jr, Lifson JD, Pope M, Cunningham AL. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 2004; 103:2170-9. Epub 20 de noviembre de 2003; y Arrighi JF, Pion M, Garcia E, Escola JM, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB, Piguët V. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* 2004; 200:1279-88).

A. Reservorios anatómicos y celulares

- Tal como se comenta tanto a modo de ejemplo como específicamente para VIH, este virus se conserva en forma infecciosa en reservorios celulares y anatómicos. Los reservorios celulares pueden consistir principalmente en (i) células dendríticas foliculares; (ii) células dendríticas mieloides; (iii) macrófagos; y (iv) células T de memoria (revisado en Schragger LK, D'Souza MP. Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *JAMA* 1998; 280:67-71; Burton GF, Keele BF, Estes JD, Thacker TC, Gartner S. Follicular dendritic cell contributions to HIV pathogenesis. *Semin Immunol* 2002; 14:275-84; y Gieseler RK, Marquitan G, Sclaro MJ, Cohen MD. Lessons from history: dysfunctional APCs, inherent dangers of STI and an important goal, as yet unmet. *Trends Immunol* 2003; 24:11). Estas células residen preferentemente en reservorios anatómicos diferenciados.
- Los primeros hallazgos que apuntaban a la existencia de reservorios celulares y anatómicos de VIH se notificaron en los años 1980 (Müller H, Falk S, Stutte HJ. Accessory cells as primary target of human immunodeficiency virus HIV infection. *J Clin Pathol* 1986; 39:1161; Le Tourneau A, Audouin J, Diebold J, Marche C, Tricottet V, Reynes M. LAV-like viral particles in lymph node germinal centers in patients with the persistent lymphadenopathy syndrome and the acquired immunodeficiency syndrome-related complex: an ultrastructural study of 30 cases. *Hum Pathol* 1987; 17:1047-53; y Biberfeld P, Ost A, Porwit A, Sandstedt B, Pallesen G, Bottiger B, Morfelt-Mansson L, Biberfeld G. Histopathology and immunohistology of HTLV-III/LAV related lymphadenopathy and AIDS. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1987; 95:47-65; y Gritti FM, Rause E, Gualandi G, Bonazzi L, Martuzzi M, Schiattone ML, Di Pede B, Gallo R, Rivano MT, Taruscio D, *et al.* A clinical-immunological evaluation of AIDS cases and related syndromes. *J Exp Pathol* 1987; 3:723-36). Desde entonces, se ha tenido conocimiento de que varios tejidos y órganos, y tipos celulares diferenciados ubicados en los mismos, sirven al VIH como sitios reservorio.

1. El reservorio anatómico de VIH

El tracto gastrointestinal: en la mayoría de los pacientes, la infección por VIH-1 se produce a través del tracto gastrointestinal. (Smith PD, Meng G, Salazar-Gonzalez JF, Shaw GM. Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *J Leukoc Biol* 2003; 74:642-9. Epub 11 de agosto de 2003). Sin embargo, las cifras totales pueden cambiar en el futuro inmediato, puesto que ya hoy en día la vía vaginal es la ruta de infección clave en los continentes africano y asiático (Hu Q, Frank I, Williams V, Santos JJ, Watts P, Griffin GE, Moore JP, Pope M, Shattock RJ. Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J Exp Med* 2004; 199:1065-75. Epub 12 de abril de 2004). (Para más información, véase a continuación.) En el tracto gastrointestinal, la mayoría de VIH transmitido, que es trópico para CCR5, puede transferirse mediante células epiteliales CCR5⁺ intestinales (Smith PD, Meng G, Salazar-Gonzalez JF, Shaw GM. Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *J Leukoc Biol* 2003; 74:642-9. Epub 11 de agosto de 2003). En comparación con la sangre, el tracto gastrointestinal, y los ganglios linfáticos, el tracto gastrointestinal revela la reducción de células T CD4⁺ más sustancial, preferentemente células T CCR5⁺CD4⁺, en todos los estadios de la enfermedad por VIH (Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. CD4⁺ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200:749-59. Epub 13 de septiembre de 2004). Específicamente dentro de la mucosa intestinal, los linfocitos CCR5⁺ y CXCR4⁺ son las células diana iniciales y soportan la replicación de VIH-1. En efecto, de todos los sitios anatómicos, la reducción profunda de células T CD4⁺ resulta evidente por primera vez justo después de la infección en la lámina propia intestinal. Sin embargo, en el transcurso posterior de la enfermedad, las células mieloides se vuelven cada vez más importantes ya que las células reservorio de VIH-1 como generaciones sucesivas de monocitos sanguíneos se reclutan hacia la mucosa en la que se diferencian en los macrófagos de la lámina propia. En efecto, estos macrófagos regionales pertenecen a la mayor reserva anatómica de células mononucleares. Por tanto, aunque sólo el 0,06% de los macrófagos intestinales albergan viriones, son un importante reservorio de VIH (Smith PD, Meng G, Salazar-Gonzalez JF, Shaw GM. Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *J Leukoc Biol* 2003; 74:642-9. Epub 11 de agosto de 2003). Los macrófagos, por tanto, son el principal tipo de célula reservorio de VIH en la mucosa gastrointestinal.

Tejidos y órganos linfoides: ambos directamente asociados con el tracto gastrointestinal, así como en diversos sitios periféricos, los tejidos y órganos linfoides (por ejemplo, los ganglios linfáticos) son otro reservorio anatómico de VIH principal (Racz P, Tenner-Racz K, van Vloten F, Schmidt H, Dietrich M, Gluckman JC, Letvin NL, Janossy G. Lymphatic tissue changes in AIDS and other retrovirus infections: tools and insights. *Lymphology* 1990; 23:85-91; Wood GS. The immunohistology of lymph nodes in HIV infection: a review. *Prog AIDS Pathol* 1990; 2:25-32; Marcoty C, Heinen E, Antoine N, Tsunoda R, Simar LJ. Rapid and selective isolation of follicular dendritic cells by low speed centrifugations on discontinuous BSA gradients. *Adv Exp Med Biol* 1993; 329:425-9; Rosenberg YJ, Kosco MH, Lewis MG, Leon EC, Greenhouse JJ, Bieg KE, Eddy GA, Zack PM. Changes in follicular dendritic cell and CD8⁺ cell function in macaque lymph nodes following infection with SIV251. *Adv Exp Med Biol* 1993; 329:417-23; A, Burton GF, Fuchs BA, Szakal AK, Tew JG. Destruction of follicular dendritic cells in murine acquired immunodeficiency syndrome. *Adv Exp Med Biol* 1993; 329:411-6; Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Cohen OJ, Vaccarezza M, Gantt K, Muro-Cacho C, Fauci AS. Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol Rev* 1994; 140:105-30; Cavert W, Notermans DW, Staskus K, Wietgreffe SW, Zupancic M, Gebhard K, Henry K, Zhang ZQ, Mills R, McDade H, Schuwrth CM, Goudsmit J, Danner SA, Haase AT. Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science* 1997; 276:960-4; Soontornniyomkij V, Wang G, Kapadia SB, Achim CL, Wiley CA. Confocal microscopy assessment of lymphoid tissues with follicular hyperplasia from patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:534-8; y Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4⁺ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:625-56). En términos cuantitativos, las células dendríticas foliculares son la principal población reservorio de VIH en los tejidos y órganos linfoides.

El sistema nervioso central: al infectar el sistema nervioso central, el VIH provoca diversos síntomas neuroconductuales y neuropatológicos. En su forma grave, se denominan comúnmente demencia asociada a VIH (DAV). En personas que se benefician del tratamiento de estado de la técnica, este síndrome es menos grave y se denomina trastorno cognitivo-motor menor (TCMM). Actualmente, se cree que las células reservorio de VIH en el cerebro median los procesos neurogenerativos que conducen a DAV o TCMM (González-Scarano F, Martín-García J. The neuropathogenesis of AIDS. *Nature Rev* 2005; 5:69-81). Debido a la acumulación de viriones de VIH demostrables, los hallazgos iniciales sugirieron el plexo coroideo como aún otro sitio reservorio de VIH (Hanly A, Petitto CK. HLA-DR-positive dendritic cells of the normal human choroid plexus: a potential reservoir of HIV in the central nervous system. *Hum Pathol* 1998; 29:88-93; y Petitto CK, Chen H, Mastro AR, Torres-Munoz J, Roberts B, Wood C. HIV infection of choroid plexus in AIDS and asymptomatic HIV-infected patients suggests that the choroid plexus may be a reservoir of productive infection. *J Neurovirol* 1999; 5:670-7). Sin embargo, dispersos por la totalidad del cerebro, la microglía y los astrocitos también están infectados por VIH. Cuando intentaban establecer con exactitud posibles factores de entrada, Liu *et al.* encontraron que la microglía expresa CD4⁺, CCR5⁺ y CCR3⁺, que se sabe que participan todos en la infección de células T. Los astrocitos, por otra parte, no expresan CD4 (el receptor de VIH clave en células T), sino sólo los cofactores CCR5 y PCR3. No obstante, resultó entonces que ambos tipos celulares, con el receptor de manosa, expresan una lectina de tipo C, que se demostró que era esencial para la infectividad de VIH-1 independiente de CD4 en astrocitos y microglía. De manera importante, tras la unión

del virus, la infección intracelular posterior depende del tráfico endocítico de VIH, ya que el proceso puede bloquearse por inhibidores endosomotrópicos y lisosomotrópicos (Liu Y, Liu H, Kim BO, Gattone VH, Li J, Nath A, Blum J, He JJ. CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol* 2004; 78:4120-33. Errata en: *J Virol* 2004; 78:7288-9). Estos hallazgos están en línea con el hecho de que la lectina de tipo C receptora de manosa media la pinocitosis tanto por astrocitos como por la microglía, y la fagocitosis por la microglía (Regnier-Vigouroux A. The mannose receptor in the brain. *Int Rev Cytol* 2003; 226:321-42). Finalmente, en la expansión en un estudio previo que reveló una población de células estromales VIH⁺ en el plexo coroideo, Hanly y otros entonces, por primera vez, documentaron una población de células dendríticas en el plexo coroideo humano normal. Los autores también mostraron que, en esta ubicación, exactamente estas células albergan VIH y, por tanto, son el reservorio celular de VIH del plexo coroideo (Hanly A, Petit CK. HLA-DR-positive dendritic cells of the normal human choroid plexus: a potential reservoir of HIV in the central nervous system. *Hum Pathol* 1998; 29:88-93). Por tanto, las células reservorio de VIH en el cerebro humano son de origen mielomonocítico y expresan receptores de lectina de tipo C.

Placenta, sangre del cordón, mama en periodo de lactancia y cuello uterino: de manera importante, el organismo femenino presenta reservorios anatómicos de VIH adicionales que permiten la transmisión de madre a hijo del virus durante el embarazo y, potencialmente, tras el parto. En cuanto a la transmisión al embrión/feto, se sabe desde hace tiempo que la infección por VIH efectúa cambios fenotípicos celulares en la placenta (Goldstein J, Braverman M, Salafia C, Buckley P. The phenotype of human placental macrophages and its variation with gestational age. *Am J Pathol* 133; 1988:648-59). Incluso antes de estos hallazgos, se había identificado un receptor de manosa en la placenta humana (Lennartz MR, Cole FS, Shepherd VL, Wileman TE, Stahl PD. Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from human placenta. *J Biol Chem* 1987; 262:9942-4) que, cuando se caracterizó, reveló dominios de reconocimiento de hidratos de carbono (Taylor ME, Conary JT, Lennartz MR, Stahl PD, Drickamer K. Primary structure of the mannose receptor contain multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J Biol Chem* 1990; 265:12156-62). Eventualmente, este receptor de manosa se correlacionó con la unión eficaz del VIH (Curtis BM, Schamowske S, Watson AJ. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:8356-60). En cuanto a su verdadera expresión celular, Soilleux y colaboradores identificaron entonces el receptor en células dendríticas placentarias (Soilleux EJ, Barten R, Trowsdale J. DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR, and CD23 form a cluster on 19p13. *J Immunol* 2000; 165:2937-42). Además, resultó evidente que el tejido placentario también expresa otras lectinas de tipo C, tales como hSRCL tipos I y II (Nakamura K, Funakoshi H, Miyamoto K, Tokunaga F, Nakamura T. Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:1028-35), así como CL-P1, que se limita a las células endoteliales vasculares placentarias (Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Kase T, Keshi H, Sakai Y, Fukuoh A, Sakamoto T, Itabe H, Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Wakamiya N. The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276:44222-8. Epub 19 de septiembre de 2001). Finalmente, también se encontró que DC-SIGN se expresa en la placenta y se mostró por primera vez en macrófagos placentarios especializados (Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, Trowsdale J, Montaner LJ, Doms RW, Weissman D, Coleman N, Lee B. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* 2002; 71:445-57). Aún de manera importante, Kämmerer *et al.* identificaron entonces una población de células dendríticas DC-SIGN⁺ inmaduras uterinas limitada a la decidua asociada al embarazo. El caso de que estas células revelaron alta proliferación y están asociadas físicamente de manera estrecha con un subconjunto de linfocitos citolíticos naturales (Kämmerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, van Kooyk Y, Kämpgen E. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol* 2003; 162:887-96) indica que son de suma importancia en la transferencia de madre a hijo de VIH. Finalmente, células adicionales de gran preocupación para la transferencia asociada al embarazo de VIH, son los monocitos de la sangre del cordón que pueden dar lugar a células dendríticas infectadas por VIH (Folcik RM, Merrill JD, Li Y, Guo CJ, Douglas SD, Starr SE, Ho WZ. HIV-1 infection of placental cord blood monocyte-derived dendritic cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10:609-20), aún más que cuando se observa como telón de fondo que sus monocitos precursores ya son susceptibles a la infección por VIH (Weinberg JB, Matthews TJ, Cullen BR, Malim MH. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med* 1991; 174,1477-82; y Zhu T. HIV-1 genotypes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol* 2000; 68:338-44).

En cambio, no se sabe mucho actualmente sobre una transmisión de madre a hijo de VIH tras el parto. Todavía, Ichikawa y colaboradores encontraron que monocitos de sangre periférica sanos, cuando se exponen a leche materna *in vitro*, comenzaron a producir GM-CSF, de lo que habitualmente son incapaces. Además, cuando se añadió sólo IL-4 exógena, estas células se diferenciaron en células dendríticas mieloides CD1⁺. De la manera más intrigante, también se encontró que los macrófagos recién aislados de leche materna producían GM-CSF de modo autocrino y, en presencia sólo de IL-4 exógena, se diferenciaban en células dendríticas que estimulaban eficazmente respuestas de células T (Ichikawa M, Sugita M, Takahashi M, Satomi M, Takeshita T, Araki T, Takahashi H. Breast milk macrophages spontaneously produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and differentiate into dendritic cells in the presence of exogenous interleukin-4 alone. *Immunology* 2003; 108:189-95). Tal como se describe en detalle a continuación, los monocitos, macrófagos y células dendríticas mieloides son todos componentes del reservorio de VIH. Por tanto, aunque no se sabe en este momento, en las madres en periodo de

lactancia infectadas por VIH, puede esperarse que una parte tanto de los monocitos/macrófagos de leche materna como las células dendríticas mieloides fácilmente derivadas a partir de los mismos, albergue VIH. Si se verifica, esto aumentaría definitivamente el riesgo de transmisión vertical de madre a lactante del virus a través de la leche materna. En este caso, y debido al hecho de que los monocitos, macrófagos y células dendríticas mieloides expresan lectinas de tipo C, se esperaría además que la leche materna porte una población reservorio de VIH móvil, con el potencial de establecerse como reservorio quimérico viral en el lactante. Tal escenario está respaldado por los resultados obtenidos en la mucosa cervicouterina humana. Cuando se evaluaron inhibidores de la entrada de VIH-1 para determinar su capacidad para prevenir la infección por VIH de células dentro de, y la diseminación desde, el cuello uterino femenino (es decir, la ruta más importante de transmisión de VIH en África y Asia), se mostró que el bloqueo de CD4 solo o tanto de CCR5 como de CXCR4 inhibía la infección de la mucosa localizada. Sin embargo, la captación de VIH y la diseminación sistémica por células migratorias sólo se inhibió cuando se bloquearon simultáneamente los receptores de lectina de tipo C y CD4 (incluyendo DC-SIGN). Tales células migratorias consistían en dos subconjuntos principales (CD3⁺HLA-DR⁻ y CD3⁺HLA-DR⁺), representando el subconjunto HLA-DR⁺ hasta el 90% de la diseminación de VIH y expresando principalmente DC-SIGN (Hu Q, Frank I, Williams V, Santos JJ, Watts P, Griffin GE, Moore JP, Pope M, Shattock RJ. Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J Exp Med* 2004; 199:1065-75. Epub 12 de abril de 2004). Los descendientes mielomonocíticos, por tanto, parecen ser el principal reservorio de VIH en decidua placentaria asociada al embarazo, tejido de la mucosa cervicouterina y, muy probablemente, la mama en periodo de lactancia. En el embarazo y la lactancia, tales células pueden transferir el VIH directamente a las células T del niño y pueden, en parte, actuar también como reservorios celulares de VIH móviles con un potencial para establecerse dentro del organismo del recién nacido.

2. El reservorio celular de VIH

Células dendríticas foliculares (CDF): En cuanto a los verdaderos reservorios celulares de VIH encontrados en los sitios mencionados anteriormente, las CDF son el tipo de célula más abundante que se sabe que retiene VIH durante periodos de tiempo prolongados. Debido a este hecho, la latencia de VIH (entonces todavía denominado HTLV-III/LAV) se identificó por primera vez en 1986 en las CDF por Klara Tenner-Racz y colaboradores. En efecto, este hallazgo también condujo a la primera sugerencia de un reservorio viral intracelular obviamente importante en la enfermedad por VIH (Tenner-Racz K, Racz P, Bofill M, Schulz-Meyer A, Dietrich M, Kern P, Weber J, Pinching AJ, Veronese-Dimarzo F, Popovic M, *et al.* HTLV-III/LAV viral antigens in lymph nodes of homosexual men with persistent generalized lymphadenopathy and AIDS. *Am J Pathol* 1986; 123:9-15). En 1991 y 1992, Stein, Spiegel y colaboradores demostraron entonces claramente que las CDF son la principal población reservorio, mostraron que estas células retienen el VIH dentro de inmunocomplejos atrapados en la membrana, y también proporcionaron un fundamento sobre la patología de la enfermedad por VIH que, en la mayoría de sus aspectos, todavía está en línea con el conocimiento actual (Stein H, Spiegel H, Herbst H, Niedobitek G, Foss HD. Lymphoid tissues and AIDS: role of lymphocytes and follicular dendritic cells (FDC). *Verh Dtsch Ges Pathol* 1991; 75:4-19; y Spiegel H, Herbst H, Niedobitek G, Foss HD, Stein H. Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4⁺ T-helper cells. *Am J Pathol* 1992; 140:15-22). En los siguientes años, incluyendo tanto VIH como un modelo animal infectado con el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), se obtuvo mucho más entendimiento sobre la relevancia patogenética de este tipo de célula reservorio (Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase AT. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993; 362:359-62; Tenner-Racz K, von Stemm AM, Guhik B, Schmitz J, Racz P. Are follicular dendritic cells, macrophages and interdigitating cells of the lymphoid tissue productively infected by HIV? *Res Virol* 1994; 145:177-82; Hurtrel B, Chakrabarti L, Hurtrel M, Bach JM, Ganiere JP, Montagnier L. Early events in lymph nodes during infection with SIV y FIV. *Res Virol* 1994; 145:221-7; Schuurman HJ, Joling P, van Wichen DF, Rademakers LH, Broekhuizen R, de Weger RA, van den Tweel JG, Goudsmit J. Follicular dendritic cells and infection by human immunodeficiency virus type 1 - a crucial target cell and virus reservoir. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 201:161-88; Cohen OJ, Pantaleo G, Schwartzentruber DJ, Graziosi C, Vaccarezza M, Fauci AS. Pathogenic insights from studies of lymphoid tissue from HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 10 (Supl. 1):S6-S14; Sprenger R, Toellner KM, Schmetz C, Luke W, Stahl-Hennig C, Ernst M, Hunsmann G, Schmitz H, Flad HD, Gerdes J *et al.* Follicular dendritic cells productively infected with immunodeficiency viruses transmit infection to T cells. *Med Microbiol Immunol* 1995; 184:129-34; Burton GF, Masuda A, Heath SL, Smith BA, Tew JG, Szakal AK. Follicular dendritic cells (FDC) in retroviral infection: host/pathogen perspectives. *Immunol Rev* 1997; 156:185-97; y Smith BA, Gartner S, Liu Y, Perelson AS, Stilianakis NI, Keele BF, Kerkering TM, Ferreira-Gonzalez A, Szakal AK, Tew JG, Burton GF. Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:690-6). De manera importante, Tachetti y colaboradores revelaron que las CDF, que específicamente residen en los centros germinales de los ganglios linfáticos, no sólo retienen VIH dentro de sus proyecciones de la membrana externa, sino que también albergan viriones infecciosos dentro de compartimentos intracitoplasmáticos (Tachetti C, Favre A, Moresco L, Meszaros P, Luzzi P, Truini M, Rizzo F, Grossi CE, Ciccone E (1997). VIH se atrapa y enmascara en el citoplasma de células dendríticas foliculares de los ganglios linfáticos. *Am J Pathol* 150:533-42). En 1999, Hlavacek *et al.* presentaron un primer modelo *in-silico* para la transferencia de VIH desde esta población reservorio (Hlavacek WS, Wofsy C, Perelson AS (1999). Dissociation of HIV-1 from follicular dendritic cells during HAART: mathematical analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14681-6).

Como es el caso con otros antígenos y agentes infecciosos completos, las CDF atrapan y conservan funcionalmente el VIH durante muchos meses. En los ganglios linfáticos, aproximadamente el 90% del ARN de VIH-1 se ubica en la red de CDF desde tan pronto como varios días tras la infección hasta que esta red se colapsa en la última fase de la enfermedad. *In vivo*, en cualquier punto en el tiempo, tan sólo 100 CDF que albergan VIH son suficientes para transmitir el VIH a otras células (Smith BA, Gartner S, Liu Y, Perelson AS, Stilianakis NI, Keele BF, Kerkering TM, Ferreira-Gonzalez A, Szakal AK, Tew JG, Burton GF. Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:690-6). Aunque anteriormente se creía que los inmunocomplejos de anticuerpo/VIH unido a la superficie de CDF eran infecciosos, más tarde resultó que VIH se transmite realmente desde las CDF a células Th en una forma no complejada unida a CD54 (ICAM-1) y/o CD11a (LFA-1) (Fujiwara M, Tsunoda R, Shigeta S, Yokota T, Baba M. Human follicular dendritic cells remain uninfected and capture human immunodeficiency virus type 1 through CD54-CD11a interaction. *J Virol* 1999; 73:3603-7). De manera importante, incluso tras tratamiento antirretroviral altamente activo (HAART), virus de replicación lenta puede reponer el reservorio de CDF (Smith BA, Gartner S, Liu Y, Perelson AS, Stilianakis NI, Keele BF, Kerkering TM, Ferreira-Gonzalez A, Szakal AK, Tew JG, Burton GF. Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:690-6). Sin embargo, el hallazgo, en macacos, de que las CDF dentro de centros germinales de ganglios linfáticos expresan la lectina de tipo C DC-SIGN (Schwartz AJ, Alvarez X, Lackner AA. Distribution and immunophenotype of DC-SIGN-expressing cells in SIV-infected and uninfected macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1021-9) se confirmó recientemente y se extendió para seres humanos en los que las CDF humanas expresan tanto DC-SIGN como uno de los miembros de la familia filogenética, L-SIGN (Taruiishi M, Terashima K, Dewan Z, Yamamoto N, Ikeda S, Kobayashi D, Eishi Y, Yamazaki M, Furusaka T, Sugimoto M, Ishii M, Kitamura K, Yamamoto N. Role of follicular dendritic cells in the early HIV-1 infection: in vitro model without specific antibody. *Microbiol Immunol* 2004; 48:693-702). Por tanto, las CDF son una importante población reservorio de VIH, ya que el VIH se retiene dentro de tales células durante largos tiempos antes de volver a introducirse en la superficie, que tienen receptores de lectina tipo C. Las invenciones descritas en el presente documento seleccionan como diana los sitios reservorio virales intracelulares de las CDF a través de los receptores de lectina de tipo C.

Células dendríticas mieloides (CDm). Debido a su papel como estimuladores exclusivos de inmunidad específica de antígeno mediada por células T primaria (es decir, el distintivo de la inmunidad elaborada), las CDm se han apodado como "adyuvante de la naturaleza" (Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96; y Banchereau J, Pacesny S, Blanco P *et al*. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987:180-7). Como tal, y con las células T como la diana más obvia del VIH, es convincente que estas células pueden ser actores principales en la patogénesis de la enfermedad por VIH. Sin embargo, el término, CDm, indica una clase celular que comprende muchos tipos celulares sistémicos, locales y regionales que expresan tanto características solapantes como distintivas. Las principales subpoblaciones de las CDm pueden clasificarse como

- (i) CDM de órganos no linfoides periféricos sólidos;
- (ii) CDM de tejidos y órganos linfoides sólidos;
- (iii) CDm en sangre circulantes;
- (iv) Células veladas de la linfa aferente; y
- (v) CDM del líquido cefalorraquídeo

(Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 1996; 17:273-8; y Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Soderstrom M, Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 2001; 124:480-92). Sin embargo, cada uno de estos cinco grupos principales comprende diversos subconjuntos >Austyn, JM. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies on dendritic cells. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 162:S146-50). Una estimación aproximada es que pueden existir varias docenas de fenotipos de CDm fisiológicamente. Además, se sabe que las CDm, en una fase en su vida, dejan tejidos dados, migran extensamente por la totalidad del organismo y se alojan en nuevos sitios anatómicos (F Steinbach, R Gieseler, A Soruri, B Krause & JH Peters: Myeloid DCs deduced from monocytes: in-vitro and in-vivo data support a monocytic origin of DCs. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417:27-32). Todavía, los patrones de migración observados en personas sanas cambian profundamente en la enfermedad (Austyn, JM. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies on dendritic cells. *Am J Resp Crit Care Med* 162; S146-50). Por estos motivos, las CDm son un asunto bastante esquivo para establecer con exactitud un papel específico en la enfermedad por VIH. Además, debido a su multitud de subconjuntos, es sumamente cuestionable si los resultados obtenidos en uno, o unos cuantos tipos de CDm, pueden permitir extraer conclusiones para la clase celular en su totalidad.

No obstante, en un momento en el que las CDm todavía se denominaban "células auxiliares", Müller *et al*. demostraron por primera vez que el VIH realmente selecciona como diana e infecta las CDm (Müller H, Falk S, Stutte HJ. Accessory cells as primary target of human immunodeficiency virus HIV infection. *J Clin Pathol* 1986; 39:1161). Este hallazgo estuvo seguido por diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, que englobaron diferentes tipos de

tales células, que destacaron una variedad de aspectos patógenos asociados a CDm (Knight SC, Macatonia SE. Dendritic cells and viruses. *Immunol Lett* 1988; 19:177-81; Rappersberger K, Gartner S, Schenk P, Sting1 G, Groh V, Tschachler E, Mann DL, Wolff K, Konrad K, Popovic M. Las células de Langerhans son un verdadero sitio de replicación de VIH-1. *Intervirology* 1988; 29:185-94; Langhoff E, Terwilliger EF, Bos HJ, Kalland KH, Poznansky MC, Bacon OM, Haseltine WA. Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary dendritic cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7998-8002; Kalter DC, Gendelman HE, Meltzer MS. Monocytes, dendritic cells, and Langerhans cells in human immunodeficiency virus infection. *Dermatol Clin* 1991; 9:415-28; Dusserre N, Dezutter-Dambuyant C, Mallet F, Delorme P, Philit F, Ebersold A, Desgranges C, Thivolet J, Schmitt D. In vitro HIV-1 entry and replication in Langerhans cells may clarify the HIV-1 genome defection by PCR in epidermis of seropositive patients. *J Invest Dermatol* 1992; 99:99S-102S; Chehimi J, Prakash K, Shanmugam V, Collman R, Jackson SJ, Bandyopadhyay S, Starr SE. CD4-independent infection of human peripheral blood dendritic cells with isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 1993; 74:1277-85; Hosmalin A. Dendritic cells of spleen and blood and HIV-1 infection. *Pathol Biol (Paris)* 1995; 43:889-96; Dezutter-Dambuyant C, Charbonnier AS, Schmitt D. Epithelial dendritic cells and HIV-1 infection in vivo and in vitro. *Pathol Biol (Paris)* 1995; 43:882-8; Zambruno G, Giannetti A, Bertazzoni U, Girolomoni G. Langerhans cells and HIV infection. *Immunol Today* 1995; 16:520-4; Grouard G, Clark EA. Role of dendritic and follicular dendritic cells in HIV infection and pathogenesis. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:563-7; y Charton-Bain MC, Terris B, Dauge MC, Marche C, Walker F, Bouchaud O, Xerri L, Potet F. Reduced number of Langerhans cells in oesophageal mucosa from AIDS patients. *Histopathology* 1999; 34:399-404).

En el transcurso de estos primeros años, había resultado evidente que tanto ARN de VIH como ADN proviral pueden detectarse en las CDm (Giannetti A, Zambruno G, Cimarelli A, Marconi A, Negroni M, Girolomoni G, Bertazzoni U. Direct detection of HIV-1 RNA in epidermal Langerhans cells of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6:329-33; y Patterson S, Roberts MS, English NR, Macatonia SE, Gompels MN, Pinching AJ, Knight SC. Detection of HIV DNA in peripheral blood dendritic cells of HIV-infected individuals. *Res Virol* 1994; 145:171-6). Sin embargo, los descubrimientos clave que condujeron a la comprensión actual sobre el papel de las CDm como células reservorio de VIH se remontan a un estudio en el que Rossi *et al.* pudieron especificar que tales células expresan una lectina de tipo C (Rossi G, Heveker N, Thiele B, Gelderblom H, Steinbach F. Development of a Langerhans cell phenotype from peripheral blood monocytes. *Immunol Lett* 1992; 31:189-97). Ocho años después, Teunis Geijtenbeek, Yvette van Kooyk y colaboradores caracterizaron por primera vez esta molécula estructuralmente, la denominaron molécula de adhesión intercelular (ICAM)-3 específica de célula dendrítica no integrina de captura (DC-SIGN; CD209) (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* 2000; 100:575-85), y demostraron un papel para DC-SIGN en la transferencia de CDm-células T de VIH (Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Comelissen 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* 2000; 100:587-97).

Siendo consciente del papel inmunológico esencial de las CDm, este descubrimiento permite que muchos investigadores de enfermedades infecciosas se centren en lectinas de tipo C más estrechamente. Ha resultado mientras tanto que DC-SIGN se expresa en un nivel más alto por las CDm inmaduras (Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, Trowsdale J, Montaner LJ, Doms RW, Weissman D, Coleman N, Lee B. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* 2002; 71:445-57), es decir, las células dendríticas que pueblan los tejidos no linfoides periféricos antes de emigrar a sitios linfoides en los que maduran para la instrucción de células T. En caso de una infección, todos los órganos periféricos, por tanto, presentan una fase de CDm dotada de manera excelente de un mecanismo para fijar, internalizar y digerir el agente. Sin embargo, se produce la formación de reservorio cuando un agente de este tipo (por ejemplo, VIH) puede incapacitar la degradación intracelular y por tanto permanece intacto en una forma altamente infecciosa. Las lectinas de tipo C en general desempeñan un papel crucial en este proceso, y permiten de ese modo el establecimiento de reservorios endosómicos/intracelulares de patógeno (por ejemplo, VIH) en células que expresan tales receptores (Gieseler RK, Marquitan G, Hahn MJ, Perdon LA, Driessen WH, 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* 2004; 59:415-24; y las referencias en ese documento). En esencia, el agente infeccioso convierte su célula huésped en un reservorio similar a un "caballo de Troya" en el que ocultarse frente a cualquier ataque inmunológico.

Entre las CDm, la formación de reservorio, se produce cuantitativamente (aunque, en modo alguno, exclusivamente), en las CDm cutáneas de la piel (Simonitsch I, Geusau A, Chott A, Jurecka W. Cutaneous dendritic cells are main targets in acute HIV-1-infection. *Mod Pathol* 2000; 13:1232-7; y Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pöhlmann S, Doms RW, Cunningham AL. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 2002; 3:975-83). Sin embargo, el problema se amplía a medida ya que tales CDm periféricas emigran a los órganos linfoides. En este caso, las CDm con carga de VIH "troyano" llegan justo entre la pluralidad de células T. Una vez maduras, las CDm establecen estrechas sinapsis inmunológicas con tales células, de modo que los receptores de CTL de las CDm pueden transferir de la manera más sencilla el VIH a las células T mediante procesos conocidos como transferencia *cis* e infección *in-trans* (o *trans*) (revisado en Turville S, Wilkinson J, Cameron P, Dable J, Cunningham AL. The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *J Leukoc Biol* 2003;

74:710-8. Epub 02 de septiembre de 2003). Geijtenbeek, van Kooyk y sus colaboradores proporcionaron recientemente la prueba más directa de que DC-SIGN transfiere de manera infecciosa el VIH desde CDm hasta células T (Arrighi JF, Pion M, Wiznerowicz M, Geijtenbeek TB, Garcia E, Abraham S, Leuba F, Dutoit V, Ducrey-Rundquist O, van Kooyk Y, Trono D, Piguet V. Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J Virol* 2004; 78:10848-55). Sin embargo, otros receptores de CTL, es decir, langerina (CD207; expresado exclusivamente por CDm de tipo Langerhans de la mucosa y epidérmicas inmaduras), el receptor de manosa (MR, CD206; expresado de la manera más destacada por las CDm dérmicas), y quizás DEC-205 (CD205) son al menos igualmente importantes (Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pöhlmann S, Doms RW, Cunningham AL. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 2002; 3:975-83; y revisado en van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:697-709). En 2001, se caracterizó otra lectina de tipo C expresada por CDm, DLEC (Arce I, Roda-Navarro P, Montoya MC, Hernanz-Falcon P, Puig-Kroger A, Fernandez-Ruiz E. Molecular and genomic characterization of human DLEC, a novel member of the C-type lectin receptor gene family preferentially expressed on monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:2733-40). Su posible papel en la formación de reservorio no se ha investigado aún, pero parece tan probable como la verificada para todos los demás receptores de CTL examinados hasta ahora. Finalmente, cuando se transmite el VIH a una célula T, puede iniciarse la replicación viral tan pronto como durante la transferencia dentro de la propia CDm (Granelli-Piperno A, Finkel V, Delgado E, Steinman RM. Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells. *Curr Biol* 1999; 14:21-9).

Existen varios factores decisivos para que las CDm destaquen como el tipo más peligroso y virulento de célula reservorio de VIH. En primer lugar, estas células tienen una alta tasa de recambio que, dependiendo del subconjunto, oscila entre unos pocos días y más de un mes (Ruedl C, Koebel P, Bachmann M, Hess M, Karjalainen K. Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. *J Immunol* 2000; 165:4910-6; Kamath AT, Pooley J, O'Keefe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, D'Amico A, Wu L, Tough DF, Shortman K. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol* 2000; 165:6762-70; y Kamath AT, Henri S, Battye F, Tough DF, Shortman K. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 2002; 100:1734-41). Esto implica que de manera relativamente frecuente, y solapante, nuevas generaciones de CDm pueden infectarse secuencialmente por VIH, formar reservorios intracelulares, y por tanto transferir cantidades mucho mayores de virus a células T que un tipo de célula reservorio que se repone a tasas bajas, dura años y, en comparación, incorpora sólo cantidades relativamente bajas de virus. En segundo lugar, una vez maduras, las CDm establecen su residencia específicamente en las zonas paracorticales de los órganos linfoides en las que interactúan físicamente de manera estrecha a una frecuencia extremadamente alta con linfocitos T para estimular respuestas de células T (Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96; y Banchereau J, Paczesny S, Blanco P *et al.* Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987:180-7). Por la necesidad funcional, aproximadamente el 99% de todas las células T sistémicas residen por tanto exactamente en las mismas regiones subhistológicas. De manera intrigante, aproximadamente el 99% de las células T infectadas por VIH también se encuentran en estos sitios (Snedecor SJ. Comparison of three kinetic models of HIV-1 infection: implications for optimization of treatment. *J Theor Biol* 2003; 221:519-41).

La internalización de VIH en endosomas es una etapa obligada tanto en CDm inmaduras como maduras, aunque con resultados potencialmente diferentes:

(i) en ambas fases de desarrollo de CDm, los endosomas son el punto de partida desde el que se dirige el virus a sinapsis de CDm-célula T como sitios de infección de células T secundarias (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* 2003; 300:1295-7. Epub 01 de mayo de 2003; y Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, Dable J, Stössel H, Romani N, Piatak M Jr, Lifson JD, Pope M, Cunningham AL. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 2004; 103:2170-9. Epub 20 de noviembre de 2003).

(ii) Sin embargo, cuando se infecta una célula dendrítica en su fase madura, el VIH también puede forzar que una célula de este tipo integre su ADN proviral. Tras la maduración, la CDm puede comenzar entonces a formar viriones *de novo* (Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, Dable J, Stössel H, Romani N, Piatak M Jr, Lifson JD, Pope M, Cunningham AL. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 2004; 103:2170-9. Epub 20 de noviembre de 2003).

Las invenciones dadas a conocer en el presente documento impiden ambos procesos mediante la selección como diana terapéutica del compartimento endosómico como el torniquete intracelular del VIH. Las invenciones también seleccionan como diana la clase de CDm al unisono que las CDm presentan abundantemente receptores de lectina de tipo C como denominador común que tiende un puente entre toda la diversidad fenotípica.

Macrófagos. Los macrófagos son críticos en respuestas inmunitarias adaptativas y específicas debido a sus capacidades para fagocitar, producir citocinas y procesar/presentar antígenos para estimular respuestas inmunitarias específicas de antígeno secundarias por células T (North RJ. The relative importance of blood monocytes and fixed

macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. *J Exp Med* 1970; 132:521-30; y Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 1991; 124:5-24). Como población celular importante del sistema inmunitario humano, los macrófagos se seleccionan como diana por el VIH y se aprovechan como reservorio viral (Wahl SM, Orenstein JM, Smith PD. *Macrophage functions in HIV-1 infection*. 1996; Nueva York, Plenum). De manera importante, los macrófagos expresan la lectina de tipo C receptora de manosa de manera tan abundante que se caracterizó en primer lugar en estas células y se denominó originariamente "receptor de manosa de macrófagos" (Barratt G, Tenu JP, Yapo A, Petit JF. Preparation and characterisation of liposomes containing mannositated fosfolipids capable of targetting drugs to macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1986; 862:153-64). Los macrófagos confinados regionalmente, tales como la microglía (Takahashi K. Development and differentiation of macrophages and related cells: historical review and current concepts. *J Clin Exp Hematopathol* 2001; 41:1-33) también expresan este receptor (Liu Y, Liu H, Kim BO, Gattone VH, Li J, Nath A, Blum J, He JJ. CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol* 2004; 78:4120-33. Errata en: *J Virol* 2004; 78:7288-9). La unión al receptor de manosa representa el 60% de la asociación inicial del VIH con macrófagos negativos para DC-SIGN, que se ha verificado que transfieren el VIH a células T. La transmisión directa del VIH a células T se produce durante hasta aproximadamente 24 horas debido a la rápida internalización mediada por el receptor de manosa del VIH, desplazando por tanto el virus al reservorio infeccioso intracelular (Nguyen DG, Hildreth JE. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur J Immunol* 2003; 33:483-93). Específicamente, la implicación crucial de macrófagos en la estimulación secundaria de células T las convierte en una población reservorio peligrosa para la transferencia de viriones a células T. De manera interesante, la expresión de otra lectina de tipo C, DC-SIGN (que es un destacado factor de transmisión de VIH en células dendríticas mieloides; véase anteriormente), también es inducible en macrófagos en presencia de citocinas. Como en las células dendríticas mieloides, DC-SIGN puede unirse a viriones adicionales y transferirlos a células T (Chehimi J, Luo Q, Azzoni L, Shawver L, Ngoubilly N, June R, Jerandi G, Farabaugh M, Montaner LJ. HIV-1 transmission and cytokine-induced expression of DC-SIGN in human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 2003; 74:757-63. Epub 21 de agosto de 2003). En macrófagos, aún no se ha investigado un papel de formación de reservorio para DC-SIGN, pero se debe lo más probablemente al ciclo de internalización celular de la molécula típico para las lectinas de tipo C y documentado en otras células. Dependiendo del subconjunto regional, los macrófagos tienen una duración de vida de meses a años (Takahashi K. Development and differentiation of macrophages and related cells: historical review and current concepts. *J Clin Exp Hematopathol* 2001; 41:1-33). También pueden preverse tales periodos de tiempo para una parte del reservorio de VIH limitado para macrófagos, aunque también se sabe que los macrófagos infectados por VIH pueden experimentar apoptosis (Wang X, Lewis DE. CD86 expression correlates with amounts of HIV produced by macrophages in vitro. *J Leukoc Biol* 2001; 69:405-13), y, por tanto, morirán en tiempos muy anteriores. Las invenciones dadas a conocer en el presente documento seleccionan asimismo como diana esta clase celular puesto que, tales células expresan, tanto constitutiva como facultativamente, lectinas de tipo C.

Células dendríticas plasmocitoides (CDp). En seres humanos, las CDp (también conocidas como monocitos plasmocitoides; células T plasmocitoides) actúan como células productoras de interferón de tipo I natural (IFN- α - β) y, por tanto, son importantes respondedores antivirales de primera línea (Bjorck P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 2001; 98:3520-6). Representan una población minoritaria en todos los tejidos, incluso incluido el líquido cefalorraquídeo, pero todavía se cuestionan de manera ontogenética (Banchereau J, Pulendran B, Steinman R, Palucka K. Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med* 2000; 192:F39-44; Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Soderstrom M, Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 2001; 124:480-92). Los primeros estudios sobre lectinas de tipo C en CDp diferenciadas mostraron que estas células expresan el antígeno 2 de células dendríticas sanguíneas (BDCA-2), pero no DC-SIGN (Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. BDCA-2, una lectina de tipo C tipo II específica de células dendríticas plasmocitoides novedosa, media la captura de antígeno y es un potente inhibidor de la inducción de interferon α / β . *J Exp Med* 2001; 194:1823-34; y Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol* 2001; 75:6710-3). Sin embargo, tanto en fetos como en adultos, un pequeño subconjunto de precursores de CDp transmitidos por la sangre, denominados CDp2, es doble positivo para BDCA-2/DC-SIGN (Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levrony E, Trowsdale J, Montaner LJ, Doms RW, Weissman D, Coleman N, Lee B. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* 2002; 71:445-57).

Tras la infección por VIH, tanto las CDp como sus precursores desarrollan déficits funcionales (Foussat A, Bouchet-Delbos L, Berrebi D, Durand-Gasselín I, Coulomb-L'Hermine A, Krzysiek R, Galanaud P, Levy Y, Emilie D. Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-1-infected patients. *Blood* 2001; 98:1678-86; y Feldman S, Stein D, Amrute S, Denny T, Garcia Z, Kloser P, Sun Y, Megjugorac N, Fitzgerald-Bocarsly P. Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol* 2001; 101:201-10). Aunque, justo tras la infección por VIH, la rápida disminución en los números de ambos subconjuntos precede realmente a cualquier otra alteración celular (Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F, Patterson S. Loss of blood

CD11c+ myeloid and CD11c- plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. Blood 2001; 98:2574-6; y Chehimi J, Campbell DE, Azzoni L, Bacheller D, Pappasavvas E, Jerandi G, Mounzer K, Kostman J, Trinchieri G, Montaner LJ. Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. J Immunol 2002; 168:4796-801). Las CDP, por tanto, son sensibles a la infección por VIH. Aunque aún no se dispone de datos sobre un posible papel de sus receptores de CTL, BDCA-2 y DC-SIGN están implicadas probablemente en la unión y captación del virus. Esto podría transformar las CDp en una célula reservorio de VIH aunque, claramente, las CDP no se enumeran entre las células reservorio conocidas. Las invenciones dadas a conocer en el presente documento pueden seleccionar como diana satisfactoriamente las CDP a través de los receptores de CTL. Además, tales invenciones pueden demostrar ser útiles para interferir con un virus que dañe tan gravemente este tipo de célula antiviral.

Células T de memoria y linfocitos citolíticos naturales: El reservorio de VIH más preocupante consiste en células T de memoria CD4⁺ en reposo infectadas de manera latente que portan ADN de VIH proviral integrado (Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. Annu Rev Immunol 2000; 18:665-708). Cuando se reactivan, tales células pueden empezar a producir el virus de nuevo y, de ese modo, liberan muchas variantes de cepas archivadas, aumentando por tanto el riesgo de resistencia a la terapia (Siliciano JD, Siliciano RF. A long-term latent reservoir for HIV-1: discovery and clinical implications. J Antimicrob Chemother 2004; 54:6-9. Epub 26 de mayo de 2004). Pierson *et al.* extrapolaron que, en una semivida extremadamente larga del reservorio de células T de memoria de 44 meses, y basándose en protocolos de tratamiento del estado de la técnica, su erradicación requeriría más de 60 años de tratamiento. Indicando que las esperanzas de erradicar el VIH con los regímenes antirretrovirales actuales es poco realista y conllevaría toxicidades sustanciales a largo plazo, concluyeron que se necesitan urgentemente nuevos enfoques para erradicar este reservorio de VIH (Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. Annu Rev Immunol 2000; 18:665-708). Otro tipo de célula reservorio de VIH identificada, pero aún sólo explorada de forma incompleta, es un subconjunto de linfocitos citolíticos naturales humanos (células NK) CD56⁺CD3⁻ que expresan CD4, CCR5 y CXCR4. Una vez infectada a través de estos (co-)receptores, este subconjunto de células NK revela ADN proviral y permanece infectada persistentemente en pacientes durante (al menos) 1-2 años tras el inicio de la terapia antirretroviral altamente activa (Valentin A, Rosati M, Patenaude DJ, Hatzakis A, Kostrikis LG, Lazanas M, Wyvill KM, Yarchoan R, Pavlakis GN. Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. PNAS USA 2002; 99:7015-7020).

Pruebas indirectas respaldan el concepto de que las células T de memoria y/o linfocitos citolíticos naturales también establecen reservorios intracelulares dependientes del receptor de CTL de patógenos/virus intactos infecciosos ya que estas células expresan tales receptores. En primer lugar, en adultos, el 25% de las células T CD4⁺ y CD8⁺ de sangre periférica (de las que la mayoría revela un fenotipo de célula T de memoria), así como un subconjunto de células NK expresan el receptor de CTL de tipo II de la familia de glicoproteínas NKR-P1, hNKR-P1A (Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. J Immunol 1994; 153:2417-28). En segundo lugar, y a diferencia de los adultos, la sangre del cordón de recién nacidos contiene subconjuntos sustanciales de células T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan el receptor G1 similar a lectina de linfocitos citolíticos (KLRG1), una lectina de tipo C inhibitoria. Tras el parto, las células KLRG1⁺ se desplazan rápidamente a los compartimentos anatómicos de células T de memoria/efectoras tal como se observa en adultos (Marcolino I, Przybilski GK, Koschella M, Schmidt CA, Voehringer D, Schlesier M, Pircher H. Frequent expression of the natural killer cell receptor KLRG1 in human cord blood T cells: correlation with replicative history. Eur J Immunol 2004; 34:2672-80). Esto implica un riesgo aumentado notablemente de que un feto se infecte por una madre VIH⁺ a través de estas células circulantes. Además se plantea la hipótesis de que estas células, debido a su reubicación en las reservas de memoria intralinfoideas del recién nacido, pueden establecer un reservorio de VIH a una edad muy temprana. Por tanto, en el embarazo, no sólo las células reservorio de VIH que expresan el receptor de CTL ubicadas en el tejido placentario sólido de la madre (véase anteriormente), sino también los receptores de CTL y CTLD expresados por células circulantes embrionarias pueden actuar como receptores que permiten la formación de reservorios celulares de VIH. Ambos tipos de receptores están implicados por tanto en la transferencia de madre a hijo de VIH-1.

Sin embargo, a edades posteriores, la expresión de KLRG1 por células T se considera un distintivo de dormancia o disfunción. De la manera más interesante, a lo largo de la vida, la cantidad de tales células T senescentes aumenta tras la infección viral y también se correlaciona con el envejecimiento (Voehringer D, Blaser C, Brawand P, Raulet DH, Hanke T, Pircher H. Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells. J Immunol 2001; 167:4838-43; y Ouyang Q, Wagner WM, Voehringer D, Wikby A, Klatt T, Walter S, Müller CA, Pircher H, Pawelec G. Age-associated accumulation of CMV-specific CD8⁺ T cells expressing the inhibitory killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). Exp Gerontol 2003; 38:911-20). Se cree que estos hechos pueden estar verdaderamente correlacionados. Se ha sugerido que el repertorio de células T funcional global puede reducirse a medida que se amplía esta reserva de células, contribuyendo por tanto a un aumento de la incidencia de enfermedades infecciosas en los ancianos (Ouyang Q, Wagner WM, Voehringer D, Wikby A, Klatt T, Walter S, Müller CA, Pircher H, Pawelec G. Age-associated accumulation of CMV-specific CD8⁺ T cells expressing the inhibitory killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). Exp Gerontol 2003; 38:911-20). Esto también puede correlacionarse específicamente con el VIH, así como

otras enfermedades infecciosas en las que se establecen reservorios intracelulares crónicos de patógenos.

Células T de replicación de VIH de manera activa: Además de las células reservorio de VIH como una fuente continua de viriones infecciosos, el establecimiento de una infección persistente también depende de manera crítica de señales de activación que regulan la replicación del VIH dentro de células T diana. Las células T quiescentes son resistentes a la infección a menos que se proporcionen señales de activación mediadas por receptor de células T y/o citocinas (Unutmaz D. T cell signaling mechanisms that regulate HIV-1 infection. *Immunol Res* 2001; 23:167-77). Por tanto, la infección por VIH comprende una combinación de estados crónicos de hiperactivación de células T, persistencia de VIH y reducción de células T (Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 2002; 8:319-23).

Junto al papel conocido hace largo tiempo de las células T cooperadoras CD4+ como dianas del VIH (Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993; 262:1011-8), ahora resulta evidente que un subconjunto de células T CD4⁺CD25^{hi} también se infecta. El subconjunto CD4⁺CD25^{hi} de células T reguladoras (células Treg) se reconoce ahora ampliamente que suprime la activación de células T tanto en ratones como en seres humanos (Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25): Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-64; Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996; 184:387-96; Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 160; 1998: 1212-8; Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: Induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; 10:1969-80; Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998; 188:287-96; Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167:1245-53; Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193:1303-10; Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, *et al.* Identification and functional characterization of human CD4+CD2+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193:1285-94; Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, *et al.* Human anergic/suppressive CD4+CD25+ T cells: A highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001; 31:1122-31; Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD25+CD4+ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro with loss of function. *J Exp Med* 2001; 193:1295-302; Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, *et al.* Human CD4+CD25+ cells: A naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98: 2736-2744; y Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, *et al.* Infectious tolerance: Human CD25+ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4+ T helper cells. *J Exp Med* 2002; 196:255-60. Oswald-Richter *et al.* demostraron que las células Treg humanas aisladas de donantes sanos expresan el correceptor de VIH CCR5 y son altamente susceptibles a la infección y replicación de VIH. También proporcionaron pruebas para el hecho de que las células Treg inmunosupresoras pueden alterarse en una parte de individuos positivos para VIH con un bajo porcentaje de CD4⁺ y mayores niveles de células T activadas, lo que puede contribuir a presentar hiperactivación de células T en la progresión de la enfermedad por VIH. La infección de estas células, por tanto, implica la pérdida de inmunosupresión reguladora (Oswald-Richter K, Grill SM, Shariat N, Leelawong M, Sundrud MS, Haas DW, Unutmaz D. HIV Infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. *PLoS Biology* 2004; 2:0955-66).

Además, se infectan células T CD8⁺ citotóxicas, lo que conduce también a la pérdida de respuestas antivirales (Livingstone WJ, Moore M, Innes D, Bell JE, Simmonds P. Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. *Lancet* 1996; 348:649-54). El estado resultante de activación inmunitaria crónica, combinado con la destrucción directa de células T CD4⁺ y CD4⁺CD25^{hi} por el VIH, conduce eventualmente a SIDA, tal como se caracteriza por el deterioro progresivo de la inmunidad (Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993; 262:1011-8). Por tanto, aunque sin excluir los beneficios de una coadministración (transitoria) de HAART con el presente sistema terapéutico, por tanto sería ventajoso que este sistema también interfiriera con la replicación activa del VIH en células T.

B. Plasticidad mielomonocítica: nuevas implicaciones para reservorios infecciosos

Se derivan conclusiones potencialmente de gran alcance en cuanto a reservorios de patógenos, del hecho de que diversos tipos de células reservorio son miembros de un sistema altamente plástico de tipos celulares intercambiables. Las implicaciones de este concepto para la naturaleza y dinámica de reservorios celulares de agentes infecciosos se han omitido por completo hasta ahora.

Las primeras indicaciones de la existencia de un sistema plástico de células tal como el basado en el linaje de diferenciación mielóide se remontan al hallazgo de que los monocitos de sangre periférica, cuando entran en un tejido, no progresan *per se* a la fase de macrófago. Por tanto, en contraste con un dogma anterior, se reconoce

ahora ampliamente que los monocitos sanguíneos dan lugar tanto a CDM como a macrófagos de tejidos. Además, en presencia de señales apropiadas, las CDM pueden incluso interconvertirse en macrófagos. Debido a numerosos subconjuntos regionales de ambas clases celulares *in vivo*, este hallazgo condujo al concepto de plasticidad para descendientes mielomonocíticos (Peters JH, Ruppert J, Gieseler RKH, Najar HM, Xu H. Differentiation of human monocytes into CD14-negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? Pathobiology 1991; 59:122-6; y Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. Immunol Today 1996; 17:273-8). Sucesivamente, se identificaron señales que diferencian monocitos en tipos especializados de macrófagos, es decir, microglía (macrófagos regionales del sistema nervioso central) y osteoclastos (macrófagos regionales del compartimento óseo) (Servet-Delprat C, Arnaud S, Jurdic P, Nataf S, Grasset MF, Soulas C, Domenget C, Destaing O, Rivollier A, Perret M, Dumontel C, Hanau D, Gilmore GL, Belin MF, Roubourdin-Combe C, Mouchiroud G. Flt3+ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia. BMC Immunol 2002; 3:15). Entonces resultó que un subconjunto de monocitos puede actuar como células madre pluripotentes que, en presencia de los factores apropiados, dan lugar a linfocitos, así como células epiteliales, endoteliales, neuronales y hepáticas (Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA; 2003:2426-31; y Kuman M, Okazaki Y, Kodama H *et al.* Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchyma cell differentiation. J Leukoc Biol 2003; 74:833-45). Actualmente, los monocitos de sangre periférica también aparecen como el precursor esquivo de manera persistente de las células dendríticas foliculares. Sin embargo, a diferencia de los estudios mencionados anteriormente que identifican un subconjunto de células madre entre monocitos, la diferenciación monocito-CDM se logró en este caso a una razón de 1:1. Se sugirió por tanto considerar ahora los monocitos en su totalidad como una clase de célula madre circulante (Heinemann DEH, Peters JH. Follicular dendritic cells deduced from human monocytes. BMC Immunol: en impresión).

Las implicaciones de este paradigma novedoso, y que cada vez se consolida más, son inmensas y conllevan

- (i) Ampliar nuestra comprensión de la biología de la plasticidad de diferenciación mieloide;
- (ii) Generar enfoques para terapias dependientes de células madre que desafían las reticencias éticas; y
- (iii) Reconsiderar los conceptos actuales de la naturaleza de reservorios de patógenos.

En cuanto al VIH, ha resultado evidente más recientemente que este virus, en efecto, infecta monocitos de sangre periférica (Weinberg JB, Matthews TJ, Cullen BR, Malim MH. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. J Exp Med 1991; 174:1477-82; Zhu T. HIV-1 genotypes in peripheral blood monocytes. J Leukoc Biol 2000; 68:338-44). El subconjunto de monocitos CD14^{lo}CD16^{hi} es el más, pero no exclusivamente, susceptible a la infección (Crowe S, Zhu T, Muller WA. The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. J Leukoc Biol 2003; 74:635-41. Epub 21 de agosto de 2003). Así, en pacientes, una parte de los monocitos ya está infectada cuando emigran a los tejidos.

Esto significa que las células mieloides pueden, (al menos) tan pronto como están en la fase monocítica, reclutarse como parte del reservorio de VIH. Cuando se consideran los monocitos como un tipo de célula madre pluripotente, un espectro muy diverso de descendientes primarios de monocitos CD14^{lo}CD16^{hi} (y otros), pueden por tanto infectarse por VIH. Tal como se mencionó, la diferenciación monocítica en (i) CDM; (ii) macrófagos; (iii) microglía; (iv) osteoclastos; (v) células dendríticas foliculares; (vi) células hepáticas; (vii) linfocitos; y (viii) células endoteliales; (ix) epiteliales; y (x) neuronales se ha verificado hasta ahora. Cuando se diferencian a partir de monocitos infectados, tal progenie puede verse gravemente dificultada en la consecución de su función y potencial ontogenético. Sin embargo, en cualquier caso, todos los derivados de monocitos se vuelven susceptibles a la infección en fases posteriores de su desarrollo, dependiendo de su expresión de marcadores de superficie que sirven al VIH para su entrada conveniente. Por ejemplo, de los diez tipos verificados de derivados de monocito enumerados, al menos los ocho primeros expresan receptores de CTL y/o CTLD (véanse las referencias anteriores).

En este campo de investigación, por ejemplo, se desconoce si los monocitos CD14^{lo}CD16^{hi} sólo dan lugar a un conjunto muy limitado de descendientes. Además, aunque el programa de diferenciación inducible de monocitos obviamente es amplio, se desconoce además si los diversos derivados de monocito generados *in vitro* corresponden a acontecimientos de diferenciación considerables *in vivo* o más bien representan rutas de salvamento relativamente menores. Por tanto, tomado en conjunto, no puede valorarse actualmente la extensión, y el alcance, fisiológicos de la diferenciación de amplio espectro dependiente de monocitos.

Por otra parte, cuando nos centramos sólo en un tipo de derivado de monocito (las CDM), se han identificado y/o investigado trece señales diferentes que dirigen la diferenciación de las CDM a partir de precursores (mielo-)monocíticos. Estas señales comprenden un vistoso espectro de factores de diferenciación y crecimiento clásicos (multi-CSF [IL-3], M-CSF, GM-CSF); citocinas (IL-4, TNF- α , IFN- γ); vitaminas (α -tocoferol, calciferol, 1,25-dihidroxicalciferol, ácido todo-trans-retinoico); un derivado de aminoácido (ácido cis-urocánico); y ácidos grasos esenciales (ácido linoleico, ácido linolénico) (Gieseler RKH, Röber R-A, Kuhn R, Weber K, Osborn M, Peters JH: Dendritic 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; Gieseler RKH, Peters JH. Linoleic acid supports the differentiation and enhances the accessory activity of dendritic cells in vitro. 8th International Congress of Immunology; Budapest, Hungría. Abstract Book 1992:501; Peters JH, Xu H, Ruppert J, Ostermeier D, Friedrichs D, Gieseler RKH: Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. Adv Exp Med Biol 1993;329:275-80; Xu H, Soruri A, Gieseler RKH, Peters JH. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. Immunobiology 1993; 189:69; Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. Immunol Today 1996; 17:273-8; Steinbach F, Gieseler R, Soruri A, Krause B, Peters JH. Myeloid DCs deduced from monocytes: in-vitro and in-vivo data support a monocytic origin of DCs. Adv Exp Med Biol 1997; 417:27-32; Gieseler R, Heise D, Soruri A, Schwartz P, Peters JH. In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes. Develop Immunol 1998; 6:25-39; Gieseler R, Schlemminger R, Fayyazi A, Peters JH. Cis-UCA Effects on Experimental Small Bowel Transplantation: Evidence for Suppression of the Graft-versus-Host Response. En: Hönigsmann H, Knobler R, Trautinger F, Jori G (eds.): Landmarks in Photobiology. OEMF Publishers spa. Milano 1998:285-8; Heise D, Peters JH, Schedlowski M, Gieseler R. Maturation of monocyte-derived dendritic cells (MoDC) by autocrine TNF- α signaling. Immunobiology 1999; 200:561; y Gieseler R, Hollmann K, Scolari MJ, Peters JH. All-trans-retinoic acid upregulates CD1a on human monocyte-derived dendritic cells (MoDC): implications for autologous melanoma-specific tumor vaccination. Immunobiology 2000; 203:378-9). Estos hallazgos destacan cómo responden los monocitos sensibles a estímulos ambientales e ilustran la diversidad de señales a las que responden estas células mediante la diferenciación en diferentes subtipos de CDm. Por tanto, incluso un "escenario de un producto de diferenciación" tan limitado ilumina impresionantemente el potencial de los monocitos. Por consiguiente, una multitud de señales no identificadas hasta la fecha puede dar lugar a un enorme espectro de productos de diferenciación monocítica, una conclusión que, en esencia, llega de nuevo al concepto de célula madre monocitaria (Heinemann DEH, Peters JH. Follicular dendritic cells deduced from human monocytes. BMC Immunol: en impresión).

Específicamente, en cuanto a la formación de reservorios intracelulares infecciosos, y observado con respecto a este telón de fondo, dos factores decisivos incluyen (i) que los monocitos, por diseño, pueden generar una variedad de productos de diferenciación; y (ii) que la diferenciación monocítica se altera en condiciones patológicas (por ejemplo, Austyn, JM. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies on dendritic cells. Am J Resp Crit Care Med 2000; 162: S 146-50; Stucke M, Quadbeck B, Eckstein AK, Tews S, Mann K, Esser J. Gieseler R. MHC class II focusing, significant increase in CD40+ cells, and faint expression of Langerina by peripheral blood leukocytes are distinctive features of thyroid-associated ophthalmopathy. 27th Annual Meeting of the European Thyroid Association. Varsovia, Polonia: 25-29 de agosto de 2001; y Quadbeck B, Eckstein A, Tews S, Walz M, Hoermann R, Mann K, Gieseler R. Maturation of thyroidal dendritic cells in Graves' disease. Scand J Immunol 2002; 55:612-20). De manera importante, esto también se ha documentado para las CDm en la enfermedad por VIH (revisado brevemente en Gieseler RK, Marquitan G, Scolari MJ, Cohen MD. Lessons from history: dysfunctional APCs, dangers of STI and an important goal, as yet unmet. Trends Immunol 2003; 24:11). Además, los fármacos terapéuticos influyen profundamente en el medio de citocinas sistémicas que gobierna la diferenciación de células mielomonocíticas (por ejemplo, Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bomstein M, O'Shea JJ, Chrousos GP, Bornstein SR. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. FASEB J 2002; 16:61-71). Por tanto es convincente que, en condiciones patológicas y en presencia de fármacos, se haga uso del potencial pluripotente de los monocitos en una variedad de maneras completamente desconocidas en la actualidad. Estas consideraciones sugieren que, en condiciones de una enfermedad infecciosa, diversos tipos de células derivadas de monocito pueden dar lugar a una variedad de células reservorio de patógenos. De manera más importante, tales derivados pueden infectarse tan pronto como están en su punto de origen común, es decir, el precursor monocítico. Las invenciones presentadas en el presente documento contemplan el tratamiento dirigido de monocitos. Tales tratamientos pueden tener beneficios considerables.

Médula ósea: El reciente descubrimiento de que la médula ósea no sólo sirve como órgano linfoide primario sino también como secundario (Feuerer M, Beckhove P, Garbi N, Mahnke Y, Limmer A, Hommel M, Hämmerling GJ, Kyewski B, Hamann A, Umansky V, Schirmacher V. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigens. Nature Med 2003; 9:1151-7) sugiere fuertemente que la médula ósea es un sitio reservorio anatómico en determinadas enfermedades infecciosas. Además, la médula ósea también aloja los precursores mielomonocíticos, así como monocitos diferenciados recientemente antes de su liberación a la circulación. En cuanto a la dinámica de los sitios reservorio anatómicos, estas consideraciones favorecen la hipótesis de que la médula ósea puede ser un "reservorio primordial" desde el que se reponen todos los demás sitios reservorio. Las invenciones dadas a conocer en el presente documento también incluyen aplicaciones específicas de la médula ósea del sistema de direccionamiento de la invención. De hecho, una ruta de este tipo promete alcanzar la principal reserva de precursores de células reservorio en la enfermedad por VIH y otras enfermedades infecciosas antes de que tales células progresen para diferenciarse en diversas poblaciones reservorio residentes en tejido periférico.

II. Lectinas que expresan dominios de reconocimiento de hidratos de carbono

En 1988, Kurt Drickamer resumió los avances en el campo de las lectinas animales (es decir, proteínas de unión a azúcar) que portan dominios de reconocimiento de hidratos de carbono (CRD, *carbohydrate recognition domains*) definidos (revisado en Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. J Biol

Chem 1988; 263:9557-60). Actualmente se sabe que las lectinas CRD son parte de nuestra antigua herencia inmunológica y pueden, por ejemplo, encontrarse en especies tan distantes como moscas y seres humanos. De manera importante, actuando como receptores específicos para agentes infecciosos, muchas lectinas CRD sirven como una primera línea de defensa (Hallman M, Ramet M, Ezekowitz RA. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res* 2001; 50:315-21). Por tanto, incluso en sistemas inmunitarios relativamente "sencillos", las lectinas CRD ofrecen un cierto grado de especificidad para proteger a un huésped frente a la infección. En términos evolutivos, la rama de defensa arcaica y más robusta, denominada inmunidad innata (que incluye las lectinas CRD), evolucionó mucho antes a la rama más sofisticada de inmunidad adaptativa (que, debido a la expansión masiva de clones celulares que presentan estructuras específicas de antígeno, nos proporciona el lujo de mecanismos protectores altamente específicos). No obstante, en seres humanos y animales vertebrados, la inmunidad innata continúa creando el marco incluso para el resultado de respuestas específicas de antígeno como resultado de la expansión clonal y, por tanto, crea las bases para una defensa global del individuo (Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:547-78. Epub 19 de diciembre de 2001). Sin embargo, tal como se comenta en el presente documento, algunas de estas antiguas lectinas, debido a la adaptación por agentes infecciosos, también desempeñan un papel fundamental en el establecimiento de los denominados reservorios de patógenos. Tales reservorios celulares son esenciales para la imposibilidad de cura actual de algunas de las enfermedades infecciosas crónicas más prevalentes letales y/o debilitantes en seres humanos y animales superiores.

Mucho antes de reconocerse por los inmunólogos, los bioquímicos habían acumulado un conocimiento profundo sobre los receptores de CRD. Sin embargo, su función fisiológica sigue siendo poco clara. Cuando Charles A. Janeway introdujo su modelo de lo no propio infeccioso, la inmunología se dio cuenta, en una construcción teórica, de la posible existencia de "receptores de amplio espectro" arcaicos para patógenos. Janeway propuso que las células presentadoras de antígeno (CPA), el esqueleto de la rama adaptativa de inmunidad, pueden iniciar una inmunidad protectora cuando se activan mediante patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP). Tal activación requeriría la presencia de receptores exocelulares complementarios específicos apodados como pattern recognition receptors (RRP) (Janeway Jr, CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1989; 54:1-13). Una vez que se predijeron teóricamente, estas estructuras pudieron descubrirse en efecto. Con una cantidad creciente de conocimiento acumulada, el acrónimo operativo, PRR, se volvió obsoleto y se sustituyó por una expresión que hace referencia al ancestro evolutivo identificado de estas estructuras, es decir, receptores de tipo Toll (RTT) (revisado en Johnson, GB *et al.* Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors. *Trends Immunol* 2003; 24:19-24). Funcionalmente, todas estas moléculas son lectinas CRD.

Un subgrupo de las lectinas CRD es la familia de los receptores de lectina de tipo C (CTL, *C-type lectin*), que se une a hidratos de carbono de manera dependiente de calcio (Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today* 1994; 15:67-74). Un ejemplo para receptores de CTL que reconocen PMAP son las denominadas colectinas que están presentes en plasma y en superficies mucosas. Las colectinas humanas identificadas hasta ahora son la lectina de unión a manano (MBL, *mannan-binding lectin*) y las proteínas surfactantes A y D (SP-A y SP-D). Cuando reconocen un agente infeccioso, ellas o bien (MBL) inician la ruta de lectinas de activación del complemento o bien (SP-A, SP-D) desencadenan la opsonización, neutralización y aglutinación para limitar la infección y también orquestar la respuesta inmunitaria adaptiva (revisado en Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:547-78. Epub 19 de diciembre de 2001). Otro ejemplo para receptores de CTL es la familia del gen de regeneración (REG o Reg) que desempeña principalmente un papel protector en los tejidos y órganos hepatogastroenterológicos (revisado en Zhang YW, Ding LS, Lai MD. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2635-41); la familia REG se comenta en el presente documento. Aún otro grupo de lectinas CRD expresan dominios similares a lectina de tipo C (CTL, *C-type lectin-like domains*) (para su revisión, véase Cambi A, Figdor CG. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:539-46).

III. Sistemas de suministro de compuestos liposómicos dirigidos

Los liposomas dirigidos son un vehículo adecuado para suministrar específicamente compuestos encapsulados a cualquier tipo celular dado que expresa la estructura de selección como diana respectiva. Cuando se emplea terapéuticamente, una tecnología de este tipo centra enormemente el compuesto suministrado al/a los tipo(s) celular(es) de elección. Sin embargo, incluso los liposomas no dirigidos pueden ser una herramienta beneficiosa terapéuticamente, debido al hecho de que el propio sistema liposómico básico permite la captación de sustancias encapsuladas en una célula a la que de otro modo podría no tener acceso. Por ejemplo, se ha mostrado anteriormente la inhibición de la propagación de VIH en leucocitos mononucleares de sangre periférica infectados tras el suministro, con liposomas no dirigidos, de ADN sentido 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]). Como segundo ejemplo, se ha mostrado también anteriormente que los compuestos suministrados mediante liposomas dirigidos alcanzan selectivamente el tipo celular de elección, tal como células dendríticas mieloides, y suministran su contenido al interior de tal tipo celular

(Gieseler RK, Marquitan G, Hahn MJ, Perdon LA, Driessen WH, 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* 2004; 59:415-24).

5 Se reconoció el uso potencial de complejos de lípido (liposoma)-fármaco como portadores de fármacos biodegradables o biocompatibles para aumentar la potencia y reducir la toxicidad de los agentes terapéuticos, puesto que el descubrimiento en los años 1960 de que la hidratación de películas lipídicas secas formaba liposomas o vesículas esféricas sólidas que se asemejan a orgánulos celulares en miniatura (por ejemplo, Bangham AD. Liposomes: the Babraham connection. *Chem Phys Lipids* 64:275-285 [1993]). Los complejos de lípido-fármaco se han considerado durante largo tiempo como una manera de mejorar potencialmente el índice terapéutico (IT) de fármacos al aumentar su localización en órganos, tejidos o células específicos. El IT es la razón entre la mediana de la dosis tóxica (DT₅₀) y la mediana de la dosis eficaz (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; sólo entonces se aprobó la primera serie de agentes terapéuticos basados en liposomas para uso humano por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de los Estados Unidos. Tras ello, se han usado los liposomas como portadores de fármacos en aplicaciones farmacéuticas desde mediados de los años 1990 (Lian T, Ho RJY, Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems, *J Pharm Sci* 2001; 90:667-80).

20 Aunque pueden variar los constituyentes lipídicos, muchas formulaciones usan productos sintéticos de un fosfolípido natural (tal como, principalmente, fosfatidilcolina). La mayoría de las formulaciones de liposomas aprobadas para uso humano contienen fosfatidilcolina (con una carga electrostática neutra), con cadenas de ácido graso de longitudes y grados de saturación variables, como principal elemento estructural de membrana. Una fracción de colesterol (~30% molar) se incluye a menudo en la formulación lipídica para modular la rigidez de la membrana liposómica, y para reducir la inestabilidad inducida por el suero provocada por la unión de proteínas del suero a la membrana del liposoma.

30 Basándose en la composición del grupo de cabeza del lípido y el pH, los liposomas pueden llevar una carga negativa, neutra o positiva en su superficie. La naturaleza y densidad de la carga de superficie de los liposomas influye en su estabilidad, cinética y extensión de biodistribución, así como su interacción con, y la captación de liposomas por, células diana. Específicamente, los liposomas con una carga de superficie neutra tienen una menor tendencia a eliminarse por células del sistema reticuloendotelial (SRE) tras la administración sistémica, aún tienen la mayor tendencia a agregarse. Aunque los liposomas cargados negativamente reducen la agregación y revelan un aumento de la estabilidad en suspensión, su captación celular no específica aumenta *in vivo*. Cuando contienen fosfatidilserina (PS) o fosfatidilglicerol (PG), tales liposomas experimentan endocitosis a una velocidad más rápida, y en mayor extensión, que los liposomas neutros (Allen TM *et al.*, Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poli(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*, *Biochim Biophys Acta* 1066:29-36 [1991]; Lee RJ, *et al.*, Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin *in vitro*, *Biochim. Biophys. Acta* 1233:134-144 [1995]). Se reconoce una carga de superficie negativa por receptores hallados en una variedad de células, incluyendo macrófagos (Allen TM *et al.* [1991]; Lee RJ, *et al.*, Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis, *J Biol Chem* 269:3198-3204 [1994]).

45 La inclusión de algunos glicolípidos, tales como el gangliósido GM₁ o fosfatidilinositol (PI), en membranas de liposomas inhibe su captación por macrófagos y células del SRE y da como resultado tiempos de circulación más largos. Se ha sugerido que una pequeña cantidad de lípidos cargados negativamente estabilizan liposomas neutros frente a un mecanismo de captación dependiente de agregación (Drummond DC *et al.*, Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors, *Pharmacol Rev* 51:691-743 [1999]). Los liposomas catiónicos, cargados positivamente, usados a menudo como reactivo de condensación de ADN para el suministro de ADN intracelular en terapia génica, tienen una alta tendencia a interactuar con proteínas del suero; esta interacción da como resultado una captación potenciada por el SRE y el eventual aclaramiento por el pulmón, hígado o bazo. Este mecanismo de aclaramiento del SRE explica parcialmente la baja eficacia de transfección *in vivo*. Otros factores, incluyendo inestabilidad del ADN, aclaramiento mediado por el sistema inmunitario, respuesta inflamatoria y accesibilidad a tejidos también pueden contribuir a una baja eficacia de transfección en animales. De hecho, se ha mostrado que altas dosis de liposomas cargados positivamente producen grados variables de inflamación tisular (Scheule RK *et al.*, Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to the mammalian lung, *Hum Gene Ther* 8:689-707 [1997]).

60 La superficie de las membranas de liposomas puede modificarse para reducir la agregación y evitar el reconocimiento por el SRE usando polímeros hidrófilos. Esta estrategia se denomina a menudo hidratación de la superficie o modificación estérica y se realiza a menudo incorporando gangliósidos, tales como GM₁, o lípidos conjugados químicamente a polímeros higroscópicos o hidrófilos. El método habitual emplea polietilenglicol (PEG) que se conjuga a la amina terminal de fosfatidiletanolamina. Los polímeros hidrófilos adicionales añadidos a la superficie de la membrana del liposoma proporcionan una capa de hidratación de superficie adicional (Torchilin VP, Immunoliposomes and PEGylated immunoliposomes: possible use of targeted delivery of imaging agents, *Immunomethods* 4:244-258 [1994]). Como resultado, los liposomas no pueden reconocerse por los macrófagos o el SRE como extraños, y aparece por tanto la eliminación fagocítica. Varios 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.

La investigación inicial ha demostrado que el tamaño del liposoma afecta a la distribución y el aclaramiento de vesículas tras administración sistémica. La tasa de captación de liposomas por el SRE aumenta con el tamaño de las vesículas (Hwang K, Liposome Pharmacokinetics, En: Ostro MJ, ed., Liposomes: From Biophysics to Therapeutics, Nueva York: Marcel Dekker, págs. 109-156 [1987]). Aunque la captación por el SRE *in vivo* puede saturarse a altas dosis de liposomas o dosificando previamente con grandes cantidades de liposomas control, esta estrategia puede no ser práctica para uso humano debido a los efectos adversos relacionados con la alteración sostenida de funciones fisiológicas del SRE. Generalmente, un aumento en el tamaño de los liposomas de composición similar da como resultado una captación potenciada por el SRE (Senior J, *et al.*, 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 de administración de fármacos sistémica.

Por ejemplo, el producto liposómico antifúngico AmBisome se formula con respecto a la especificación de tamaño de 45-80 nm para reducir la captación por el SRE. La unión a proteínas del suero es un factor importante que afecta al tamaño del liposoma y aumenta la tasa de aclaramiento *in vivo*. También, la activación del complemento por liposomas, y la opsonización, dependen del tamaño de los liposomas (Devine DV, *et al.*, Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies, Biochim Biophys Acta 1191:43-51 [1994]; Liu D, *et al.*, 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 composiciones de liposomas para reducir la unión a proteínas del suero, el límite de tamaño superior de liposomas de PEG-PE de circulación prolongada es de ~200 nm. Debido a limitaciones biológicas, el desarrollo de liposomas grandes (>500 nm) de circulación prolongada usando métodos de estabilización estérica no ha sido satisfactorio. Así, las consideraciones del tamaño del liposoma y su control en la fabricación en una fase temprana del desarrollo de fármacos proporcionan medios para optimizar la eficacia de los sistemas liposómicos de administración de fármacos.

Una de las propiedades clave que hacen de los liposomas un sistema de administración de fármacos inapreciable es su capacidad para modular la farmacocinética de fármacos encapsulados y/o asociados a 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, *et al.*, Pharmacokinetics of long-circulating liposomes, Adv Drug Del Rev 16:267-284 [1995]. Específicamente, con relación a los mismos fármacos en disolución acuosa, son evidentes cambios significativos en la absorción, biodistribución y aclaramiento de fármaco asociado a liposomas, dando como resultado efectos drásticos tanto sobre la eficacia como la toxicidad del compuesto atrapado (Gabizon A, Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy, Adv Drug Del Rev 16:285-294 [1995]; Bethune C, *et al.*, 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]).

Los mecanismos exactos de la biodistribución y disposición de liposomas dependen de su composición lipídica, tamaño, carga y grado de hidratación de superficie/impedimento estérico. La disposición *in vivo* de liposomas también depende de la vía de administración. Por ejemplo, inmediatamente tras la administración intravenosa, los liposomas se recubren habitualmente con proteínas plasmáticas, se captan por el SRE y se eliminan (Chonn A, *et al.*, Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes, J Biol Chem 267:18759-18765 [1992]; Rao M, *et al.*, 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 es probable que interaccionen con liposomas incluyen albúmina, lipoproteínas (por ejemplo, lipoproteína de alta densidad [HDL] y lipoproteína de baja densidad [LDL]), así como proteínas asociadas a células. Algunas de estas, tales como las HDL, pueden desestabilizar en efecto los liposomas eliminando fosfolípidos de su bicapa, conduciendo por tanto potencialmente a la fuga prematura o disociación del fármaco. Además, hasta la fecha, las aplicaciones terapéuticas de liposomas administrados de manera sistémica se han visto limitadas por su rápido aclaramiento del torrente sanguíneo y su captación por el SRE (Alving C, *et al.*, Complement-dependent phagocytosis of liposomes: suppression by 'stealth' lipids, J Liposome Res 2:383-395 [1992]). Tal como se mencionó, puede aumentarse el tiempo de circulación reduciendo el tamaño del liposoma y modificando el efecto estérico/de superficie con derivados de PEG. Además, están disponibles ahora liposomas con membranas modificadas por ingeniería genética para una estabilidad suficiente que se escapen al aclaramiento por el SRE. Por tanto, pueden emplearse liposomas de circulación prolongada que también reducen significativamente los perfiles toxicológicos de los fármacos respectivos para mantener y extender los niveles plasmáticos de fármaco. No obstante, sólo la circulación prolongada aumenta indirectamente la acumulación de fármacos asociados a liposomas en los tejidos o células destinados como dianas eventuales.

Por tanto, a pesar de las ventajas farmacocinéticas obvias como vehículos de suministro de compuestos *in vivo*,

tales resultados especifican inconvenientes con las preparaciones liposómicas y las vías de administración actuales. En cuanto a la presente invención, pueden superarse tales inconvenientes con liposomas (i) que se suministran tópicamente, por ejemplo a través de las vías intradérmica o subcutánea, para alcanzar una ubicación predefinida tal como un ganglio linfático, y (ii) que proporcionan un mecanismo de direccionamiento que puede establecer con exactitud células predefinidas dentro de un sitio anatómico distinto.

Es una aspiración potenciar activamente el direccionamiento de liposomas de modo que se dirijan a las poblaciones celulares de interés antes de eliminarse sustancialmente por el SRE. Por ejemplo, se han empleado satisfactoriamente inmunoliposomas para seleccionar como diana los reservorios de eritrocitos de parásitos de la malaria intracelulares (Owais, M. *et al.*, 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 *et al.*, Use of specific policlonal antibodies for site specific drug targeting to malaria infected erythrocytes in vivo, *Indian J Biochem Biophys* 30:411-3 [1993]).

También es una aspiración aplicar sistemas de administración de lípido-fármaco en la lucha contra la pandemia de VIH/SIDA, estimándose actualmente que aproximadamente 42 millones de personas en todo el mundo están infectadas con VIH (UNAIDS. Global summary of the HIV/AIDS epidemic: December 2003. Disponible de: http://www.unaids.org/wad/2003/press/Epiupdate2003_en/Epi03_02_en.htm). En efecto, los fármacos anti-VIH, tales como análogos de nucleósidos (por ejemplo, derivados de didesoxinucleósidos, incluyendo derivados de 3'-azido-3'-desoxitimidina [AZT], ddC y ddI), inhibidores de proteasa, o fosfonoácidos (por ejemplo, ácidos fosfonofórmico y fosfonoacético), se han derivatizado previamente con lípido o incorporado en liposomas (por ejemplo, Hostetler, KY *et al.*, Methods of treating viral infections using antiviral liponucleotides, n.º de serie 09/846.398, documento US 2001/0033862; patente estadounidense n.º 5.223.263; Hostetler, KY *et al.*, Lipid derivatives of phosphonoacids for liposomal incorporation and method of use, patente estadounidense n.º 5.194.654; Gagné JF *et al.*, Targeted delivery of indinavir to VIH-1 primary reservoirs with immunoliposomes, *Biochim Biophys Acta* 1558(2):198-210 [Feb. 2002]). Todavía, en un informe, la inyección subcutánea de ddI encapsulada en liposomas en ratones C57BL/6, dio como resultado una baja acumulación de liposomas en los ganglios linfáticos, en comparación con la inyección intravenosa (Harvie, P *et al.*, Lymphoid tissues targeting of liposome-encapsulated 2',3'-dideoxyinosine, *AIDS* 9:701-7 [1995]).

Los fármacos anti-VIH se han encapsulado en el núcleo acuoso de inmunoliposomas, que incluyen en sus superficies externas ligandos de selección como diana específica de antígeno (por ejemplo, Bergeron, MG. *et al.*, Targeting of infectious agents bearing host cell proteins. Documento WO 00/66173 A3; Bergeron, MG. *et al.*, Liposomes encapsulating antiviral drugs, patente estadounidense n.º 5.773.027; Bergeron, MG. *et al.*, Liposome formulations for treatment of viral diseases, documento WO 96/10399 A1; Gagné JF *et al.*, Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes, *Biochim Biophys Acta* 1558(2):198-210 [2002]; Dufresne I *et al.*, Targeting lymph nodes with liposomes bearing anti-HLA-DR Fab' fragments, *Biochim Biophys Acta* 1421(2):284-94 [1999]; Bestman-Smith J *et al.*, 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 *et al.*, Targeting cell-free HIV and virally-infected cells with anti-HLA-DR immunoliposomes containing amphotericin B, *AIDS* 10; 14(16):2457-65 [2000]).

Además de muchos ejemplos de liposomas dirigidos a anticuerpos en modelos animales, al menos un inmunoliposoma, DOXIL, que emplea un anticuerpo de cadena sencilla producido frente a HER2/*neu* (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* 2002;8:1172-81 [2002]), se evalúa clínicamente en la actualidad por el mismo grupo para seleccionar como diana terapéuticamente determinados tipos de cáncer de mama.

Otros enfoques de selección como diana se basan en unir moléculas de vector específicas a una superficie del liposoma de modo que se potencie el suministro transmembrana y la captación de compuestos encapsulados en liposomas que de lo contrario sólo se suministran de manera insuficiente a una célula, o que no se suministran de manera eficaz a un órgano intracelular deseable específicamente (revisado en Torchilin VP, Lukyanov AN. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions. *Drug Discov Today* 2003; 8:259-66; Sehgal A. Delivering peptides and proteins to tumors, *Drug Discov Today* 8:619 [2003]; Koning GA, Storm G. Targeted drug delivery systems for the intracellular delivery of macromolecular drugs, *Drug Discov Today* 2003; 8:482-3). Tales moléculas de vector incluyen dominios de transducción de proteínas (PTD, *protein transduction domains*) derivados de diversos virus o de *Drosophila antennapedia*. Son de especial interés para la aplicación en la enfermedad por VIH, Tat de VIH y sus derivados que actúan como PTD (por ejemplo, Schwarze, S.R., *et al.*, In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse, *Science* 285:1569-72 [1999]).

Los intentos de seleccionar como diana de manera activa poblaciones de células linfoides con liposomas se han encontrado con cierto grado de éxito. Por ejemplo, los inmunoliposomas anti-HLA-DR marcados con Fab' que se inyectaron por vía subcutánea a ratones se acumularon en tejidos linfoides (Bestman-Smith J *et al.*, Targeting cell-free HIV and virally-infected cells with anti-HLA-DR immunoliposomes containing amphotericin B, *AIDS* 10; 14:2457-65 [2000]). De manera similar, Gagné *et al.* encontraron concentraciones acumuladas de fármaco en los ganglios linfáticos de ratones a los que se les inyectó, tras inyecciones subcutáneas de fármacos anti-VIH encapsulados en

inmunoliposomas (Gagné JF, Desormeaux A, Perron S, Tremblay MJ, Bergeron MG. Targeted delivery of indinavir to HTV-1 primary reservoirs with immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1558:198-210).

5 El documento WO 98/07408 A da a conocer un liposoma que comprende DOTAP (1,2-bis-(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)-propano) y al menos un colesterol o derivado de colesterol, un agente activo (por ejemplo, ácido nucleico) y un ligando de direccionamiento.

10 El documento WO 02/096390 A da a conocer liposomas que comprenden como ligando de direccionamiento una galactosa y un agente activo tal como un ácido nucleico, ADN o una proteína o un vector de expresión que codifica, por ejemplo, para el factor VIII.

15 El documento WO 00/63251 A da a conocer compuestos que se unen a una lectina de tipo C en la superficie de una célula dendrítica y se usan composiciones adecuadas para el tratamiento de inmunosupresión o inhibición de una infección por VIH.

El documento US 5.686.103 A describe preparaciones de liposomas con un ligando que tiene fucosa como resto terminal. El liposoma podría contener un producto cosmético o un producto farmacéutico.

20 El documento WO 2005/027979 A da a conocer un método de suministro de un fármaco, tal como un fármaco antiviral, uno antifúngico, uno antibacteriano o inmunomodulador, un fármaco citotóxico, para vacunación mediada por células dendríticas, a una célula inmunitaria de un sujeto mamífero. El complejo de lípido-fármaco comprende un fármaco y una superficie externa que comprende al menos un ligando de direccionamiento (específico de CD209) que se une específicamente a un marcador en la superficie de la célula inmunitaria que está infectada con un agente infeccioso.

25 En cuanto a la invención descrita en el presente documento, pueden seleccionarse como diana poblaciones celulares específicas para el suministro intracelular de compuestos terapéuticamente activos mediante sistemas liposómicos dirigidos a las lectinas CRD.

30 La presente invención proporciona un sistema de suministro liposómico dirigido para suministrar selectivamente agentes activos, tales como lectinas o fármacos, a células que expresan determinadas familias de proteínas de superficie (denominadas lectinas CTL y CTLD) que presentan comúnmente dominios de reconocimiento de hidratos de carbono (CRD). Estas lectinas se expresan por las poblaciones celulares de interés. La presente invención por tanto trata, entre otros, la necesidad de incapacitar agentes infecciosos almacenados de forma latente, tales como VIH o VHC, en las diferentes poblaciones que comprenden los reservorios celulares de personas infectadas y de aquéllas que padecen la enfermedad asociada, tal como SIDA o hepatitis C, para suministrar un compuesto terapéutico encapsulado de manera liposómica, tal como una lectina vegetal o un fármaco, para inactivar el agente infeccioso respectivo. Además, la presente invención trata la necesidad de seleccionar como diana células positivas para lectinas CTL o CTLD implicadas en enfermedades crónicas degenerativas o malignas no infecciosas para suministrar un compuesto terapéutico encapsulado de manera liposómica, tal como un inhibidor de la apoptosis o un agente quimioterápico, para interferir de manera beneficiosa con el proceso patogenético respectivo.

Breve resumen de la invención

45 La presente invención según la reivindicación 1 se refiere a liposomas y métodos de direccionamiento y suministro preferentemente, o "de manera activa", de un agente activo, tal como una lectina o fármaco, a una célula inmunitaria de mamífero *in vivo* o *in vitro*. En particular, la presente invención describe liposomas dirigidos mediante mono o polifucosa derivatizada en superficie, creando por tanto un sistema de suministro de compuestos dirigido que encapsula una lectina, o lectinas, tales como, pero sin limitarse a, una lectina obtenida de la planta *Canavalia ensiformis* (es decir, Con-A) o la planta *Myrianthus holstii* (es decir, MHL), a un huésped de células reservorio de patógenos en la enfermedad por VIH, hepatitis relacionada con VHC, tuberculosis y otras entidades patológicas diversas que coinciden con la formación de reservorios intracelulares crónicos de patógenos. Estos santuarios celulares, entre otros, incluyen los diferentes subconjuntos inmunológicos, de desarrollo y anatómicos de células dendríticas, macrófagos y células dendríticas foliculares. El direccionamiento liposómico específico de célula ha de lograrse a través de receptores conservados de manera evolutiva que expresan dominios de reconocimiento de hidratos de carbono (CRD), y específicamente, los denominados receptores de lectina de tipo C (CTLR), incluyendo MR (CD206), langerina (CD207), DEC-205 (CD205) y DC-SIGN (CD209). Todos ellos se denominan receptores de multilectinas. El objetivo de esta invención es proporcionar medios para erradicar los reservorios intracelulares de patógenos, proporcionando por tanto un enfoque novedoso más valioso para la terapia de una gran variedad de entidades patológicas virales, bacterianas y fúngicas. Además, el principio de una interacción irreversible del VIH con una lectina adecuada también puede interferir de manera fatal con la propagación de forma activa del VIH y/u otros virus y bacterias. Tal como se señaló, también pueden aplicarse variantes de esta estrategia, incluyendo fármacos aprobados encapsulados (tales como un agente quimioterápico) para el tratamiento de enfermedades no infecciosas crónicas, especialmente las relacionadas con el hígado y el tracto gastrointestinal. En algunos casos, puede lograrse este objetivo empleando un sistema liposómico con un mecanismo de direccionamiento derivatizado en la superficie.

Un beneficio de la invención es que permite seleccionar como diana todos los principales tipos de reservorios celulares de VIH conocidos. Debido a la naturaleza de un sistema de suministro liposómico, tal como se combina con vías de aplicación razonables para un paciente, se esperan toxicidades y costes extremadamente bajos en comparación con las terapias convencionales. Finalmente, la invención puede aplicarse al tratamiento de un huésped de otras enfermedades.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el aspecto morfológico básico de células dendríticas mieloides (CDm) humanas durante la diferenciación *in vitro*. Se tomaron fotomicrografías de contraste de fase en los días 3 (a), 5 (b), 7 (c, d). (a) En el día 3, tras la inducción de diferenciación mediante GM-CSF e IL-4, CDm con forma ovalada comenzaron a desarrollar velos de membrana y proyecciones de membrana delgadas (flechas) (ampliación original x400). (b) En el día 5, la mayor parte de las CDm inmaduras habían adoptado una morfología estirada y expresaban proyecciones de membrana (es decir, dendritas), aunque todavía están presentes células con forma ovalada. Incluso en esta fase inmadura, algunas de las CDm se asocian para formar pequeñas agrupaciones homotípicas (flechas) (ampliación original x180). (c) Sin embargo, con la inducción de maduración de CDm mediante TNF- α en el día 5, las CDm completamente maduras generalmente se asocian en forma de grandes agrupaciones homotípicas en el día 7. La fuerte agrupación mediante moléculas de adhesión expresadas *de novo* indica que las CDm han alcanzado su madurez funcional completa. Obsérvense las abundantes proyecciones filiformes que señalan hacia fuera de la agrupación (flechas). Cuando se ubican en un órgano linfóide, tales dendritas establecen contacto íntimo con células T para la estimulación específica de antígeno en agrupaciones heterotípicas de CDm-células T (ampliación original x180).

Aunque esta serie de acontecimientos representa el transcurso de la diferenciación de las CDm en la mayor parte de donantes sanos, los monocitos obtenidos de una parte minoritaria de donantes responden de manera diferente a las mismas condiciones microambientales. De manera específica, probablemente debido a la predisposición genética, las células de algunos donantes expresan menos dendritas y/o forman agrupaciones más pequeñas, pero más numerosas. Un ejemplo se representa en (d) a x50 de aumento de un pocillo de microtitulación completo. Además, en casos muy poco frecuentes, no se produce en absoluto la diferenciación de CDm y en cambio se desarrollan macrófagos; esto puede deberse a señales de cebado fundamentales que actúan sobre los monocitos en el donante respectivo, por ejemplo, en caso de una infección en curso. De manera importante, los estudios de selección como diana en células dendríticas mieloides humanas se llevaron a cabo en CDm tras la ruta de diferenciación regular observada en aproximadamente el 80-90% de los casos en presencia de GM-CSF/IL-4 y TNF- α secuencial.

La figura 2 muestra secciones ópticas en serie a través de células dendríticas mieloides (CDm) inmaduras seccionadas como diana con liposomas marcados con fucosa que suministran el colorante trazador calceína. Las CDm inmaduras generadas durante 5 días con GM-CSF e IL-4 se desprendieron del sustrato mediante EDTA y se incubaron durante 3 h con agitación continua a 37°C con liposomas dirigidos por Fuc-C4-Col que suministran el colorante trazador fluorescente verde calceína. Se contratiñeron las células con colorante DAPI nuclear azul y se fijaron. (a-1) Las superposiciones de microscopía de fluorescencia de secciones en serie (etapas de ~1 μ m) representan la captación del sistema por dos CDm que representan las tasas de captación inferior y superior observadas. En la CDm de la izquierda, la calceína estaba confinada principalmente en los endosomas (por ejemplo, c; flecha), con débil tinción citoplasmática ocasional (por ejemplo, superpuesta al núcleo en el marco g; flecha). En cambio, la CDm de la derecha reveló tinción brillante de ambos endosomas (fluorescencia destacada, por ejemplo, c, f) y citoplasma (por ejemplo, b). Cuando se comparan números de células mayores, todas las CDm de todos los donantes sometidos a prueba (n = 3) habían internalizado el sistema dirigido por fucosa. Tal como resulta evidente a partir de la tinción azul, la carga útil de los liposomas nunca se suministró al núcleo. Los controles positivos dirigidos por Man-C4-Col se captaron de manera menos eficaz y los controles negativos dirigidos por Gal-C4-Col no se unieron y/o internalizaron (no mostrado). Ampliación original x400.

La figura 3 muestra la unión y captación de liposomas marcados con manosa mediante CDm inmaduras tras 5 días de cultivo. El grado de unión o captación se representa en dos donantes (A, fila superior; B, fila inferior) mediante comparación de fotomicrografías de contraste de fase (columna de la izquierda) y fluorescencia (columna de la derecha). En ambos casos, y a diferencia de los liposomas marcados con fucosa, sólo menos del 50% de las células revelaron el colorante trazador, calceína, dentro de liposomas unidos a su superficie o internalizados tras incubación de 3 horas. Aunque algunas CDm positivas para trazador mostraron captación intracelular (B1, B2: círculos superiores y centrales), otras todavía sólo revelaron unión de superficie sin captación (A1, A2 y B1, B2: círculos inferiores) tras la incubación prolongada. En CDm inmaduras, la selección como diana mediante liposomas marcados con Man-C4-Col no sólo alcanzaron por tanto muchas menos CDm que lo observado cuando se empleó el sistema de suministro dirigido por Fuc-C4-Col (compárese también con citometría de flujo), sino que el sistema dirigido por manosa también fue captado de manera mucho menos eficaz mediante endocitosis mediada por receptor. Sin embargo, el direccionamiento con manosa fue igualmente eficaz en macrófagos, probablemente debido a la expresión superior de la lectina de tipo C receptora de manosa (CD206) de estas células (no mostrado). La incubación con liposomas de control negativo marcados con Gal-C4-Col nunca condujo a unión de superficie ni captación intracelular (no mostrado). Las flechas en las micrografías de contraste de fase A1 y B1 señalan células

que habían muerto durante el cultivo, tal como resulta evidente por la formación de vesículas en sus membranas de superficie. Aunque una célula muerta ocasional reveló tinción de calceína no específica (A1, A2: círculos superiores), generalmente no se observó unión no específica de liposomas marcados por fucosa, manosa o galactosa a células muertas en este punto de tiempo (compárense las células en recuadro colocadas exactamente con barras equidistantes en B1 y B2).

La figura 4 muestra la selección como diana específica de lectina de tipo C de CDm maduras agrupadas. Las agrupaciones homotípicas de CDm maduras tras un cultivo de 7 días en presencia de GM-CSF, IL-4 y TNF- α habitualmente son de forma redondeada global y pueden comprender varios cientos de células (véase la figura 1). Las agrupaciones se disgregan parcialmente tras el procesamiento de células cultivadas antes de la incubación con el sistema de direccionamiento. Sin embargo, debido a la estrecha unión de las CDm maduras a través de moléculas de adhesión (por ejemplo, ICAM-1, ICAM-3, LFA-1), fragmentos de tales agrupaciones permanecen físicamente intactos. La fotomicrografía de fluorescencia grande muestra un fragmento de este tipo que comprende varias CDm estrechamente asociadas tras una incubación de 3 horas con liposomas marcados con Fuc-C4-Col. Con un perfilado azul fino que marca el contorno de este fragmento, se enumera cada célula individual en su lado inferior derecho en sentido horario en espiral hacia el interior. Las 17 CDm contadas muestran al menos tinción citoplasmática débil mediante calceína suministrada por liposomas. En la mayoría de los casos, los endosomas teñidos resaltan por su fluorescencia destacada brillante, deslumbrante. El colorante trazador nunca tiñó los núcleos de las células (cuando eran visibles), tal como se indica mediante flechas. Las CDm maduras generalmente revelaron una captación inferior tras la selección como diana de la observada en CDm inmaduras (véase la figura 2 y los resultados de la citometría de flujo). El sistema dirigido por fucosa alcanzó por tanto todas las CDm maduras pese a su estrecha asociación física. Lo mismo puede esperarse por tanto para CDm agrupadas homotípicamente, así como para CDm dentro de agrupaciones heterotípicas de CDm-células T en tejidos y órganos linfoides *in vivo*. Ampliación original x400. Tal como se representa en el inserto pequeño, las CDm individuales de cultivos de 7 días mostraron más a menudo captación intensa de liposomas dirigidos por fucosa y suministro de calceína. El núcleo con forma irregular típico de la CDm con perfilado rojo está completamente separado del suministro de calceína. Los liposomas dirigidos unidos probablemente a receptores de lectina de tipo C de superficie (con perfilado azul) se indican mediante flechas. Ampliación original x1000.

De manera importante, una parte sistemática de las CDm inmaduras representadas en la figura 2 así como las CDm maduras mostradas en la figura 4 expresaban el marcador de las células de Langerhans CD1a (véase la citometría de flujo). Tales células corresponden a subconjuntos de CDm de la mucosa y la epidermis infectadas en primer lugar tras la transmisión sexual del VIH. A la inversa, otra parte de las CDm no expresaba CD1a (véase la citometría de flujo), correspondiendo por tanto a otros subconjuntos de CDm sistémicas y linfoides. Finalmente, las CDm maduras (figura 4) expresaban el marcador CD83 de la superfamilia de inmunoglobulinas expresado de manera sistemática por CDm maduras ubicadas en los órganos linfoides. Todos estos tipos de CDm se seleccionaron como diana satisfactoriamente para suministro citoplasmático y endosómico intracelular de un compuesto encapsulado. Por tanto, estos resultados indican fuertemente que todos los subconjuntos de CDm periféricas y linfoides pueden seleccionarse como diana de manera eficaz con un sistema marcado con Fuc-4C-Col para suministro intracelular de un compuesto terapéutico.

La figura 5 muestra la unión y captación de liposomas marcados con fucosa mediante macrófagos humanos tras 7 días de cultivo. Antes de la incubación, los macrófagos se desprendieron del sustrato mediante tratamiento con EDTA/tripsina y luego se mantuvieron con agitación continua para evitar que volvieran a unirse firmemente, de modo que se permitiera su transferencia posterior a portaobjetos. (a-h) Secciones ópticas en serie a través de un macrófago representativo revelaron, ya tras 2 horas de incubación con liposomas marcados con Fuc-C4-Col, abundante tinción intracelular confinada a endosomas mediante el colorante trazador, calceína, suministrado por el sistema de direccionamiento. A diferencia de las células dendríticas mieloides, la tinción citoplasmática (es decir, suministro liposómico) fue mucho menos evidente en macrófagos. Los liposomas marcados con Man-C4-Col tenían una eficacia de direccionamiento comparable (no mostrada). La incubación con el control negativo marcado con Gal-C4-Col sólo condujo a captación menor por un macrófago ocasional (no mostrado). En el caso representado aquí, las células se generaron en presencia de suero de donante autólogo al 10%. Ampliación original x1000.

La figura 6 es una fotomicrografía de fluorescencia en color de un macrófago representativo de un donante diferente 2 horas tras el direccionamiento con liposomas marcados con fucosa. En este caso, los macrófagos se diferenciaron durante 7 días en presencia de suero bovino fetal (FBS) xenogénico al 10%. En tales condiciones, los resultados de unión y captación fueron idénticos a los obtenidos con macrófagos generados con suero autólogo, incluyendo los resultados tras direccionamiento con los sistemas control positivo (Man-C4-Col) y negativo (Gal-C4-Col). La diferenciación dependiente de FBS puede emplearse por tanto *in vitro* para estudios de direccionamiento de macrófagos. Sección media. Ampliación original x1000.

De manera importante, estos resultados mostraron que el sistema de suministro liposómico dirigido por fucosa también se internalizaba de manera eficaz por los macrófagos representando un sistema de células que, como en la enfermedad por VIH, constituye el principal reservorio celular infeccioso del tracto gastrointestinal y, quizá del cerebro.

La figura 7 muestra secciones ópticas en serie a través de un monocito seleccionado como diana con liposomas marcados con Fuc-4C-Col que suministran el colorante trazador calceína. Se incubaron monocitos de sangre periférica recién aislados durante 3 h con agitación continua a 37°C con liposomas marcados con Fuc-C4-Col que suministran el colorante trazador fluorescente verde, calceína. Se contratiñeron las células con el colorante DAPI nuclear azul y se fijaron. (a-f) Las superposiciones de microscopía de fluorescencia verdes/azules de secciones en serie (etapas de ~1,5 mm) representan la captación del sistema por un monocito representativo (obsérvese la forma nuclear típica). En los monocitos, la distribución intracelular de calceína como la carga libre del sistema dirigido fue idéntica a la observada en las CDm. El compuesto fluorescente se concentró en los endosomas de las células (tal como resulta más evidente en los marcos c, d, y e; fluorescencia destacada), así como, de manera más difusa, en el citoplasma de los monocitos (es decir, todas las micrografías en serie), pero nunca dentro de sus núcleos. Además, tal como se encontró para las CDm, también todos los monocitos de todos los donantes sometidos a prueba (n = 3) habían internalizado el sistema dirigido por fucosa. De nuevo la captación de los controles positivos dirigidos por Man-C4-Col fue menos eficaz y los controles negativos dirigidos por Gal-C4-Col no se unieron y/o internalizaron en absoluto (no mostrado). Ampliación original x400.

De manera importante, estos resultados muestran que, además de alcanzar las células dendríticas mieloides y los macrófagos, el suministro dirigido mediado por fucosa de un compuesto terapéutico puede lograrse también para monocitos. Esta conclusión puede tener un profundo impacto cuando se considera que los monocitos, tal como se explicó anteriormente, potencialmente son el primer tipo celular derivado de linaje mieloides que va a reclutarse como reservorio infeccioso para el VIH y otros agentes infecciosos. De hecho, el caso de que los monocitos se seleccionaran como diana de manera tan eficaz por un sistema específico de lectina de tipo C subraya la importancia de esta ruta para la captación de agentes infecciosos y la posterior formación de reservorios intracelulares infecciosos de manera crónica en una multitud de descendientes monocíticos fisiológicos y patológicos.

La figura 8 muestra que el sistema de suministro de compuestos dirigido por fucosa es altamente específico y tiene una eficacia de direccionamiento extremadamente alta. Cuando se emplean células dendríticas mieloides tanto maduras como inmaduras como poblaciones reservorio importantes para VIH y otros agentes infecciosos, el direccionamiento por fucosa fue el más eficaz en CDm inmaduras. La unión o captación de liposomas marcados con hidratos de carbono que suministran calceína se representa como histogramas rellenos superpuestos con histogramas vacíos de tinción de fondo con liposomas no marcados por azúcares que se unen a células de manera no específica. La eficacia de unión de los liposomas de control negativo marcados con Gal-C4-Col nunca difirió de la de los liposomas de control no específicos, verificando de ese modo la correcta elección del marcaje con galactosa como control negativo. En cambio, los liposomas marcados con fucosa y manosa mostraron diferentes grados de direccionamiento y/o captación de superficie celular específicos. Cuando se comparó con el control positivo de Man-C4-Col, el sistema dirigido por Fuc-C4-Col reveló la eficacia de unión muy superior en CDm inmaduras. En ambos donantes, en una escala logarítmica (abscisas), la eficacia de direccionamiento de los liposomas marcados con fucosa superó a la del control positivo en un orden de magnitud. La selección como diana específica de CDm maduras fue dependiente del donante, porque algunos individuos, tales como el donante A, producen CDm maduras que expresan sólo bajos niveles de lectinas de tipo C. Sin embargo, la mayoría de los donantes, por ejemplo el donante B, revelan al menos densidades de membrana medias de tales moléculas (véase también la figura 10), de modo que su expresión total neta permite el direccionamiento eficaz con un sistema de suministro liposómico marcado con Fuc-4-Col. No obstante, incluso la baja unión a CDm maduras en tales individuos puede aumentarse significativamente mediante concentraciones superiores de este sistema (véase la figura 9).

La figura 9 muestra que concentraciones aumentadas de liposomas marcados con fucosa seleccionan como diana tanto CDm inmaduras como maduras de manera altamente eficaz. Empleando los mismos controles positivos y negativos (véase la leyenda de la figura 8), se incubaron CDm inmaduras y maduras con diferentes concentraciones del sistema dirigido por Fuc-C4-Col. Este experimento se llevó a cabo con dos donantes (C y D) en los que una baja concentración del sistema de direccionamiento (fila inferior) alcanzó de manera eficaz las CDm inmaduras, pero no las maduras. Sin embargo, cuando se aumentó la concentración del sistema en factores de x10 o x100, respectivamente (filas central y superior), las CD inmaduras se seleccionaron como diana de manera altamente eficaz. La concentración media se aplicó en los experimentos representados en la figura 2 y la figura 4. Las flechas de la fila central (donante C) indican posiciones aproximadas de las dos células mostradas en la figura 2 que representan el espectro celular de eficacia de unión y captación del sistema de direccionamiento con Fuc-4C-Col en estas condiciones. Consideradas juntas, ambas células que expresan densidades de membrana de superficie alta y baja de receptores de lectina de tipo C pueden abordarse satisfactoriamente con este sistema de suministro de compuestos dirigido.

La figura 10 representa el fenotipado de células dendríticas mieloides inmaduras y maduras. Las células positivas para marcador se representan como histogramas rellenos y se superponen con histogramas vacíos indicando tinción de fondo con anticuerpo control irrelevante negativo. Las zonas grises a la izquierda del punto de corte de control negativo reflejan la parte de células que no expresan un marcador dado; las zonas grises a la derecha del punto de corte expresan el marcador (tal como se muestra a modo de ejemplo en el gráfico que muestra la expresión de CD1a en CDm inmaduras del donante A). Las abscisas indican intensidades de fluorescencia logarítmicas de marcaje celular con anticuerpos secundarios conjugados con FITC tras añadir anticuerpos monoclonales primarios

que reconocen el marcador respectivo. DC-SIGN y el receptor de manosa como representantes típicos de lectinas de tipo C expresadas por las CDm se expresan ambos de manera más pronunciada en CDm inmaduras que en maduras. Las variaciones individuales son evidentes. Las CD inmaduras *in vivo* residen en tejidos y órganos no linfoides periféricos. Aquí, la fuerte expresión de tales moléculas de superficie garantiza la capacidad de las células para unirse e ingerir muchos patógenos. Una vez que han migrado a los tejidos y órganos linfoides, las CDm maduras regulan por disminución la expresión de lectina de tipo C, pero habitualmente conservan densidades de membrana medias de estos marcadores de direccionamiento. De manera notable, por lo que se sabe actualmente, las CDm generalmente expresan al menos cuatro lectinas de tipo C de superficie diferentes (DC-SIGN, DEC-205, MR y DLEC), de modo que la expresión total neta de tales moléculas siempre permite el direccionamiento eficaz con un sistema de suministro liposómico marcado con fucosa. De manera similar, los macrófagos pueden seleccionarse como diana en todas sus fases de desarrollo, ya que revelan una alta expresión de manera sistemática del receptor de manosa (no mostrado). También puede inducirse que estas células expresen otras lectinas de tipo C tales como DC-SIGN. La expresión de CD83 indica el estado maduro de las CDm. *In vivo*, la expresión de CD1a es indicativa de subconjuntos de CDm de células de Langerhans (que por tanto también expresan langerina como quinta lectina de tipo C) ubicados en las mucosas y la epidermis. Obsérvese que tanto las CDm inmaduras como las maduras, en todo momento, comprendían un espectro de células negativas para CD1a a fuertemente positivas para CD1a, cubriendo por tanto un espectro correspondiente de CDm de tipo células no de Langerhans a de Langerhans. Los liposomas marcados con Fuc-C4-Col suministraban de manera satisfactoria calceína de manera intracelular a todos estos subtipos (véanse las figuras 2, 4), indicando por tanto su alto potencial como sistema para suministrar compuesto(s) terapéutico(s) a sitios endosómicos e intracitoplasmáticos.

La figura 11 muestra los cambios morfológicos en las CDm tras un cultivo de 8 días de CDm infectadas por VIH con o sin tratamiento de direccionamiento. I. Aspecto del cultivo y agrupación homotípica de CDm. Las células se diferenciaron en presencia de GM-CF/IL-4 (día 0) y TNF- α secuencial (día 5). En los días 2, 4 ó 6, se infectaron las CDm con la cepa M-tópica de VIH-1, Ada-M, o con la cepa T-tópica de VIH, Lai, respectivamente. Las dosis infectivas para cultivo tisular para el 50% de las células fueron I. VIH-1 Ada-M: 67 x TCID₅₀ (es decir, 1 ml de disolución madre de virus + 199 ml de medio de cultivo); y II. VIH-1 LAI: 6,7 x TCID₅₀ (es decir, 0,1 ml de disolución madre de virus + 199,9 ml de medio de cultivo). Los resultados se obtuvieron barriendo todas las zonas de cuatro pocillos de cultivo separados para cada situación. Se evaluó la agrupación homotípica de CDm como criterio que indica la integridad funcional de estas células en el día 8; los resultados se facilitan como valores semicuantitativos y absolutos (redondeados). Un día tras la infección con la cepa respectiva, las CDm se trataron con liposomas dirigidos por Fuc-4C-Col que suministran concanavalina A (Con-A). Este retardo en el tiempo permitió que las células formaran reservorios intracelulares de VIH. Tal como resulta evidente, en ambos tipos de infección por VIH-1, y en todas las condiciones sometidas a prueba, se normalizó el comportamiento de agrupamiento. Puesto que el agrupamiento homotípico y heterotípico de CDm se regula por incremento por el VIH con la infección (Sol-Foulon N, Moris A, Nobile C, Boccaccio C, Engering A, Abastado JP, Heard JM, van Kooyk Y, Schwartz O. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity* 2002; 16:145-55), estos resultados demuestran indirectamente la eliminación satisfactoria del VIH (véase también la figura 12).

La figura 12 muestra los cambios morfológicos en las CDm tras un cultivo de 8 días de CDm infectadas por VIH con o sin tratamiento dirigido. II. Tipos de CDm y viabilidad. Todas las condiciones para generar las CDm, la infección con VIH-1, el tratamiento dirigido son tal como se facilitan en la leyenda de la figura 11. Los resultados se obtuvieron barriendo todas las zonas de cuatro pocillos de cultivo separados para cada situación. La tasa de mortalidad aumentada de las CDm con la infección con VIH-1 se normalizó tras el tratamiento con liposomas dirigidos por fucosa que suministran Con-A. Obsérvese que el procedimiento de lavado tras el tratamiento liposómico durante 3 horas eliminó las células muertas acumuladas tras la infección de las CDm. Los cultivos, por tanto, en ocasiones comprenden números de células significativamente reducidos cuando se comparan con cultivos no infectados en el mismo punto de tiempo dado, lo que, a través de concentraciones inferiores de señales autocrinas de auto-acondicionamiento, puede afectar a la razón relativa de morfologías de CDm. No obstante, el cambio relativo entre tipos de CDm como células veladas y dendriformes tras la infección por VIH se normalizó en su mayor parte tras el tratamiento. Estos resultados demuestran de nuevo indirectamente la eliminación satisfactoria del VIH.

La figura 13 se titula (I) eliminación normal de patógenos, (II) evasión por VIH; y (III) el sistema de tratamiento y direccionamiento de hidrato de carbono-lectina de la invención.

La figura 14 se titula el sistema de tratamiento y direccionamiento de hidrato de carbono-lectina de la invención.

Descripción detallada de la invención

Ha resultado cada vez más evidente que algunos patógenos/agentes infecciosos, incluyendo VIH-1, VHC y *Mycobacterium tuberculosis*, pueden establecer reservorios infecciosos endosómicos/intracelulares aprovechándose del aclaramiento de patógenos dependiente de lectina de tipo C evolutivamente antigua de la célula (Gieseler RK, Marquitan G, Hahn MJ, Perdon LA, Driessen WH, Sullivan SM, Scolaro MJ. DG-SIGN-specific liposomal targeting and selective intracellular compound delivery to human myeloid dendritic cells: implications for HIV disease. *Scand J Immunol* 2004; 59:415-24; y las referencias en ese documento). Además, cuando establecen su residencia en una célula presentadora de antígeno, estos agentes infecciosos también trastocan las funciones de instrucción de células

T de la célula presentadora de antígeno y por tanto se escapan a la inmunovigilancia. Específicamente, el uso erróneo de DC-SIGN expresada por una CDM puede sortear el procesamiento de la CPA de los antígenos del patógeno y/o alterar su señalización mediada por receptores de tipo Toll. Por tanto, o bien se suprimen o bien se dirigen mal respuestas de células T potencialmente protectoras. Tal como se comenta en el presente documento, también se aprovechan otros receptores de CTL tales como el receptor de manosa, langerina y DEC-205, lo que da como resultado así mismo la desviación de sus rutas de señalización regulares (revisado en van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:697-709). Por tanto, las invenciones dadas a conocer en el presente documento emplean un sistema de direccionamiento de pan-CTL para entrar terapéuticamente en compartimentos intracelulares en los que se esconden VIH (u otros patógenos/agentes infecciosos).

Los receptores de CTL reconocen hidratos de carbono que se expresan predominantemente en la superficie de patógenos. Estos azúcares característicos hacen de puente entre límites de especies y permiten por tanto que los receptores de CTL interfieran con un amplio espectro de agentes infecciosos/patógenos (revisado en Taylor ME, Drickamer K. Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 1993; 268:399-404; y revisado en Botos I, Wlodawer A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol*: en impresión). Las invenciones dadas a conocer en el presente documento se aprovechan de la selectividad de azúcar del receptor de lectina de tipo C en el sistema de direccionamiento de la invención. Los receptores de CTL se unen preferente y selectivamente a los monosacáridos limitados para patógenos manosa, fucosa y *N*-acetilglucosamina, así como oligosacáridos multivalentes de naturaleza similar (Geyer H, Holschbach C, Hunsmann G, Schneider J. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. *J Biol Chem* 1988; 263:11760-7; revisado en Taylor ME, Drickamer K. Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 1993; 268:399-404; y revisado en Botos I, Wlodawer A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol*: en impresión). Con respecto a la presente invención, se ha diseñado un mecanismo de direccionamiento dependiente de hidrato de carbono "similar a patógeno" para seleccionar como diana células reservorio y otras y suministrar compuestos/agentes activos de manera intracelular a tales células. Las células reservorio incluyen células que proporcionan un reservorio para agentes infecciosos, tales como virus y bacterias, y/o patógenos latentes.

Cambi y Figdor han señalado que los receptores de CTL en el sistema inmunitario tienen una doble función, principalmente, permitir el reconocimiento de patógenos y la adhesión celular. Esto implica que (1) la unión de patógenos a receptores tales como DC-SIGN, receptor de manosa y DEC-205 da como resultado endocitosis y fusión de lisosomas/endosomas tardíos, mientras que (2) determinados tipos de receptores, por ejemplo, DC-SIGN, receptor de manosa, DCAL1 y selectinas median el contacto entre, por ejemplo, CDM y células T como requisito previo para la activación y coestimulación de células T sucesivas), así como leucocitos y endotelio (mediando mediante lo cual el asentamiento leucocitario). Por tanto, resulta evidente que los receptores de CTL tales como DC-SIGN y receptor de manosa median tanto la endocitosis como el contacto/adhesión (Cambi A, Figdor CG. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:539-46). Es de interés que tales receptores se expresan por la mayoría de células reservorio de VIH. La doble función fisiológica de algunas moléculas de CTL puede ser el factor decisivo para su asimismo doble papel patológico en (i) la formación de reservorios de VIH (mediante unión y captación de patógenos), y posteriormente (ii) la transferencia del virus a células vecinas (mediante contacto/adhesión). La mayoría de las células reservorio de VIH presentan receptores de CTL de unión a azúcar en su superficie. Las invenciones dadas a conocer en el presente documento se materializan en una estrategia terapéutica para tales enfermedades que se agrega, y se aprovechan de, el concepto de lectinas CRD primordial y, por tanto, fundamental de la naturaleza. Además, debido al hecho de que una célula puede internalizar un ligando una vez acoplado por un receptor de CRD, esta estrategia puede ocuparse incluso de enfermedades crónicas no infecciosas.

Sin embargo, en cuanto a los reservorios de células T de memoria y linfocitos citotóxicos naturales (Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 1998; 163:19-34), se expresan receptores que presentan dominios similares a lectina de tipo C (CTLD) estructuralmente similares. Por tanto, aunque los receptores de CTL y CTLD no están relacionados evolutivamente (Khalturin K, Becker M, Rinkevich B, Bosch TC. Urochordates and the origin of natural killer cells: identification of a CD94/NKR-P1-related receptor in blood cells of *Botryllus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:622-7. Epub 07 de enero de 2003; y Zelensky AN, Gready JE. C-type lectin-like domains in *Fugu rubripes*. *BMC Genomics* 2004; 5:51), ambos puede acoplarse no sólo por el VIH, sino también por un sistema que selecciona como diana sus similitudes estructurales. El sistema de direccionamiento de la invención se diseña para ocuparse de toda la composición de células reservorio de VIH.

El sistema de direccionamiento de la invención puede alcanzar no sólo células reservorio, sino también células T infectadas a través de células reservorio dentro de tejidos y órganos linfoides. El sistema de direccionamiento liposómico de la invención reveló aproximadamente dos horas de redundancia de membrana antes de captarse por las células seleccionadas como diana. Específicamente, (i) esta captación retardada; (ii) la asociación de los receptores de CTL y liposomas unidos transitoriamente en las sinapsis inmunológicas formadas entre células reservorio y células T; (iii) el papel crucial de estos receptores para la transferencia del VIH a células T (Arrighi JF, Pion M, Garcia E, Escola JM, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB, Piguet V. DC-SIGN-mediated infectious synapse

formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* 2004; 200:1279-88); y (iv) el tamaño similar a VIH de los liposomas (Gieseler RK, Marquitan G, Hahn MJ, Perdon LA, Driessen WH, 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* 2004; 59:415-24) pueden permitir que el sistema de suministro dirigido de la invención utilice la ruta para la entrada de células T que aprovecha el propio virus. De ese modo, el sistema de direccionamiento de la invención también puede transferirse a células T además. En ciertos grados, pueden suministrarse lectinas a células T para aglutinar VIH infeccioso reciente, y/o para interferir con el virus de replicación activa (Gieseler RK, Marquitan G, Hahn MJ, Perdon LA, Driessen WH, 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* 2004; 59:415-24).

El colesterol de membrana es un factor clave en la captación celular de VIH (Liao Z, Cimasky LM, Hampton R, Nguyen DH, Hildreth JE. Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retrovirus* 2001; 17:1009-19). En una realización de la invención, presentando derivados de fucosil-colesterol, el sistema de direccionamiento liposómico de la invención proporciona por tanto un componente trópico para VIH que puede permitir (de manera similar a inhibidores de fusión) una asociación por fusión previa de viriones y liposomas dentro de la balsa lipídica de la sinapsis infecciosa. Además, cuando se transporta en una célula T con replicación de VIH, el sistema de suministro de lectina dirigido se encuentra con un entorno en el que las etapas principales de glicosilación de gp120 y ensamblaje viral se producen dentro de compartimentos endosómicos (Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 2002; 8:673-80); debido al tropismo endosómico demostrado de los liposomas dirigidos de la invención, se espera por tanto que la interferencia de lectina con los residuos de glicosilo de gp120 altamente conservados (véase a continuación) también tendrá un efecto en los linfocitos T. En tercer lugar, la poliproteína Gag de VIH, que es esencial para la gemación viral, se asocia preferentemente con microdominios de membrana ricos en colesterol (Ono A, Freed EO. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:13925-30). La preferencia fisicoquímica de Gag puede conducir por tanto los viriones en gemación directamente a una "trampa de lectina" a través del componente de colesterol del sistema de direccionamiento liposómico de la invención.

El sistema de suministro de la invención, por tanto, interacciona potencialmente con todos los procesos clave de propagación viral activa, es decir, captación, ensamblaje y gemación. Los sistemas y productos de la invención, además de interferir con reservorios celulares de VIH, también pueden perturbar la propagación activa de VIH en células T.

En una realización de la invención, se seleccionan como diana poblaciones celulares específicas para el suministro de compuestos/agentes terapéuticamente activos mediante sistemas liposómicos dirigidos a las lectinas CRD en la superficie de las células de las poblaciones celulares específicas. Los sistemas liposómicos (es decir, complejos de lípido-agente activo) que encapsulan un(os) agente(s) activo(s), tal(es) como una(s) lectinas(s) vegetal(es), y tienen un(os) ligando(s) de direccionamiento que se derivatiza(n) con hidratos de carbono, tales como Fuc-4C-Col, en la superficie externa de los sistemas liposómicos, se administran a las células. Otra realización de la invención son los sistemas liposómicos dirigidos (es decir, los complejos de lípido-agente activo que contienen el agente activo y tienen un ligando de reconocimiento derivatizado con hidratos de carbono en la superficie de tales complejos). En una realización preferida de la invención, el ligando de direccionamiento es Fuc-4C-Col.

En 1981, Robbins *et al.* identificaron por primera vez en macrófagos de mamíferos un sistema de transporte que se une a e internaliza glicoproteínas con residuos de manosa expuestos. Predijeron que los "sustratos sintéticos pueden ser útiles en el direccionamiento de agentes farmacológicos a macrófagos, y compuestos análogos pueden dirigir tales agentes a otros tipos de célula" (Robbins JC, Lam MH, Tripp CS, Bugianesi RL, Ponpipom MM, Shen TY. Synthetic glycopeptide substrates for receptor-mediated endocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:7294-8).

Los experimentos iniciales que emplearon liposomas con una superficie manosilada revelaron una interacción específica con el receptor de manosa-fucosa de macrófagos (ahora denominado receptor de manosa, CD206, o MRC1; véase a continuación), lo que condujo a la sugerencia de que un vehículo de este tipo sería útil para el suministro de inmunomoduladores a células reticuloendoteliales (Barratt G, Tenu JP, Yapo A, Petit JF. Preparation and characterisation of liposomes containing mannosylated phospholipids capable of targeting drugs to macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1986; 862:153-64). Cuando se encapsula un inmunomodulador en tales liposomas, los macrófagos alveolares seleccionados como diana indujeron una respuesta antitumoral citotóxica tanto *in vivo* como *in vitro* (Barratt GM, Nolibé D, Yapo A, Petit JF, Tenu JP. Use of mannosylated liposomes for *in vivo* targeting of a macrophage activator and control of artificial pulmonary metastases. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1987; 138:437-50). Estos resultados demuestran la utilidad potencial de un sistema de suministro liposómico dirigido por hidratos de carbono.

Más recientemente, Copland *et al.* dirigieron la lectina de tipo C receptora de manosa (CD206; MRC1) de células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos con liposomas manosilados. Tal como se monitoriza mediante FITC-ovoalbúmina encapsulada, tales liposomas se unieron y captaron preferentemente por estas células a 37°C en

comparación con liposomas no manosilados neutros o cargados negativamente. Además, los liposomas manosilados que encapsulaban toxoide tetánico (TT) provocaron una estimulación/proliferación de células T específica de TT dependiente de células dendríticas de manera más eficaz que los liposomas que contenían TT neutros o TT libre no encapsulado, lo que condujo a la conclusión de que los liposomas manosilados son un
 5 vehículo de suministro versátil para potenciar respuestas inmunitarias frente a vacunas de proteínas o péptidos encapsulados (Copland MJ *et al.* Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells. *Vaccine* 2003; 21:883-90).

Ambos estudios sobre células dendríticas mieloides resumidos anteriormente (Copland MJ *et al.* Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells. *Vaccine* 2003; 21:883-90; y Gieseler RK, Marquitan G, Hahn MJ, Perdon LA, Driessen WH, Sullivan SM, Scolaro MJ. DC-SIGN-specific liposomal targeting and selective intracellular compound
 10 delivery to human myeloid dendritic cells: implications for HIV disease. *Scand J Immunol* 2004;59:415-24) demostraron por tanto de manera independiente que las células que expresan lectinas de tipo C (a las que se hace referencia específicamente en el presente documento) pueden seleccionarse como diana de manera altamente eficaz para la captación intracelular, suministro específico del sitio y modulación funcional por liposomas marcados
 15 tanto con anticuerpos como hidratos de carbono.

En cuanto a la biodistribución *in vivo* tras la administración sistémica de liposomas específicos de receptores de lectina de tipo C, Kawakami y colaboradores investigaron liposomas manosilados, fucosilados y galactosilados. Tras la inyección intravenosa en ratones, los tres tipos de liposomas glicosilados se eliminaron rápidamente de la sangre
 20 circulante y se recuperaron preferentemente en el hígado, y se concluyó que se captaban por células hepáticas parenquimatosas y no parenquimatosas, a diferentes tasas, a través de receptores de asialoglicoproteína (Kawakami S, Wong J, Sato A, Hattori Y, Yamashita F, Hashida M. Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1524:258-65).

Sin embargo, a diferencia de un modo de aplicación sistémico, las realizaciones de la invención emplean la administración local de liposomas específicos de receptores de CTL, tal como mediante inyección sub- o intracutánea, de modo que se drene a los ganglios linfáticos locales para seleccionar como diana reservorios
 25 infecciosos regionales de patógenos. Incluso cuando se tiene como objetivo dianas celulares en contextos hepatogastroenterológicos de enfermedades no infecciosas crónicas, las realizaciones de la invención aumentan la selectividad del tratamiento aprovechándose de métodos dirigidos a órganos establecidos, por ejemplo, infusión directa a través de la arteria hepática (Kemeny MM, Alava G, Oliver JM. The effects on liver metastases of circadian patterned continuous hepatic artery infusion of FUJDR. *HPB Surg* 1994; 7:219-24). Por tanto, cuando se emplea un sistema de direccionamiento liposómico glicosilado, el resultado esperado es (i) que su administración local previene la pérdida intrahepática del sistema; y (ii) que su administración dirigida al órgano minimizaría la pérdida del sistema
 30 en sitios de absorción sistémicos secundarios. Además de centrarse en el efecto sobre la(s) región/regiones u órgano(s) deseado(s), ambos enfoques tienen ventajas farmacológicas evidentes.

En realizaciones preferidas de la invención, se emplean liposomas marcados con fucosa para el suministro específico de compuestos terapéuticamente activos encapsulados en liposomas a poblaciones celulares que expresan determinadas lectinas CRD. Las aplicaciones específicas previstas incluyen la selección como diana
 40 terapéutica de

(i) poblaciones de células reservorio infectadas de forma crónica CRD⁺ (es decir, receptor de CTL o CTLD⁺) en enfermedades infecciosas, tales como en infecciones con virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH), virus de la hepatitis C (VHC), y *Mycobacterium tuberculosis*;
 45

(ii) células neoplásicas CRD⁺ (es decir, miembro de la familia REG⁺) tales como en cánceres del colon y el recto; y

(iii) células parenquimatosas y no parenquimatosas CRD⁺ del hígado (hepatocitos receptor de asialoglicoproteína⁺; células hepáticas no parenquimatosas receptor de manosa/fucosa⁺; y células endoteliales del seno hepático L-SIGN⁺), por ejemplo, para dirigirse a hepatocitos hiperapoptóticos en esteatohepatitis no alcohólica.
 50

Todavía, además de las lectinas de tipo C, los receptores implicados en establecer reservorios intracelulares infecciosos incluyen también lectinas distintas de CTL, tales como hNKRP1A y KLRG1. Sin embargo, como estas moléculas presentan dominios similares a lectina de tipo C (CTLD), tanto las lectinas CTL como CTLD presentan
 55 comúnmente dominios de reconocimiento de hidratos de carbono de unión a patógenos (revisado en Cambi A, Figdor CG. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:539-46). Debido a este denominador común, el mecanismo de direccionamiento dependiente de hidratos de carbono de la invención también se une a estructuras de CTLD en los receptores distintos de CTL. Como resultado, el sistema de direccionamiento de pan-CTL/CTLD de la invención tiene la capacidad para dirigirse terapéuticamente a todos los tipos de células reservorio de VIH.
 60

Los métodos y productos de la invención (es decir, complejos de lípido-agente activo dirigidos, incluyendo liposomas dirigidos), en esencia, se unen a, y entran en, células por las rutas mediadas por los receptores de CTL y CTLD de
 65 las que se aprovecha el VIH. Además, los productos de la invención son preferentemente de tamaño similar (\varnothing de aproximadamente 150 nm) al propio virus (\varnothing de aproximadamente 120 nm). No obstante, el hecho de que DC-SIGN

internalice partículas (infecciosas) en un amplio intervalo de tamaños (Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ *et al.* The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 2002; 168:2118-26; 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* 2002; 16:135-44; Cambi A, Gijzen K, de Vries JM *et al.* The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33:532-8; y 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* 2002; 277:36766-9), permite que los productos y sistemas de suministro dirigidos de la invención interfieran ampliamente con diversos agentes infecciosos que establecen reservorios intracelulares crónicos.

Un factor decisivo para la selección como diana celular satisfactoria es la densidad de membrana de las estructuras diana. Al menos en una fase de sus ciclos vitales, todas las células reservorio de patógenos que van a seleccionarse como diana expresan receptores de CTL y/o CTLD a densidades de membrana de media a alta. En el ejemplo representativo de DC-SIGN/CD209, Baribaud *et al.* han medido una expresión de superficie de al menos 1×10^5 moléculas por CDm inmadura (Baribaud F, Pöhlmann S, Leslie G, Mortari F, Doms RW. Quantitative expression and virus transmission analysis of DC-SIGN on monocyte-derived dendritic cells. *J Virol* 2002; 76:9135-42). Además, estas moléculas de selección como diana se disponen estrechamente en la membrana de la célula dentro de balsas lipídicas y/o dentro de las sinapsis (infecciosas) establecidas con células T (Arrighi JF, Pion M, Garcia E, Escola JM, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB, Piguet V. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* 2004; 200:1279-88; y Gieseler RK, Marquitan G, Hahn MJ, Perdon LA, Driessen WH, 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* 2004; 59:415-24).

Tomadas en conjunto, tales condiciones proporcionan una diana molecular cómoda, tal como se confirma en el presente documento, por las eficacias de selección como diana muy altas. Por tanto, es razonable asumir que la tecnología de unificación novedosa para seleccionar como diana reservorios intracelulares de enfermedades infecciosas presentados en el presente documento permitirá que la tecnología de la invención alcance comúnmente todos los tipos de células reservorio de VIH conocidos para una potente intervención terapéutica. Tanto los receptores de CTL como de CTLD pueden engancharse para transportar los liposomas de la invención marcados con determinados mono o polisacáridos (por ejemplo, fucosa o fucosa polimerizada) en compartimentos intracelulares que se aprovechan por otros agentes infecciosos, incluyendo diversas especies de virus, bacterias, hongos y parásitos (Cambi A, Figdor CG. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:539-46). Los métodos y productos de la invención permiten la interferencia con, y la erradicación de, VIH-1, VHC, *Mycobacterium tuberculosis*, y más. Para ello, debe suministrarse un compuesto terapéutico adecuado. En una realización de la invención, se emplea un compuesto con la capacidad para aglutinar agentes infecciosos estructuralmente intactos a través de sus azúcares de superficie característicos con los métodos y productos de la invención.

Estructuras limitadas para patógenos para la selección como diana terapéutica de reservorios intracelulares

Debido a frecuentes mutaciones en retrovirus tales como VIH y VHC (por ejemplo, Major ME, Rehmann B, Feinstone S. Hepatitis C Viruses. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds.). *Fields Virology*. 4ª ed., Vol. I. Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore; 2001: págs. 1127-62), los transcritos proteicos de tales virus son sólo dianas escasamente fiables para el suministro de compuestos a través de un sistema liposómico dirigido. Además, aunque las proteínas de la envuelta viral (o pared celular bacteriana o proteínas de membrana) reunirían los requisitos como dianas adecuadas, estas proteínas están generalmente enmascaradas por una fuerte glicosilación. Sin embargo, las estructuras y composiciones de estas ramificaciones de glicosilo de la envuelta viral (o, en el caso de bacterias, glicocálices) presentan dominios muy constantes (por ejemplo, Geyer H, Holschbach C, Hunsmann G, Schneider J. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. *J Biol Chem* 1988; 25:263:11760-7).

En cuanto a virus, y en el ejemplo del VIH, el motivo subyacente es que los aminoácidos de la molécula de gp120 de VIH se glicosilan en el retículo endoplasmático rugoso de la célula huésped y se procesan adicionalmente en el aparato de Golgi de la célula (Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985; 54:631-64). Estos procesos, por tanto, funcionan independientemente de cualquiera de las propias enzimas "descuidadas" del VIH. Tal como se describió anteriormente, un componente destacado de gp120 (como de otros azúcares de superficie virales y bacterianos) es manosa. En cambio, las ramificaciones de glicoproteína sérica o superficie celular de mamífero sólo portan rara vez manosa terminal (Weis *et al.*, *Immunol Rev* 1998; 163:19-34). En una realización de la invención, el sistema de suministro liposómico de la invención contiene o encapsula una(s) lectina(s) vegetal(es) multivalente(s) que interacciona(n) fuertemente con tales hidratos de carbono de la envuelta o el glicocálix (que, de la manera más notable, presentan residuos de manosa y fucosa). Cuando se liberan en una célula infectada, la(s) lectina(s) aglutina(n) los reservorios intracelulares de agentes infecciosos.

Específicamente, las glicoproteínas de la envuelta de VIH, gp120 y gp41, forman un complejo trimérico que media la

entrada del VIH a las células diana (Allan JS, Coligan JE, Barin F, McLane MF, Sodroski JG, Rosen CA, Haseltine WA, Lee TH, Essex M. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* 1985; 228:1091-4). Una gran fracción de la superficie accesible de gp120 en el trímero se compone de estructuras de bucle y núcleo fuertemente glicosiladas, variables que rodean las regiones de unión al receptor (Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998; 393:705-11). Aproximadamente el 50% del peso molecular de gp120 está proporcionado por azúcares, todos ellos unidos en N para anclar aminoácidos de la estructura principal peptídica de gp120 (Botos I, Wlodawer A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol*: en impresión). De hecho, la gp120 de VIH presenta las tres categorías conocidas de tipos de hidrato de carbono con unión a N con un núcleo de pentasacárido común, es decir, con alto contenido en manosa (33%), híbrido (4%) y complejo (63%) (Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985; 54:631-64).

En oligosacáridos con alto contenido en manosa, se unen de dos a seis residuos de manosa al núcleo de pentasacárido (Sanders RW, Venturi M, Schiffler L, Kalyanaraman R, Katinger H, Lloyd KO, Kwong PD, Moore JP. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* 2002; 76:7293-305). Los oligosacáridos híbridos contienen elementos de estructuras de hidratos de carbono tanto con alto contenido en manosa como complejos (Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985; 54:631-64). Los oligosacáridos complejos pueden contener L-fucosa (90%), manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetil-galactosamina, y ácidos siálicos (Rao VSR, Qasba PK, Balaji PV, Chandrasekaran R. Conformation of Carbohydrates. Harwood Academic Publishers, Países Bajos; 1998; Mizuochi T, Spellman MW, Larkin M, Solomon J, Basa LJ, Feizi T. Carbohydrate structures of the human immunodeficiency virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem J* 1988; 254:599-603; y Mizuochi T, Spellman MW, Larkin M, Solomon J, Basa LJ, Feizi T. Structural characterization by chromatographic profiling of the oligosaccharides of human immunodeficiency virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in Chinese hamster ovary cells. *Biomed Chromatogr* 1988; 2:260-70).

Las estructuras cristalinas disponibles de los oligosacáridos revelan sólo un número limitado de conformaciones para los enlaces glicosídicos (Petrescu AJ, Petrescu SM, Dwek RA, Wormald MR. A statistical analysis of N- and O-glycan linkage conformations from crystallographic data. *Glycobiology* 1999;9:343-52). Las simulaciones de dinámica molecular y los resultados de RMN sugieren que los hidratos de carbono con alto contenido en manosa ramificados, a pesar de sus enlaces glicosídicos flexibles, tienen conformaciones globales bien definidas (Woods RJ, Pathiaseril A, Wormald MR, Edge CJ, Dwek RA. The high degree of internal flexibility observed for an oligomannose oligosaccharide does not alter the overall topology of the molecule. *Eur J Biochem* 1998; 258:372-86). Parece que esta orientación de oligosacárido limitada es funcionalmente importante en la interacción con lectinas de unión a azúcar. Por ejemplo, las interacciones secundarias entre lectina-hidrato de carbono pueden potenciarse por el espacio conformacional reducido disponible, y la penalización entrópica reducida creada, mediante las interacciones primarias entre lectina-hidrato de carbono. Es probable que estén implicados mecanismos similares en interacciones multivalentes entre lectina-hidrato de carbono (Ng KK, Kolatkar AR, Park-Snyder S, Feinberg H, Clark DA, Drickamer K, Weis WI. Orientation of bound ligands in mannose-binding proteins. Implications for multivalent ligand recognition. *J Biol Chem* 2002; 277:16088-95).

Con sus altos contenidos de manosa y fucosa, y su fuerte interacción con lectina debido a la libertad conformacional limitada para los residuos de manosa, los agentes infecciosos tales como VIH son muy adecuados para la unión a receptores de CTLD y lectinas exocelulares de tipo C. En efecto, como las células habitualmente no unen a estos azúcares a sus propias glicoproteínas secretoras, se plantea la hipótesis de que las células, en el caso de que se infecten por virus, específicamente unen tales sacáridos, de modo que permiten que otras células reconozcan, se unan e ingieran sucesivamente el agente infeccioso liberado por lectinas de tipo C para su aclaramiento consecutivo. Aunque, para agentes infecciosos que forman reservorios intracelulares, sus recubrimientos de hidrato de carbono altamente conservados garantizan su ruta mediada por CTL/CTL D de formación de reservorio. Al mismo tiempo, estas características provocan su talón de Aquiles: las moléculas tales como gp120 de VIH presentan ampliamente características de hidrato de carbono perfectamente adecuadas para la interferencia con la lectina terapéutica.

55 Agentes/compuestos terapéuticamente activos

En cuanto a la invención descrita en el presente documento, pueden introducirse específicamente compuestos terapéuticamente activos en poblaciones celulares de interés mediante suministro liposómico dirigido.

60 Lectinas vegetales como agentes para la interferencia terapéutica con patógenos intracelulares

Las lectinas se han usado en una variedad de nuevas aplicaciones médicas tales como, por ejemplo, en el desarrollo de enfoques novedosos para la terapia de cánceres (revisado en de Mejia EG, Bradford T, Hasler C. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. *Nutr Rev* 2003; 61:239-46. Errata en: *Nutr Rev* 2003; 61:293). De manera similar, se ha reconocido que una amplia gama de lectinas que se sabe que se unen a hidratos de carbono con alto contenido en manosa en la proteína de la envuelta del VIH, gp120, proporcionan una posible

nueva forma para controlar la infección por VIH (revisado en Botos I, Wlodawer A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol*: en impresión). Se aplica el mismo fundamento a muchos otros agentes infecciosos (revisado en Cambi A, Figdor CG. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:539-46). Las lectinas pueden clasificarse según su mecanismo específico de interacción con hidratos de carbono, su origen, u otros criterios. En cuanto a su origen, las lectinas de unión con alto contenido en manosa pueden proceder de plantas (Con-A, MHL, UDA, jacalina, GNA, SCL, NPA, etc.), animales (DC-SIGN, MBL, etc.), o de algas verde-azuladas (cianovirina N, escitovirina, etc.) (Botos I, Wlodawer A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol*: en impresión). Generalmente, todas las lectinas se unen a sacáridos mediante enlaces de H, contactos polares e interacciones de vander-Waals. Sin embargo, al igual que las lectinas animales/humanas, las lectinas vegetales se unen a hidratos de carbono con diferentes especificidades y preferencias de unión (Drickamer K. Multiplicity of lectin-carbohydrate interactions. *Nature Struct Biol* 1995; 2:437-9).

En una realización preferida de la invención, se eligieron lectinas vegetales para incorporarse en el sistema de suministro liposómico dirigido de la invención. Algunas lectinas vegetales actúan como mitógenos cuando se administran de manera sistémica/extracelular a seres humanos o animales. En estos casos, las lectinas inducen la proliferación de células diferenciadas acoplándose a receptores exocelulares, activando por tanto sus cascadas de transducción de señales. Algunas lectinas que muestran múltiples sitios de unión a azúcar, cuando se administran de manera sistémica/extracelular, aglutinan determinadas poblaciones celulares (por ejemplo, eritrocitos) que, de nuevo, está mediado a través del acoplamiento de la lectina con receptores exocelulares. En este caso, las lectinas reticular (aglutinan) varias células. Determinadas lectinas presentan ambas características (Wimer BM, Mann PL. Mitogen Information Summarizes. *Cancer Biother Radiopharmaceut* 2002; 17).

Ninguno de estos efectos es aceptable cuando se considera una aplicación terapéutica de lectinas. Sin embargo, cuando se encapsulan dentro de un sistema de suministro liposómico, las lectinas (o versiones truncadas de las mismas) no están expuestas al medio exterior y sólo se liberan de manera intracelular. Por consiguiente, pueden prevenirse los efectos secundarios sistémicos desfavorables de algunas lectinas (a pesar de sus potenciales terapéuticos más valiosos) empleando sistemas de suministro dirigidos. Además, el sistema de suministro previsto en el contexto de la invención se destina para la aplicación tópica (por ejemplo, subcutánea) o dirigida a órgano (por ejemplo, mediante la infusión en la arteria hepática) para seleccionar como diana selectivamente poblaciones celulares específicas dentro de una ubicación u órgano dado. Como resultado, las concentraciones de lectina para lograr el/los efecto(s) deseado(s) están bastante por debajo de las necesarias tras la administración sistémica. Además, terapéuticamente, se suministrará una lectina de este tipo con el fin de aglutinar un agente infeccioso dentro de la célula seleccionada como diana. La primera ventaja de esta estrategia es enmascarar de manera irreversible las moléculas de superficie de los patógenos de modo que se incapaciten funcionalmente los sitios de unión preinfecciosos del agente. La segunda ventaja, debido a los múltiples sitios de unión a lectina, es la creación de grandes complejos unidos para la degradación enzimática fagolisosómica tanto del agente como de la lectina. Las células seleccionadas como diana podrían destruirse en el transcurso de este proceso. Por ejemplo, se sabe que se induce a veces apoptosis en respuesta al acoplamiento del receptor (por ejemplo, Coutinho-Silva R, Persechini PM, Da Cunha Bisaggio R, Perfettini J-L, Torres De Sa Neto AC, Kanellopoulos JM, Motta-Ly I, Dautry-Varsat A, Ojcius DM. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol* 276 [Cell Physiol] 45: 1999:C1139-47; y Woltman AM, van der Kooij SW, Coffey PJ, Offringa R, Daha MR, van Kooten C. Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. *Blood* 2003; 101:1439-45). Sin embargo, incluso en tales casos, las concentraciones sistémicas totales de lectina residual tras la fuga serán algunos órdenes de magnitud menores que los puntos óptimos de actividad de la lectina libre para efectuar la aglutinación y/o mitogénesis celular.

Descripción específica de lectinas seleccionadas

50 *Concanavalina A (Con-A)*: Con-A, derivada de la judía de puerco *Canavalia ensiformis*, es un miembro bien caracterizado de una familia más grande de lectinas vegetales (revisado en Sharon N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends Biochem Sci* 1993; 18:221-6; Parkin S, Rupp B, Hope HK. Atomic Resolution Structure of Concanavalin A at 120 K. *Acta Cryst* 1996; D52, 1161-8; Blakeley MP, Kalb (Gilboa) AJ, Helliwell JR, Miles DAA. The 15-K neutron structures of saccharide-free concanavalin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:16405-10; y Harrop SJ, Helliwell JR, Wan TCM, Kalb (Gilboa) AJ, Tong L, Yariv J. Structure solution of a cubic crystal of concanavalin A complexed with methyl α -D-glucopyranoside *Acta Cryst* 1996; D52:143-55).

Con-A se une a manosa y es la más específica para núcleos de α -Man-(1-3)-[α -Man-(1-6)]-Man de oligosacáridos con unión a N (Mandal DK, Kishore N, Brewer CF. Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions. Titration microcalorimetry measurements of the binding of N-linked carbohydrates and ovalbumin to concanavalin A. *Biochemistry* 1994; 33:1149-56). Con-A ha demostrado que aglutina de manera potente el VIH (por ejemplo, Hayakawa T, Kawamura M, Okamoto M, Baba M, Niikawa T, Takehara S, Serizawa T, Akashi M. Concanavalin A-immobilized polystyrene nanospheres capture HIV-1 virions and gp120: potential approach towards prevention of viral transmission. *J Med Virol* 1998; 56:327-31). Además, por encima de pH 6,5, Con-A existe como un tetrámero (Yariv J, Kalb AJ, Levitzki A. The interaction of concanavalin A with methyl alpha-D-glucopyranoside. *Biochim Biophys Acta* 1968; 165:303-5), y cada monómero de 25-kDa está dotado de un sitio de unión a azúcar (Kalb AJ,

- Levitzki A. Metal-binding sites of concanavalin A and their role in the binding of α -methyl D-glucopyranoside. *Biochem J* 1968; 109:669-72). La lectina, por tanto, puede reticular (aglutinar) VIH. Una ventaja adicional en cuanto a la aplicación descrita en el presente documento es que la topología de la Con-A de 237 residuos se ve principalmente inalterada en todas las estructuras cristalinas nativas y con ligandos, lo que implica que la unión de
- 5 azúcar no supone cambios conformacionales significativos (Reeke Jr GN, Becker JW, Edelman GM. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. IV. Atomic coordinates, hydrogen bonding, and quaternary structure. *J Biol Chem* 19.75; 250:1525-47).
- Doś sitios de unión a metal adicionales por comonomero de Con-A capturan un ión de metal de transición y un ión
- 10 Ca^{2+} (Kalb AJ, Levitzki A. Metal-binding sites of concanavalin A and their role in the binding of alpha-methyl D-glucopyranoside. *Biochem J* 1968; 109:669-72). De manera importante, a bajos valores de pH, Con-A libera estos metales y pierde su capacidad de unión a azúcar. Sin embargo, la adición de los metales perdidos restaura la unión a azúcar (Yariv J, Kalb AJ, Levitzki A. The interaction of concanavalin A with methyl alpha-D-glucopyranoside. *Biochim Biophys Acta* 1968; 165:303-5). Se ha mostrado que la presencia de Ca^{2+} es crítica, porque interacciona
- 15 con una molécula de H_2O , que se cree que estabiliza el enlace peptídico *cis* Ala₂₀₇-Asp₂₀₈ de Con-A (Naismith JH, Emmerich C, Habash J, Harrop SJ, Helliwell JR, Hunter WN, Raftery J, Kalb AJ, Yariv J. Refined structure of concanavalin a complexed with methyl α -D-Mannopyranoside at 2.0 Å resolution and comparison with the saccharide-free structure. *Acta Crystallogr (D)* 1994; 50:847-58). En cambio, en ausencia del Ca^{2+} , este enlace peptídico experimenta isomerización *cis-trans*, que va seguida por una expansión del bucle de unión a azúcar Leu₉₉-
- 20 Tyr₁₀₀ y da como resultado la pérdida de la capacidad del bucle para capturar moléculas de sacárido (Bouckaert J, Loris R, Poortmans F, Wyns L. Crystallographic structure of metal -free concanavalin A at 2.5 Å resolution. *Proteins* 1995; 23:510-24; y Reeke Jr GN, Becker JW, Edelman GM. Changes in the three-dimensional structure of concanavalin A upon demetallization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75:2286-90).
- 25 En una realización preferida de la invención, Con-A está contenida o encapsulada dentro del sistema de suministro liposómico dirigido para permitir la aglutinación de VIH almacenado de manera intraendosómica. Las condiciones de bajo pH intraendosómico requieren que el sistema de suministro liposómico dirigido coencapsule Ca^{2+} e iones de metales de transición con la lectina para garantizar que retiene su capacidad de unión a azúcar.
- 30 *Lectinas de Myrianthus holstii* (MHL): las raíces de la planta africana *Myrianthus holstii* Pal., Urticaceae, contienen una lectina de 9284 Da. La lectina de *Myrianthus holstii* (MHL o miriantina; otros nombres: omufe; mafwisa; mswisya; mswiza) (Instituto Nacional del Cáncer [NCI], Centro para la Investigación del Cáncer, EE.UU. *Lectina de Myrianthus holstii*. <http://home.ncifcif.gov/mtdp/compounds/714343.html>) muestra una potente actividad anti-VIH. La MHL contiene 16 residuos de cisteínas con uniones disulfuro. El análisis de secuencia asignó satisfactoriamente 79
- 35 residuos de aminoácido de 88, sugiriendo la presencia de múltiples isoformas que difieren en sus estructuras primarias en las posiciones 52, 66 y 69 (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 proteins from the plant *Myrianthus holstii*. *J Nat Prod* 2000; 63:1170-4; y revisado en Botos I, Wlodawer A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol*: en impresión). Se protegieron células CEM-SS mediante MHL de los efectos citopáticos de la cepa de laboratorio HIV-1RF. La concentración eficaz para un 50% de
- 40 protección celular (valor de CE_{50}) era de 1,4 $\mu\text{g/ml}$ (150 nM). MHL no demostró ser tóxico para las células diana ni siquiera a la mayor concentración sometida a prueba de 250 mg/ml (es decir, dos órdenes de magnitud por encima de la CE_{50}). Los enlaces disulfuro aparentemente son estructuralmente importantes para la integridad funcional, ya que se perdió la actividad anti-VIH tras su escisión reductora (Balzarín J, Schols D, Hosoya M, Van Damme E, Peumans W, De Clercq E. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral Res* 1992; 18:191-207).
- MHL inhibe reversiblemente la infección por VIH de células huésped y, por tanto, es necesario que esté presente de
- 50 manera continua para una actividad completa (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* 2000; 63:1170-4). Como MHL puede unir gp120 simultáneamente con CD4 soluble, parece que MHL y CD4 unen gp120 alostéricamente. A partir de una serie de
- 55 azúcares sometidos a prueba, sólo GlcNAc interfiere con la unión a MHL-gp120. Una vez unido a GlcNAc, MHL no puede unir gp120, lo que implica que MHL interacciona con restos de hidrato de carbono de gp120. La lectina no aglutina eritrocitos 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* 2000; 63:1170-4). No se ha sometido a prueba la mitogenicidad.
- 60 En una realización de la invención, MHL está contenida o encapsulada dentro del sistema de suministro liposómico dirigido. Sin embargo, MHL no está caracterizada tan extensamente como Con-A y no muestra una alta especificidad de Con-A para núcleos de α -Man-(1-3)-[α -Man-(1-6)]-Man de oligosacáridos con unión a N. Además, MHL inhibe el VIH de manera reversible. Finalmente, MHL existe como monómero. La síntesis de variantes di o multiméricas de MHL que pueden aglutinar irreversiblemente también puede prepararse y emplearse. MHL también
- 65 puede emplearse en sistemas de suministro dirigido, que se dirigen a reservorios formados por otros agentes infecciosos.

Condiciones adicionales

5 *Probabilidad para una aglutinación de patógenos satisfactoria:* resulta imperativo que las lectinas suministradas de manera endosómica puedan difundir eficazmente hasta su diana patógena para una aglutinación satisfactoria. En cuanto a las condiciones fisicoquímicas que determinan si esto puede conseguirse, el modelo matemático de Kuthan para la ubicación de dianas individuales en compartimentos subcelulares proporciona una base. Procediendo a partir del movimiento browniano no desviado (es decir, libre de deriva) sencillo de las macromoléculas (tales como lectinas) buscando aleatoriamente un único o unos pocos sitios diana (tales como virus), desarrolló un modelo de paseo y captura (*walk-and-capture*) para paseos aleatorios de macromoléculas individuales en compartimentos esféricos (tales como endosomas) (Kuthan H. A Mathematical model of single target site location by Brownian movement in subcellular compartments. *J Theor Biol* 2003; 221:79-87); este modelo se basó en el modelo de paseo y captura sencillo desarrollado por primera vez por Adam y Delbrück, y luego complementado por otros (Adam G, Delbrück M. Reduction of Dimensionality in Biological Diffusion Processes. En: *Structural Chemistry and Molecular Biology*. Rich A, Davidson N, eds. Nueva York: Freeman & Co; 1968:198-215; Berg HC, Purcell EM. Physics of chemoreception. *Biophys J* 1977; 20:193-219; y Szabo A, Schulten K, Schulten Z. First passage time approach to diffusion controlled reactions. *J Chem Phys* 1980; 72:4350-7). Específicamente, se aplicó la solución analítica de forma cerrada de la función de densidad de probabilidad de tiempos de primer paso (FPT, *first-passage-time*) exacta y aproximada. Tal como se determinó en el ejemplo de un cuerpo de Cajal intranuclear pequeño (\varnothing de 0,1-1,0 μm , que está perfectamente en el intervalo de un endosoma [Dundr M, Misteli T. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 2001; 356:297-310]), una molécula de proteína de difusión individual, con una constante de difusión eficaz de $D = 0,5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (fijada deliberadamente baja) se encontraría con una proteína diana de tamaño medio (\varnothing de 5 nm) en el plazo de 1 segundo con una probabilidad de casi certeza de $p = 0,98$ (Kuthan H. A Mathematical model of single target site location by Brownian movement in subcellular compartments. *J Theor Biol* 2003; 221:79-87). Dado que estas consideraciones también se aplican a lectinas suministradas de manera endosómica, se espera la aglutinación más rápida y completa de todos los patógenos diana en cuanto a esta aplicación de la invención descrita en el presente documento.

30 *Condiciones para la degradación de reservorios intracelulares de patógenos:* representativas para los demás receptores de CTL, las condiciones moleculares y fisicoquímicas generales que conduce a la formación de reservorio, y por tanto que se encuentran por una lectina vegetal terapéutica, se proporcionan en el ejemplo ampliamente investigado de DC-SIGN. Generalmente, el sistema endosómico/lisosómico altamente dinámico de las células de mamífero comprende, físicamente, lisosomas, endosomas tempranos, de recirculación y tardíos y el aparato de Golgi tardío. Este sistema permite el transporte de membrana para la clasificación y segregación de receptores y ligandos de (i) la membrana plasmática y (ii) el aparato de Golgi tardío. Las moléculas transportadas desde la superficie de la célula hasta endosomas se internalizan mediante endocitosis mediada por receptor a través de cavidades recubiertas con clatrina (Teasdale RD, Loci D, Houghton F, Karlsson L, Gleeson PA. A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. *Biochem J* 2001; 358:7-16).

40 Aunque los ligandos unidos a DC-SIGN generalmente se internalizan para el procesamiento en compartimentos de degradación, el VIH se protege sin degradarse (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* 2002; 16:135-144). No está claro en la actualidad cómo escapan los viriones de VIH intactos a este mecanismo normal. Sin embargo, se sabe que, en CDm maduras, DC-SIGN se dirige a compartimentos endosómicos tempranos en los que se protege el VIH frente a la degradación (Engering A, *et al.* The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 2002; 168:2118-2126), lo que sugiere que la maduración de CDm, tal como se induce por VIH, puede conducir a su internalización alterada. Con el fin de transmitir el virus a células T, los viriones internalizados por DC-SIGN se recirculan de vuelta a la superficie celular para entrar en contacto con receptores de entrada (CD4, CCR5, CXCR4) en la célula diana (Geijtenbeek TBH, *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100:587-597). Las demás lectinas de tipo C BDCA-2 y DEC-205 también suministran antígenos a lisosomas o endosomas tardíos. Además, el receptor de manosa (CD206) suministra antígeno (o VIH) a endosomas tempranos y lo recircula directamente de vuelta a la superficie (Cambi A, Figdor CG. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:539-46).

55 Específicamente, tanto tras la unión de un ligando como en el transcurso de la recirculación de membrana y la captación rutinarias, DC-SIGN se internaliza por medio de sus dos supuestos motivos de internalización basados en di-leucina (LL) y tirosina (YSQL) (Rapoport I, Chen YC, Cupers P, Shoelson SE, Kirchhausen T. Dileucine-based sorting signals bind to the β chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J* 1998; 17:2148-55; y Trowbridge ES. Endocytosis and signals for internalization. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3:634-41). DC-SIGN se internaliza en compartimentos lisosómicos y endosómicos tempranos de bajo pH (6,0-6,8) (Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguët V, van Kooyk Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 2002; 168:2118-26). En efecto, tales condiciones de bajo pH parecen ser un requisito previo para una infección de células T facilitada por DC-SIGN satisfactoria en *trans* desde el reservorio intracelular (Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR. (2002). DC-SIGN mediated internalization

of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16:135-44). La internalización de VIH por DC-SIGN en un compartimento intracelular de bajo pH de CDm parece por tanto ser crítico para el papel infeccioso crónico del reservorio. Finalmente, resulta concebible que DC-SIGN permanezca unida a VIH mientras se almacena en este reservorio como, por ejemplo, es también el caso para transferrina y su receptor mientras atraviesa el sistema endosómico/lisosómico antes de su recirculación de vuelta a la superficie (Ciechanover A, Schwartz AL, Lodish HF. Sorting and recycling of cell surface receptors and endocytosed ligands: the asialoglycoprotein and transferrin receptors. *J Cell Biochem* 23; 1982:107-30).

Se mostró que las neo-glicoproteínas y los monosacáridos que interaccionan con receptores de manosa/fucosa estimulan la secreción de enzimas lisosómicas de modo dependiente de la dosis y el tiempo. Aunque combinaciones de azúcares (de la manera más eficaz, L-fucosa o manosa) y proteínas estimulan la secreción de enzimas lisosómicas de manera más potente que los azúcares solos, se logra el mismo efecto en ambas condiciones. El hecho de que la secreción de enzimas lisosómicas se limite a varias horas tras la incubación indica que el propio receptor [nota: tal como un receptor de CTL o CTLD] participa en el proceso. De manera importante, el hecho de que el bloqueo de la síntesis de proteínas por cicloheximida no inhibe la secreción de enzimas demostró que no se requiere la síntesis de enzimas *de-novo* (Ohsumi Y, Lee YC. Mannose-receptor ligands stimulate secretion of lysosomal enzymes from rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1987; 262:7955-62). Esto implica que las enzimas catabólicas se liberan desde reservas lisosómicas formadas previamente. En cuanto a la invención, es importante además observar que la internalización del/de los agente(s) estimulante(s) [nota: el sistema de suministro de compuestos dirigido] es esencial, ya que la unión temporal de un agente de este tipo a la superficie celular sola no puede provocar la secreción de enzimas lisosómicas (Ohsumi Y, Lee YC. Mannose-receptor ligands stimulate secretion of lysosomal enzymes from rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1987; 262:7955-62). Esto se permite por el sistema de direccionamiento de la invención. De la manera más intrigante, la secreción de enzimas lisosómicas se induce en un grado similar tanto en presencia de un ligando no degradable como de un ligando degradable (Ohsumi Y, Lee YC. Mannose-receptor ligands stimulate secretion of lysosomal enzymes from rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1987; 262:7955-62). En cuanto a la invención presentada en el presente documento, los agentes infecciosos formadores de reservorios de patógenos, potencialmente unidos a receptores tales como DC-SIGN, y las lectinas aglutinantes pueden degradarse enzimáticamente en fagolisosomas formados tras la fusión de sitios reservorio endosómicos seleccionados como diana con lisosomas que contienen conjuntos de enzimas de digestión de patógenos.

Reservorios intracelulares de patógenos distintos de VIH

Tal como se menciona repetidamente, diversos virus, bacterias y parásitos patógenos además del VIH-1 forman reservorios infecciosos crónicos intracelulares. Cuando se limitan a patógenos humanos, éstos incluyen especies notorias tales como VIH-2, virus de la hepatitis C (VHC), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB), Ébola, *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium*, y *Leishmania amastigotes* (Cambi A, Figdor CG. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:539-46; Kaufmann SHE, Schaible UE. A Dangerous liaison between two major killers: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV target dendritic cells through DC-SIGN. *J Exp Med* 2003; 197:1-5; Baribaud F, Pöhlmann S, Doms RW. The role of DESIGN and DC-SIGNR in HIV and SIV attachment, infection, and transmission. *Virology* 2001; 286:1-6; Pöhlmann S, Baribaud F, Lee B, Leslie GJ, Sanchez MD, Hiebenthal-Millow K, Munch J, Kirchhoff F, Doms RW. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 2001; 75:4664-72; Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular- entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* 2002; 76:6841-4; y Colmenares M, Puig-Kroger A, Muniz Pello O, Corbi AL, Rivas L. Dendritic-cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human dendritic cells, is a receptor for *Leishmania amastigotes*. *J Biol Chem* 2002; 277:16161-16166).

Desde el punto de vista epidemiológico, dos de estas especies son los agentes causantes de dos de las principales enfermedades infecciosas a escala global. Uno de ellas, *M. tuberculosis* puede aparecer en pacientes con la coinfección problemática con VIH (Schluger NW, Burzynski J. Tuberculosis and HIV infection: epidemiology, immunology, and treatment. *HIV Clin Trials* 2001; 2:356-65; y Kaufmann SHE, Schaible UE. A Dangerous liaison between two major killers: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV target dendritic cells through DC-SIGN. *J Exp Med* 2003; 197:1-5) o sola y es la infección bacteriana más extendida (Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet* 2003; 362:887-99; Corbett EL, Watt CJ, Walker N *et al.* The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 2003; 163:1009-21; y van Lettow M, Fawzi WW, Semba RD. Triple trouble: the role of malnutrition in tuberculosis and human immunodeficiency virus co-infection. *Nutr Rev* 2003; 61:81-90). La otra, VHC, se considera la infección viral más extendida en el mundo (Ray Kim W. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes Infect* 2002; 4:1219-25; Cheung RC, Hanson AK, Maganti K, Keeffe EB, Matsui SM. Viral hepatitis and other infectious diseases in a homeless population. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34:476-80; y Borgia G, Reynaud L, Gentile I, Piazza M. HIV and hepatitis C virus: facts and controversies. *Infection* 2003; 31:232-40). Estas enfermedades, por tanto, son dianas primarias urgentes del sistema terapéutico de la invención.

Para ello, se sabe que la formación de reservorios intracelulares por *M. tuberculosis* y otras miobacterias, de nuevo, está medida por receptores de lectina de tipo C (Maeda N, Nigou J, Herrmann JL *et al.* The cell surface receptor

DESIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem* 2003; 278:5513-6; Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ *et al.* Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *Exp Med.* 2003; 197:7-17; y Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL *et al.* DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med.* 2003; 197:121-7). Se aplica lo mismo al VHC (Pöhlmann S, Zhang J, Baribaud F *et al.* Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003; 77:4070-80; Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A *et al.* DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003; 278:20358-66; y Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR *et al.* L-SIGN (CD209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4498-503). Por tanto, los mecanismos de captación para ambos agentes infecciosos proporcionan el requisito previo esencial para seleccionar como diana sus reservorios celulares con el sistema de la invención descrito en el presente documento.

En cuanto al compuesto terapéutico que va a suministrarse, una gama de lectinas vegetales, incluyendo Con-A, MHL, y otras también se unen a/aglutinan, y por tanto tienen la capacidad para inactivar/erradicar estos patógenos (tal como se revisa en Wimer BM, Mann PL. Mitogen Information Summaries. *Cancer Biother Radiopharmaceut* 2002; 17-64; y Botos I, Wlodawer A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog Biophys Mol Biol*: en impresión). La invención dada a conocer en el presente documento emplea un sistema de selección como diana específica de células dependientes de fucosa o polifucosa que suministra una lectina vegetal en una(s) población/poblaciones celular(es), o subconjunto(s) de la(s) misma(s), de un huésped humano o animal, en el que la(s) población/poblaciones celular(es) son reservorios para patógenos/agentes infecciosos.

Además, para permitir sucesivamente la completa degradación del agente infeccioso dentro de un(os) compartimento(s) seleccionado(s) como diana de la célula (por ejemplo, un endosoma), el sistema dirigido puede, junto con una(s) lectina(s) dada(s), coencapsular una(s) enzima(s) degradativa(s) (por ejemplo, manosidasa y/o *N*-acetilglucosaminidasa), y/o un(os) cofactor(es) esencial(es) para la integridad funcional de la(s) lectina(s) y/o la(s) enzima(s) (por ejemplo, iones metálicos o coenzimas), de modo que (i) hagan que el agente no sea infeccioso eliminando sus hidratos de carbono de superficie, y que (ii) hagan su interior accesible para, por ejemplo, las propias enzimas (fago)lisosómicas de la célula seleccionada como diana para la completa degradación de los componentes integrales infecciosos, genómicos y estructurales del patógeno.

Enfermedades no infecciosas crónicas: cánceres del colon y el recto

Aparte de enfermedades infecciosas, la selección como diana del receptor de CTL también puede permitir ocuparse eficazmente de manera terapéutica de determinadas enfermedades no infecciosas crónicas. Un ejemplo destacado son los cánceres del colon y el recto. En cuanto a las lectinas CRD de la familia REG expresadas en tejidos y órganos hepatogastroenterológicos, sus 17 miembros actualmente clonados y secuenciados de la familia pueden ofrecer nuevas opciones para tratamientos novedosos. Esto se debe al hecho de que los elementos de la familia REG, como los receptores regionales de CTL, están implicados en carcinogénesis, diabetes, inflamación y lesión (revisado en Zhang YW, Ding LS, Lai MD. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol.* Diciembre de 2003; 9(12):2635-41). Como resultado, se ha sugerido que el papel de algunos de estos receptores en la carcinogénesis los hace que sean moléculas candidatas prometedoras como (i) nuevos indicadores de pronóstico de la supervivencia tumoral; (ii) biomarcadores tempranos de la carcinogénesis; y (iii) matrices moleculares para el diseño de agentes quimioterápicos novedosos (revisado en Zhang YW, Ding LS, Lai MD. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2635-41).

La invención puede complementar y ampliar estas sugerencias previas. Específicamente, el tratar miembros de la familia REG en un contexto hepatogastroenterológico mediante la aplicación tópica del sistema de direccionamiento de la invención puede proporcionar el suministro de compuestos/fármacos terapéuticos de una manera altamente específica del sitio. En principio, un enfoque de este tipo puede permitir la interferencia con cualquiera de las dolencias mencionadas anteriormente. Sin embargo, la aplicación que posiblemente constituye un mayor reto se refiere a cánceres del colon y el recto. Desde 2003, en todos los países industrializados occidentales, tales como los Estados Unidos y Alemania, tales cánceres han sido la segunda causa más común de muertes debidas a cáncer en ambos sexos (Bruckner HW. Adenocarcinoma of the Colon and Rectum. En: Frei E, Holland JF (eds.) *Cancer-Medicine*. 5ª ed. Capítulo 103. BC Decker; Hamilton, Londres 2000: págs. 1472-520; Jacobi V, Thalhammer A, Straub R, Vogl T.J. Importance of coloncontrast enema. *Radiologe* 2003; 43:113-21). Parece poco probable en la actualidad que esta situación cambie considerablemente a menos que lleguen a estar disponibles opciones de tratamiento más prometedoras (World Health Organization Mediacentre. Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020. Se accedió el 8 de agosto de 2003. Disponible de: <http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr27/en/>).

Los sistemas de la invención pueden, a través de la selección como diana de miembros de la familia REG expresados preferentemente en los diferentes cánceres del colon y el recto, ocuparse de estos tumores malignos de manera mucho más selectiva de lo que es factible actualmente. Además, la selectividad puede aumentarse adicionalmente aplicando este sistema de suministro de compuestos dirigido a través de métodos dirigidos a órganos establecidos, tales como, por ejemplo, su infusión directa en la arteria hepática (Kemeny MM, Alava G, Oliver JM. The effects on liver metastases of circadian patterned continuous hepatic artery infusion of FUDR. *HPB*

Surg 1994; 7:219-24). Además, el sistema de direccionamiento de la invención puede suministrar específicamente fármacos quimioterápicos ya aprobados por la FDA, tales como 5-fluorouracilo, ácido folínico, oxaliplatino y FUDR a células cancerosas ubicadas en el hígado y/o los intestinos (Levi F, Misset J-L, Brienza S, Adam R, Metzger G, Itzakhi M, Caussanel JP, Kunstlinger F, Lecouturier S, Descorps-Declère A, Jasmin C, Bismuth H, Reinberg A. A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump: high antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer. *Cancer (Phila.)* 1992; 69: 893-900; Kemeny MM, Alava G, Oliver JM. The effects on liver metastases of circadian patterned continuous hepatic artery infusion of FUDR. *HPB Surg* 1994; 7:219-24). Finalmente, pueden emplearse regímenes de tratamiento cronofarmacológicos para tales aplicaciones; incluso cuando se emplean agentes quimioterápicos no dirigidos, estudios clínicos han revelado una clara ventaja de los protocolos de tratamiento circadiano (Hrushesky WJ. *Cancer chronotherapy: a drug delivery challenge. Prog Clin Biol Res* 1990; 341A:1-10; Levi F, Misset J-L, Brienza S, Adam R, Metzger G, Itzakhi M, Caussanel JP, Kunstlinger F, Lecouturier S, Descorps-Declère A, Jasmin C, Bismuth H, Reinberg A. A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump: high antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer. *Cancer (Phila.)* 1992; 69:893-900; Kemeny MM, Alava G, Oliver JM. The effects on liver metastases of circadian patterned continuous hepatic artery infusion of FUDR. *HPB Surg* 1994; 7:219-24; Adler S, Lang S, Langenmayer I, Eibl-Eibesfeldt B, Rump W, Emmerich B, Hallek M. Chronotherapy with 5-fluorouracil and folinic acid in advanced colorectal carcinoma. Results of a chronopharmacologic phase I trial. *Cancer* 1994; 73:2905-12; y Mormont MC, Levi F. *Cancer chronotherapy: principles, applications, and perspectives. Cancer* 2003; 97:155-69). Como resultado, empleando el sistema de suministro dirigido junto con fármacos ya aprobados y enfoques establecidos para reducir los efectos secundarios farmacológicos, puede lograrse un progreso en el tratamiento de cánceres del colon y el recto.

Enfermedades no infecciosas crónicas: Esteatohepatitis no alcohólica

Otro ejemplo para una enfermedad no infecciosa crónica a la que puede aplicarse la tecnología de la invención, es la enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD). La NAFLD es la enfermedad hepática más común en países desarrollados, que puede suponer cirrosis, insuficiencia hepática aguda o crónica y cáncer hepático. Una subentidad avanzada de la NAFLD es la denominada esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221-31). Numerosos estudios han explorado diversas estrategias de tratamiento para la NASH, aunque sin ningún beneficio convincente. En efecto, desde la primera descripción de NASH por Ludwig *et al.* (Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55:434-38), no hay disponible ninguna terapia eficaz. Por tanto, el entendimiento avanzado sobre el/los patomecanismo(s) real(es) podría ayudar ahora, por primera vez, a diseñar opciones terapéuticas verdaderamente eficaces. Específicamente, un conjunto creciente de evidencias sugiere que la apoptosis de hepatocitos aumentada de manera patológica puede ser el mecanismo patogénico más crítico que contribuye a inflamación y fibrogénesis del hígado y, por tanto, subyacente a la progresión hacia esteatohepatitis (Canbay A, Higuchi H, Bronk SF *et al.* Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002; 123:1323-30; Jaeschke H. Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. *Hepatology* 2002; 35:964-6; Canbay A, Gucciardi ME, Higuchi H *et al.* Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *J Clin Invest* 2003; 112:152-9). Por tanto, puesto que tanto la inflamación como la fibrosis realmente son características destacadas de NASH, puede plantearse la hipótesis de manera razonable de que la apoptosis intrahepática sin control desempeña un papel clave en la progresión de NAFLD hacia NASH (Feldstein AE, Canbay A, Angulo P *et al.* Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125:437-43).

Específicamente, pueden exponerse argumentos convincentes para un beneficio terapéutico potencialmente alto de inhibición de la apoptosis de hepatocitos en estos pacientes. Una estrategia de este tipo obviamente podría prevenir la inflamación hepática, la fibrosis, y sus secuelas. Para este fin, actualmente se están desarrollando inhibidores de caspasas (es decir, enzimas clave de las dos cascadas apoptóticas principales) para su uso clínico. En el modelo de ratón con conducto biliar ligado de colestasis, el inhibidor de pan-caspasa, IDN-6556, ya ha demostrado beneficios como agente antifibrótico (Canbay A, Feldstein A, Baskin-Bey E *et al.* The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308:1191-6). Asimismo, el tratamiento de pacientes positivos para VHC con este inhibidor reduce significativamente el valor patológico de los parámetros hepáticos (por ejemplo, ALT) y, por tanto, la lesión hepática (Valentino KL, Gutierrez M, Sanchez R *et al.* First clinical trial of a novel caspase inhibitor: anti-apoptotic caspase inhibitor, IDN-6556, improves liver enzymes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41:441-9). Sin embargo, Eichhorst *et al.* han presentado recientemente un nuevo enfoque en el que han aplicado suramina, un fármaco ya aprobado por la FDA, para inhibir la apoptosis en un modelo de ratón de lesión hepática (Gucciardi ME, Gores GJ. Cheating death in the liver. *Nat Med* 2004; 10:587-588; Eichhorst ST, Krueger A, Muerkoster S *et al.* Suramin inhibits death receptor-induced apoptosis *in vitro* and fulminant apoptotic liver damage in mice. *Nat Med* 2004; 10:602-9). Este hallazgo puede allanar el terreno para las primeras terapias con base racional para pacientes que padecen las enfermedades hepáticas crónicas NAFLD/NASH. Recientemente se ha sugerido el diseño de opciones de tratamiento novedosas dirigidas contra la apoptosis de células hepáticas (Canbay C, Gieseler RK, Gores GJ, Gerken G. The relationship between apoptosis and non-alcoholic fatty liver disease: an evolutionary cornerstone turned pathogenic. *Z Gastroenterol* 2005; 43:211-7). Como advertencia, el empleo terapéutico a largo plazo y sistémico de fármacos anti-apoptóticos puede promover

potencialmente trastornos hiperproliferativos o incluso el desarrollo de determinados tipos de cánceres y/o linfomas. Sin embargo, el método de elección puede ser suministrar fármacos beneficiosos, tales como suramina, con un sistema de suministro dirigido a células específicas.

- 5 En cuanto a la invención descrita en el presente documento, los miembros de la familia restringida de manera hepatogastroenterológica de proteínas REG (revisado en Zhang YW, Ding LS, Lai MD. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol*, diciembre de 2003; 9:2635-41), una vez más, comprenden posibles estructuras de direccionamiento intrahepático. Sin embargo, las lectinas de tipo C que pueden permitir la selección como diana de ciertos subconjuntos de células hepáticas más específicamente son (i) receptores de asialoglicoproteínas expresados por hepatocitos (que pueden seleccionarse como dianas con liposomas marcados con Gal-4-Col); y (ii) receptores de manosa y fucosa expresados por células hepáticas no parenquimatosas (que pueden seleccionarse como diana ambas con liposomas marcados con Fuc-4-Col) (Kawakami S, Wong J, Sato A, Hattori Y, Yamashita F, Hashida M. Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1524:258-65). Además, los liposomas marcados con Fuc-4-Col también pueden dirigirse a células endoteliales del seno hepático seleccionando como diana ICAM-3 específica de hígado/ganglio linfático no integrina de captura (L-SIGN), un receptor de CTL relacionado con DC-SIGN (Bashirova AA, Geijtenbeek TBH, van Duijnhoven GCV, van Vliet SJ, Eilering JBG, Martin MP, Wu L, Martin TD, Viebig N, Knolle PA, KewalRamani VN, van Kooyk Y, Carrington M. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 2001; 193:671-8).

De hecho, en ausencia de cualquier tratamiento eficaz para NAFLD/NASH como la enfermedad hepática más destacada en los países industrializados, tales opciones pueden permitir las primeras estrategias de intervención verdaderamente eficaces. Además, puede esperarse que enfoques basados en el mismo fundamento puedan tener también efecto en el tratamiento de otras enfermedades que asimismo revelan tasas de apoptosis aumentadas y patogénicamente relevantes (Canbay C, Gieseler RK, Gores GJ, Gerken G. The relationship between apoptosis and non-alcoholic fatty liver disease: an evolutionary cornerstone turned pathogenic. *Z Gastroenterol* 2005; 43:211-7). Específicamente, el enfoque terapéutico sugerido aprovecha dos potentes aliados biológicos. En primer lugar, para el suministro específico de células, la selección como diana de dominios de lectina CRD exocelulares específicos de células hepáticas; en segundo lugar, para interferir con la apoptosis intrahepática, la selección como diana terapéutica (por ejemplo, a través del fármaco suramina) de caspasas intracelulares de la cascada apoptótica. Ambos, el sistema de lectina CRD y el sistema de apoptosis, están profundamente arraigados dentro de nuestra herencia biológica. En otras palabras, la construcción basándose en estas piedras angulares de evolución celular en la Tierra permite que un enfoque de este tipo parezca estar abocado al éxito. El empleo de un fármaco de inhibición de apoptosis/caspasa tal como suramina (Eichhorst ST, Krueger A, Muerkoster S *et al.* Suramin inhibits death receptor-induced apoptosis, *in vitro* and fulminant apoptotic liver damage in mice. *Nat Med* 2004; 10:602-9) a través del empleo hepatotópico y cronofarmacológico del sistema de direccionamiento de la invención (Kemeny MM, Alava G, Oliver JM. The effects on liver metastases of circadian patterned continuous hepatic artery infusion of FUDR. *HPB Surg* 1994; 7:219-24) puede permitir un primer tratamiento eficaz de NAFLD/NASH, mientras que se minimiza enormemente cualquier efecto potencialmente perjudicial del fármaco.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a un método de suministrar preferentemente un agente activo a una(s) célula(s) reservorio, incluyendo una célula inmunitaria de un sujeto mamífero, incluyendo un ser humano. Las células reservorio seleccionadas como diana incluyen células progenitoras mieloides en la médula ósea, monocitos, células dendríticas mieloides, macrófagos, células dendríticas foliculares, células dendríticas plasmocitoides, linfocitos T y linfocitos citolíticos naturales. A continuación, el término "célula dendrítica" incluye una célula mielóide, plasmacitoide o dendrítica folicular. El término "linfocito T" incluye, pero no se limita a, una célula T cooperadora, una célula T reguladora o una célula T de memoria.

50 El término "preferentemente" significa que el sistema de direccionamiento, concretamente, el complejo de lípido-activo/compuesto activo, o el liposoma dirigido que tiene una superficie exterior que comprende un ligando dirigido, se suministra a la célula, y el agente/compuesto activo (por ejemplo, la lectina vegetal o fármaco) se capta por la célula de manera más eficaz que, a diferencia de la invención, mediante el suministro y la captación del agente usando un complejo de lípido-agente activo, o liposoma, comparable que tiene una superficie exterior que no comprende un ligando de direccionamiento, tal como, restos de mono o polifucosa.

El método implica inyectar en el sujeto mamífero, o aplicar por vía tópica o de otro modo, un complejo de lípido-agente activo, tal como un liposoma dirigido, según la invención que comprende el agente activo, o una combinación de agentes activos, estando infectada la célula inmunitaria con, o siendo susceptible a la infección con, un agente infeccioso (o patógeno), tal como, pero sin limitarse a, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En algunas realizaciones, la célula inmunitaria está infectada con, o es susceptible de infección con, un agente infeccioso, tal como un virus, una bacteria, un hongo, o un protozoo. Ejemplos de agentes infecciosos son VIH-1, VIH-2, VHC, VHS, VEB, VPH, virus influenza, virus del Ébola, o *Mycobacterium tuberculosis*. Algunas realizaciones se refieren particularmente a direccionamiento intracelular para la inactivación intraendosómica del VIH.

65 La presente invención se refiere también particularmente a sistemas de direccionamiento de la invención, tales como

complejos de lípido-agente/compuesto activo, incluyendo liposomas dirigidos, en los que sus superficies están marcadas con un ligando de direccionamiento, tal como una mono o polifucosa, que se unen a los complejos y liposomas mediante técnicas conocidas tal como se ha presentado en el presente documento, es decir, preparando liposomas fucosilados (Fuc) por medio de unión a colesterol y anclaje en membrana con colestén-5-iloxi-N-(4-((1-imino-2-beta-D-tiofucosil-etil)amino)alquil)formamida (o, brevemente, Fuc-C4-Col), y la formulación posterior de liposomas como una composición de distearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol (Col) y Fuc-C4-Col a una razón molar de 60:35:5 (por ejemplo, Kawakami S, Wong J, Sato A, Hattori Y, Yamashita F, Hashida M. Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice. *Biochim Biophys Acta*. 15 de diciembre de 2000; 1524(2-3):258-65). La fucosa, polifucosa y derivados de polifucosa son ejemplos de ligandos de direccionamiento o anclajes específicos del receptor de CRD. En otras realizaciones de la invención, el ligando de direccionamiento o el anclaje específico del receptor de CRD se une específicamente a un receptor de CTL o CTLD. Los ligandos de direccionamiento de este tipo también pueden incluir, galactosa, poligalactosa y derivados de poligalactosa.

En cuanto a la invención descrita en el presente documento, las síntesis de los ligandos de direccionamiento o anclajes específicos del receptor de CRD de la invención, incluyendo anclajes de hidratos de carbono específicos del receptor de CTL, para modificación de la membrana liposómica se basan en los protocolos de Kawakami *et al.* En su estudio, sintetizaron anclajes de membrana de liposoma de colesterol derivatizado con galactosa (Gal-C4-Col), manosa (Man-C4-Col) y fucosa (Fuc-C4-Col), es decir, colestén-5-iloxi-N-(4-((1-imino-2-1-d-tiogalactosiletil)amino)alquil)formamida; colestén-5-iloxi-N-(4-1-imino-2-1-d-tiomanosiletil)amino)alquil)formamida; y colestén-5-iloxi-N-(4-((1-imino-2-1-d-tiofucosiletil)amino)alquil)formamida, respectivamente (Kawakami S, Wong J, Sato A, Hattori Y, Yamashita F, Hashida M. Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1524: 258-65), tal como se habían desarrollado metodológicamente por primera vez en un trabajo anterior de este grupo (Kawakami S, Yamashita F, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252:78-83).

Sus protocolos se han modificado según otras etapas metodológicas conocidas (Nishikawa M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Glycosylated cationic liposomes for carbohydrate receptor-mediated gene transfer. *Meth Enzymol* 2003; 373:384-399; Wolfrom ML, Thompson A. Acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Vol. II; págs. 211-5 (1963); Chipowsky Y, Lee YC. Synthesis of 1-thioaldosides having an amino group at the aglycon terminal. *Carbohydr Res* 1973; 31:339-346; y Lee YC, Stowell CP, Krantz ML. 2-Imino-2-methoxyethylen 1-thioglycosides: new reagents for attaching sugars to proteins. *Biochemistry* 1976; 15:3956-3963). Finalmente, se han incluido modificaciones químicas novedosas adicionales así como medidas de control de calidad. En cuanto a los anclajes de direccionamiento de manosa (Man-C4-Col), fucosa (Fuc-C4-Col) y galactosa (Gal-C4-Col), estas variantes sirvieron para diferentes objetivos. Debido a su eficacia probada, se empleó Man-C4-Col como control positivo. Debido a una eficacia de unión similar a la de Man-C4-Col, se especificó Fuc-4-Col como el anclaje de direccionamiento para el sistema de suministro. Finalmente, se usó Gal-C4-Col como control negativo cuando se seleccionaron como diana estructuras de direccionamiento específicas de manosa/fucosa. Sin embargo, se prevé adicionalmente Gal-4-Col como anclaje de direccionamiento específico de liposomas dirigidos hacia células hepáticas no parenquimatosas (Kawakami S, Wong J, Sato A, Hattori Y, Yamashita F, Hashida M. Biodistribution characteristics of mannosylated, fucosylated, and galactosylated liposomes in mice. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1524:258-65).

Un "complejo" es una mezcla o aducto que resulta del enlace o unión químico entre y/o entre sus constituyentes o componentes, incluyendo el lípido, agente activo, ligando de direccionamiento y/u otros componentes opcionales del complejo de lípido-agente activo o sistema de direccionamiento de la invención. El enlace o unión químico puede tener la naturaleza de un enlace covalente, enlace iónico, puente de hidrógeno, enlace de van der Waal, enlace hidrofóbico, o cualquier combinación de estos tipos de unión que unen los constituyentes del complejo en cualquiera de sus partes o restos, pudiendo tener un constituyente uno o una multiplicidad de restos de diversas clases. No es necesario que se unan todos los constituyentes de un complejo a todos los demás constituyentes, pero cada constituyente tiene al menos una unión química con al menos otro constituyente del complejo. Según la presente invención, los ejemplos de complejos de lípido-agente activo incluyen liposomas (vesículas de lípidos), o complejos de lípido-agente activo de lámina-disco. Los agentes activos conjugados con lípidos también pueden formar parte del complejo de lípido-agente activo según la invención. En realizaciones de la invención, el agente activo se encapsula dentro del complejo de lípido-agente activo y el complejo de lípido-agente activo tiene un ligando de direccionamiento en su superficie exterior. Los agentes activos pueden encapsularse con la formulación lipídica, incluyendo la encapsulación dentro de un liposoma.

En la técnica se conocen técnicas útiles para obtener complejos de lípido-agente activo, 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 propagation by liposome-encapsulated sense DNA to the 5' TAT splice acceptor site. *Antisense Res Dev* 1992; 2:187-97; Laverman P, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM, Storm G, *in vivo* applications of PEG liposomes: unexpected observations. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001;18:551-66); Oussoren C, Storm G, Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration, *Adv Drug Deliv Rev* 50(1-2):143-56 [2001]; Bestman-Smith J, Gourde P, Desormeaux 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, Desormeaux A, Tremblay MJ, Bergeron MG, Targeting cell-to-cell 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. *et al.*, 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* [2003; en impresión]; Harvie P, Desormeaux A, Gagne N, Tremblay M, Poulin L, Beauchamp D, Bergeron MG, Lymphoid tissues targeting of liposome-encapsulated 2',3'-dideoxyinosine, *AIDS* 1995 Jul; 9(7):701-7 [1995]; patente estadounidense n.º 5.773.027; patente estadounidense n.º 5.223.263; documento WO 96/10399 A1).

Algunos métodos útiles de preparación de liposomas incluyen extrusión, homogenización, carga remota y evaporación en fase inversa. En la extrusión, se forma una película lipídica compuesta de fosfolípidos por sí solos, o en combinación con colesterol, mediante la evaporación del disolvente orgánico (tal como cloroformo) de la disolución lipídica. Se añaden agentes activos hidrófobos a la disolución lipídica antes de la evaporación del disolvente. Para atrapar agentes activos solubles en agua, se hidrata la película lipídica seca con una disolución acuosa isotónica que contiene el agente activo por agitación (ultrasonidos, vórtex, agitador motorizado, etc.). La suspensión lipídica se congela y se descongela tres o cuatro veces. La suspensión se hace pasar entonces a través de una serie de filtros de policarbonato que contienen poros de un diámetro definido, tal como 0,8 µm, 0,4 µm, 0,2 µm, o 0,1 µm. Para los agentes activos solubles en agua, se eliminan los agentes activos no encapsulados mediante cromatografía en columna de permeación en gel, diálisis o diafiltración. Los liposomas pueden filtrarse en condiciones estériles (por ejemplo, a través de un filtro de 0,22 µm).

Puede añadirse un agente crioprotector, tal como lactosa, glucosa, sacarosa, a los liposomas estériles siempre que se mantenga la isotonicidad. Entonces, los liposomas pueden congelarse 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 *et al.* Effect of sugars on headgroup mobility in freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: solid-state ³¹P NMR y 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 homogenización es adecuada para la fabricación a gran escala. La suspensión lipídica se prepara tal como se describió anteriormente. Las etapas de congelación y descongelación a gran escala pueden constituir un problema. El diámetro de los liposomas se reduce al disparar la suspensión lipídica como una corriente o bien en una corriente en sentido contrario al de la propia suspensión lipídica (microfluidización) o bien contra una placa de acero (gualinización). Esta última tecnología se ha usado por la industria láctea para la homogenización de la leche. Los agentes activos solubles en agua no atrapados se eliminan mediante diafiltración. Los agentes activos hidrófobos quedan completamente atrapados y habitualmente no hay agente activo libre que eliminar (por ejemplo, Paavola A, Kilpelainen I, Iiruusi 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 método de atrapamiento de agente activo es la carga remota. El agente activo que ha de atraparse debe portar una carga. El grado de protonación o desprotonación se controla mediante el pK del grupo ionizable. Un ácido o base conjugados queda atrapado dentro de los liposomas. El agente activo ionizable se añade en el exterior de los liposomas. Se disminuye el pH de modo que el agente activo sirva como sal de neutralización de la sustancia ionizable atrapada dentro de los liposomas. El contraión de la molécula ionizable atrapada puede difundir fuera de los liposomas debido al cambio en el pH. Esto crea un gradiente con energía suficiente como para hacer que el agente activo difunda al interior de los liposomas. Un ejemplo es la carga de doxorubicina en el interior de liposomas preformados.

En la evaporación en fase inversa, se solubiliza una película lipídica en dietil éter hasta una concentración final de normalmente alrededor de 30 mM. Normalmente, se añade una parte de agua con agente activo atrapado a 3 partes de disolución lipídica de éter. Se aplica energía en forma de sonicación forzando la suspensión a la formación de una emulsión homogénea. Una vez formada una emulsión estable (no se separa tras dejarla estar durante de 1 a 3 horas) se elimina el éter mediante evaporación, produciendo normalmente liposomas con aproximadamente 200 nm de diámetro y una alta eficacia de atrapamiento.

Se preparan liposomas de etanol/calcio para atrapamiento de ADN, produciendo normalmente liposomas de 50 nm de diámetro, mediante cualquiera de los métodos anteriores (extrusión, homogenización o sonicación). Se mezclan los liposomas con ADN de plásmido más cloruro de calcio 8 mM. Normalmente se añade etanol a la suspensión para producir una concentración de aproximadamente el 40%. Se 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, según la presente invención, pueden prepararse liposomas mediante cualquiera de los métodos anteriores. Los liposomas pueden contener un lípido al que pueden reticularse proteínas. Los ejemplos de estos lípidos son: N-glutaril-fosfatidiletanolamina, N-succinil-fosfatidiletanolamina, maleimido-fenil-utiril-fosfatidiletanolamina, succinimidil-acetiltoacetato-fosfatidiletanolamina, SPDP-fosfatidiletanolamina. La glutaril y succinimidil fosfatidiletanolamina pueden unirse a un nucleófilo, tal como una amina, usando ciclocarbodiimida. La maleimido, acetiltoacetato y SPDP fosfatidiletanolaminas pueden hacerse reaccionar con tioles en las proteínas, péptidos o ligandos de peso molecular pequeño (<1000 gm/mol). La proteína puede derivatizarse en los liposomas tras la formación. La proteína no derivatizada puede eliminarse mediante cromatografía de permeación en gel. Los péptidos y ligandos de bajo peso molecular pueden derivatizarse en los lípidos y añadirse a la disolución lipídica orgánica antes de la formación de la película lipídica.

Según la presente invención, los ejemplos de lípidos útiles incluyen cualquier lípido que forme vesículas, tal como, pero sin limitarse a, fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (denominada en el presente documento "PC"), tanto que se producen de manera natural como preparados sintéticamente, ácido fosfatídico (denominado en el presente documento "PA"), lisofosfatidilcolina, fosfatidilserina (denominada en el presente documento "PS"), fosfatidiletanolamina (denominada en el presente documento "PE"), esfingolípidos, fosfatidilglicerol (denominado en el presente documento "PG"), esfingomielina, cardiolipina, glicolípidos, gangliósidos, cerebrósidos y similares usados o bien individualmente o bien mezclados tal como en fosfolípidos de soja (por ejemplo, asolectina, concentrados asociados). PC, PG, PA y PE pueden derivarse de yema de huevo purificada y sus derivados hidrogenados.

Opcionalmente, pueden mezclarse otros lípidos tales como esteroides, colesterol, aminas alifáticas tales como ácidos carboxílicos y aminas alifáticas de cadena larga, sulfatos y fosfatos de cadena larga, fosfato de diacetilo, hidroxitolueno butilado, tocoferoles, retinoides y compuestos isoprenoides con los componentes fosfolipídicos para conferir determinadas propiedades deseadas y conocidas en las vesículas formadas. Además, los fosfolípidos sintéticos que contienen o bien partes alifáticas alteradas tales como grupos hidroxilo, cadenas carbonadas ramificadas, cicloderivados, derivados aromáticos, éteres, amidas, derivados poliinsaturados, derivados halogenados, o bien partes hidrófilas alteradas que contienen grupos de hidrato de carbono, glicol, fosfato, fosfonato, amina cuaternaria, sulfato, sulfonato, carboxilo, amina, sulfhidrido o imidazol y combinaciones de tales grupos pueden o bien sustituirse o bien mezclarse con los fosfolípidos mencionados anteriormente y usarse según la invención. Se sabe que algunos de estos componentes aumentan la fluidez de la membrana liposómica, suponiendo por tanto una captación más eficaz; se sabe que otros tienen un efecto directo sobre, por ejemplo, células tumorales afectando a su potencial de diferenciación. Se apreciará a partir de lo anterior que la composición química del componente lipídico preparado mediante el método de la invención puede variarse enormemente sin disminución apreciable del porcentaje de captura de agente activo, aunque el tamaño de una vesícula puede resultar afectado por la composición lipídica.

También pueden usarse PC y PG sintéticos saturados, tales como dipalmitoílo. Otros lípidos anfipáticos que pueden usarse, ventajosamente con PC, son gangliósidos, globósidos, ácidos grasos, estearilamina, alcoholes de cadena larga, y similares. También pueden incluirse lípidos pegilados, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos. También son útiles los fosfolípidos acilados y diacilados.

A modo de ejemplo adicional, en algunas realizaciones, los fosfolípidos útiles incluyen fosfatidilcolina de huevo ("EPC"), dilaurilfosfatidilcolina ("DLPC"), dimiristoilfosfatidilcolina ("DOPC"), dipalmitoifosfatidilcolina ("DPPC"), diestearoifosfatidilcolina ("DSPC"), 1-miristoil-2-palmitoifosfatidilcolina ("MPPC"), 1-palmitoil-2-miristoil fosfatidilcolina ("PMPC"), 1-palmitoil-2-estearoifosfatidilcolina ("PSPC"), 1-estearoil-2-palmitoifosfatidilcolina ("SPPC"), dioleoilfosfatidilcolina ("DOPC"), dilaurilol-fosfatidilglicerol ("DLPG"), dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dipalmitoifosfatidilglicerol ("DPPG"), diestearoifosfatidilglicerol ("DSPG"), distearoilesfingomielina ("DSSP"), diestearoifosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoilfosfatidilglicerol ("DOPG"), ácido dimiristoilfosfatídico ("DMPA"), ácido dipalmitoifosfatídico ("DPPA"), dimiristoil-fosfatidiletanolamina ("DMPE"), dipalmitoifosfatidiletanolamina ("DPPE"), dimiristoilfosfatidilserina ("DMPS"), dipalmitoifosfatidilserina ("DPPS"), fosfatidilserina de cerebro ("BPS"), esfingomielina de cerebro ("BSP") y dipalmitoilesfingomielina ("DPSP").

En una realización, se emplean fosfatidilcolina y colesterol. Sin embargo, puede emplearse opcionalmente cualquier razón molar adecuada de una mezcla lípido no esteroideo:lípido esteroideo (por ejemplo, colesterol) para potenciar la estabilidad de un complejo particular de lípido-agente activo durante el almacenamiento y/o el suministro a un sujeto mamífero.

El mezclado del agente activo y los lípidos puede realizarse mediante cualquier técnica conocida útil, por ejemplo, mediante sonicación, agitación con vórtex, extrusión, microfluidización, homogenización, uso de un detergente (eliminado más tarde, por ejemplo, mediante diálisis). El agente activo y el lípido se mezclan en una razón molar de lípido con respecto a agente activo de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 100:1 o superior (especialmente útil para agentes activos relativamente más tóxicos), y más preferiblemente de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 10:1, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 7:1.

Para algunos agentes activos, el uso de un disolvente orgánico puede facilitar la producción del complejo de lípido-

agente activo, tal como un liposoma. El disolvente orgánico se elimina, tras el mezclado del agente activo y los lípidos, mediante cualquier medio de eliminación conocido adecuado, tal como evaporando mediante vacío, o mediante la aplicación de calor, por ejemplo usando un secador u horno, o inyección de etanol caliente (por ejemplo, Deamer, patente estadounidense n.º 4.515.736), siempre que los componentes de lípido y agente activo sean estables a la temperatura usada. También pueden emplearse diálisis y/o cromatografía, incluyendo cromatografía de afinidad, para eliminar el disolvente orgánico. La hidratación de agente activo se realiza con agua o cualquier tampón acuoso biocompatible, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, HEPES o TRIS, que mantiene una osmolaridad fisiológicamente equilibrada. Puede llevarse a cabo la rehidratación de los liposomas, simultáneamente con la eliminación del disolvente orgánico, o alternativamente, puede retrasarse hasta un momento más conveniente para usar los liposomas (véase, por ejemplo, Papahadjopoulos *et al.*, patente estadounidense n.º 4.235.871). El término de caducidad de los liposomas hidratables (es decir, "secos") es normalmente de aproximadamente 8 meses a aproximadamente un año, lo que puede aumentarse mediante liofilización.

En una realización, el complejo de lípido-agente activo es un liposoma unilamelar. Los liposomas unilamelares proporcionan la mayor exposición de agente activo al exterior del liposoma, donde puede interactuar con las superficies de células y/o agentes infecciosos diana dentro de la célula diana. Sin embargo, también pueden usarse liposomas multilamelares según la presente invención. El uso de liposomas pegilados también se engloba dentro de la presente invención.

El complejo de lípido-agente activo, tal como un liposoma, tiene preferible pero no necesariamente, de aproximadamente 30 a aproximadamente 250 nanómetros de diámetro.

Según la presente invención, los complejos de lípido-agente activo pueden conservarse para su uso posterior mediante cualquier método de conservación conocido, tal como liofilización (por ejemplo, Crowe *et al.*, patente estadounidense n.º 4.857.319). Normalmente, las técnicas de liofilización u otras técnicas de crioconservación útiles implican la inclusión de un agente de crioconservación, tal como un disacárido (por ejemplo, trehalosa, maltosa, lactosa o sacarosa).

El complejo de lípido-agente activo, por ejemplo, un liposoma que contiene el agente activo, se administra a un sujeto mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo mediante inyección. La inyección puede ser intraarterial, intravenosa, intratecal, intraocular, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, o mediante inyección directa (por ejemplo, estereotáctica) en un tejido linfoide particular, o en un tumor u otra lesión. Se prefieren la inyección subcutánea o intramuscular para introducir el complejo de lípido-agente activo en vasos linfáticos.

Según la presente invención, "tejido linfoide" es (i) un ganglio linfático, tal como un ganglio linfático inguinal, mesentérico, ileocecal, o axilar; (ii) el bazo; (iii) el timo, (iv) tejido linfoide asociado a mucosa tal como el encontrado en el pulmón, la lámina propia de la pared intestinal, las estructuras denominadas placas de Peyer asociadas con el intestino delgado, o (v) el anillo de Waldeyer que engloba también las amígdalas lingual, palatina y faríngea como estructuras anatómicamente diferenciadas.

La inyección se realiza mediante cualquier método que drene directamente, o preferentemente, al interior del sistema linfático o la médula ósea, en contraposición al torrente sanguíneo. Por tanto, las más preferidas son las vías de inyección subcutánea, intracutánea y dirigida a médula ósea, que emplean normalmente una aguja de jeringuilla de calibre mayor que el complejo de lípido-agente activo. En referencia a la ubicación de las células que proporcionan reservorios infecciosos crónicos, también es útil la aplicación intraplacentaria o intrauterina adecuada, así como vías de inyección intraperitoneal. Finalmente, son útiles las vías de aplicación específicas de órgano, tales como, pero sin limitarse a, la aplicación a través de la arteria hepática. Normalmente, la inyección del volumen inyectable (de manera aproximadamente 1-5 cm³) se produce en el brazo, la pierna o la tripa del sujeto, pero puede escogerse cualquier sitio conveniente para la inyección subcutánea. Dado que el agente activo, por ejemplo, cuando se administra por vía subcutánea, según algunas realizaciones de la presente invención, entra en el sistema linfático antes de entrar en la circulación sanguínea sistémica, los beneficios incluyen (i) su distribución por todo el sistema linfoide y la ubicación en los ganglios linfáticos; (ii) evitar o minimizar la desestabilización mediada por proteínas (en suero) de los complejos de lípido-agente activo; y (iii) el suministro del agente a concentraciones que no pueden lograrse con una forma soluble del agente activo administrado mediante cualquier otra vía de administración (por ejemplo, la intravenosa).

Normalmente, en el tratamiento del VIH/SIDA, la frecuencia de inyección es lo más preferiblemente una vez por semana, pero también pueden ser apropiadas inyecciones más o menos frecuentes (por ejemplo, mensuales).

Para los fines de la presente invención, el "agente activo" es un agente, una lectina, un fármaco, o un compuesto inmunomodulador (i) activo frente a un agente infeccioso de interés, (ii) dirigido contra una formación neoplásica de interés, o (iii) que interfiere con una enfermedad degenerativa crónica no infecciosa de interés.

En una realización preferida, el agente activo es una lectina vegetal. Las lectinas vegetales son una clase de sustancias altamente interesantes para la inhibición intraendosómica del VIH u otros agentes infecciosos que establecen reservorios intracelulares/intraendosómicos crónicos. Aunque la presente invención no depende de

ningún mecanismo particular para su eficacia terapéutica, se cree que la capacidad de las lectinas vegetales para unirse fuertemente a manosa o fucosa (tal como, por ejemplo, las presentadas de manera destacada por la glicoproteína gp120 de la envuelta del VIH) interfiere terapéuticamente con el proceso de fusión virus-célula. Los ejemplos de lectinas vegetales útiles incluyen: las lectinas vegetales específicas de manosa de *Canavalia ensiformis*, *Myrianthus holstii*, *Galanthus nivalis*, *Hippeastrum hybrid*, *Narcissus pseudonarcissus*, *Epipactis helleborine*, y *Listera ovata*, y la lectina específica de N-acetilglucosamina de *Urtica dioica* que inhibe la infección por VIH-1 y VIH-2 a una CI_{50} de aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,08 $\mu\text{g/ml}$. De manera importante, puesto que se requiere esta baja concentración con el suministro no dirigido, pueden lograrse todavía concentraciones mucho menores por el suministro liposómico dirigido a células. Se forma una red de aglutinación irreversible entre los viriones del VIH almacenados de manera intraendosómica u otras partículas patógenas en células reservorio, inactivando por tanto la capacidad infecciosa del agente infeccioso. Las lectinas vegetales interfieren fuertemente con el virus herpes simple (VHS-1, VHS-2), el citomegalovirus (CMV), el virus influenza, y otros virus. Específicamente, el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) se inactivan mediante lectinas vegetales derivadas de *Canavalia ensiformis* y *Arceuthobium spp.* (muérdago). Esto puede hacer que se traslade, incluso sin modificación/modificaciones principal(es), directamente a su aplicación a otras enfermedades virales.

Desde el punto de vista espacial, los tetrámeros de lectinas vegetales tienen normalmente $\sim 0,5 \text{ \AA}$ (5 nm) de diámetro (que, dependiendo del pH, existen o bien como dímeros o bien como tetrámeros). Por tanto, muchas de tales moléculas deben atraparse en, y suministrarse de, un liposoma de un diámetro de aproximadamente 150-200 nm para aglutinar sucesivamente reservorios virales almacenados de manera endosómica.

En otras realizaciones de la invención, el agente activo comprendido por el liposoma dirigido por mono o polifucosa es un fármaco, que puede ser un fármaco antiviral o agente virostático (tal como un interferón), un análogo de nucleósidos, o un fármaco antiviral no nucleosídico. Los ejemplos incluyen fármacos anti-VIH (por ejemplo, un inhibidor de proteasa inversa de VIH), tal como indinavir (también conocido como Crixivan®, Merck & Co., Inc., Rahway, NJ; saquinavir (N-terc-butil-decahidro-2-[2(R)-hidroxi-4-fenil-3(S)-[[N-(2-quinolilcarbonil)-L-asparaginil]-amino]butil]-(4aS,8aS)-isoquinolina-3(S)-carboxamida; PM 670,86 Da (también conocido como Fortovase®, Roche Laboratories, Inc., Nutley, NJ); o nelfinavir (es decir, nelfinavir mesilato, también conocido como Viracept®, [3S-[2(2S*, 3S*), 3a,4ab,8ab]]-N-(1,1-dimetiletil)decahidro-2-[2-hidroxi-3-[(3-hidroxi-2-metilbenzoil)amino]-4-(feniltio)butil]-3-isoquinolincarboxamida mono-metanosulfonato (sal), PM = 663,90 Da [567,79 como la base libre]; Agouron Pharmaceuticals, Inc., La Jolla, CA). Nelfinavir mesilato es un polvo amorfo de blanco a blanquecino, ligeramente soluble en agua a pH <4 y libremente soluble en metanol, etanol, isopropanol y propilenglicol. Otros ejemplos de fármaco antiviral incluyen inhibidores de la transcriptasa inversa, tales como tenofovir disoproxil fumarato (9-[[[R]-2-[[bis[[[(isopropoxycarbonil)oxi]metoxi]fosfinil]metoxi]propil]adenina fumarato (1:1); PM = 635,52 Da; también conocido como Viread®, Gilead Sciences, Foster City, CA, EE.UU.). El fármaco anti-VIH también puede ser moléculas de ADN sentido o antisentido, ARNip específicas de VIH.

En otras realizaciones, el agente activo es un fármaco anticancerígeno, un fármaco antibacteriano, un fármaco antifúngico o un compuesto que interfiere con un protozoo parasitario.

En todavía realizaciones adicionales, el agente activo es un agente inmunomodulador (es decir, un agente inmunoactivador, inmunógeno, inmunosupresor o antiinflamatorio), tal como ciclosporina, esteroides y derivados de esteroides. Otros ejemplos de fármacos útiles, según la invención, incluyen agentes citotóxicos terapéuticos (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y anfotericina), vectores de expresión de ADN desnudos, proteínas terapéuticas, oligonucleótidos terapéuticos o análogos de nucleótidos, interferones, citocinas, o agonistas o antagonistas de citocinas. También útil como fármaco es un agente de alquilación citotóxico, tal como, pero sin limitarse a, busulfano (dimetanosulfonato de 1,4-butanodiol; Mileran, Glaxo Wellcome), clorambucilo; ciclofosfamida, melfalán, ácido etil etanosulfónico. Tales fármacos o agentes son particularmente útiles en el tratamiento de estados que implican la proliferación patológica de células inmunitarias, por ejemplo, cánceres linfoides o enfermedades autoinmunitarias.

Las combinaciones de agentes activos, ya sean lectinas vegetales y/o fármacos también se engloban dentro de la invención. En realizaciones de la invención, los agentes activos pueden encapsularse dentro del complejo de lípido-agente activo.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Preparación y caracterización de liposomas. Se adquirió dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) de Lipoid (Ludwigshafen, Alemania) y el colesterol (Col) procedió de Caelo (Caesar and Lorentz, Hilden, Alemania). Se sintetizaron derivados de azúcar-colesterol tal como se describe a continuación. Se disolvieron mezclas de derivados de lípido-sacárido (es decir DOPC:Col:Gal-C₄-Col, DOPC:Col:Man-C₄-Col o DOPC:Col:Gal-C₄-Col, cada una en razones molares de 60:35:5; o DOPC:Col como control negativo, a una razón molar de 60:40) en diclorometano/metanol (1:2 v/v). Se eliminó completamente el disolvente a presión reducida a 35°C, seguido por evaporación a alto vacío.

Para los análisis de fluorescencia, se preparó una disolución de calceína 50 mM (Sigma, St. Louis, EE.UU.) y EDTA 1 mM (Merck, Darmstadt, Alemania) y se ajustó el pH a 7,5 con NaOH. Se hidrató la película lipídica seca con 1 ml de la disolución de calceína mezclando suavemente para dar una dispersión de aproximadamente 30 mM de lípido total. Se liofilizó la dispersión 6 veces y luego se extruyó 11 veces a través de una membrana de policarbonato con poros de 200 nm y posteriormente 21 veces a través de una membrana con poros de 80 nm (ambas membranas adquiridas de Whatman, Maidstone, Kent, RU), usando el dispositivo LiposoFast (Avestin, Ottawa, Canadá). Se eliminó completamente la calceína no encapsulada mediante cromatografía en gel utilizando una columna de Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) equilibrada con tampón HEPES isotónico (NaCl 130 mM, HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4).

Se determinó la concentración de fosfolípido final mediante un ensayo con fósforo establecido hace mucho tiempo altamente fiable (Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem 1959, 234: 466-8). Se midió el tamaño de los liposomas mediante espectroscopía de correlación fotónica (Zeta-Master S, Malvern Instruments, Malvern, RU). Se diluyeron las muestras con tampón HEPES recién filtrado para dejarlo libre de partículas (Minisart 0,22 µm Minisart, Göttingen, Alemania) para dar una tasa de recuento de 100-150 cuentas/s. Se colocaron todas las muestras en el portamuestras 5 min. antes del comienzo de la medición, de modo que se equilibrara la muestra a 25°C.

Síntesis de derivados de colesterol-glicosilo. La síntesis de tres derivados de colesterol glicosilados de manera diferente siguió principalmente la ruta sintética publicada por Hashida y colaboradores [Kawakami S, Yamashita F, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M, Asialoglicoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated liposomes. Biochem Biophys Res Commun 1998; 252:78-83; Nishikawa M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Glycosylated cationic liposomes for carbohydrate receptor-mediated gene transfer. Meth Enzymol 2003; 373:384-399], con algunas modificaciones. Los protocolos para obtener colesterol derivatizado o bien con (i) fucosa, es decir, colestén-5-iloxil-*N*-(4-((1-imino- β -D-tiofucosiletil)amino)butil)formamida; (ii) manosa, es decir, colestén-5-iloxil-*N*-(4-((1-imino- β -D-tiomanosiletil)amino)butil)formamida; o (iii) galactosa, es decir, colestén-5-iloxil-*N*-(4-((1-imino- β -D-tiogalactosiletil)amino)butil)formamida (tal como se detalla a continuación para el derivado de fucosilo) se parecen estrechamente entre sí. Durante toda la síntesis, se confirmaron las estructuras de todos los productos intermedios aislados mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

Etapa 1: Acetilación de fucosa / Síntesis de 1,2,3,4-tetra-O-acetil-fucopiranosido: Según [Nishikawa M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Glycosylated cationic liposomes for carbohydrate receptor-mediated gene transfer. Meth Enzymol 2003; 373:384-399; y Wolfrom ML, Thompson A. Acetylation. Methods in Carbohydrate Chemistry. Vol. II; págs. 211-5 (1963)], se añadieron 152 mmol de fucosa gradualmente con agitación continua a una mezcla de 175 ml de anhídrido acético y 1,25 ml de ácido perclórico previamente enfriado en hielo. Entonces se agitó la disolución a TA durante 3 h adicionales bajo la exclusión de humedad del aire. Esta mezcla de reacción se vertió en 200 ml de agua helada, antes de añadir 300 ml de acetato de etilo. Tras la separación de fases en un embudo, se lavó la fase orgánica recogida x3 con 100 ml de agua fría y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. La filtración y la evaporación del disolvente dieron como resultado 1,2,3,4-tetra-O-acetil-fucopiranosido como un aceite.

Etapa 2: Síntesis de 1-bromo-2,3,4-tri-O-acetil-fucopiranosido: Se añadieron lentamente 47,6 mmol de 1,2,3,4-tetra-O-acetil-fucopiranosido (gradualmente) a 75 ml de una disolución de bromuro de hidrógeno/ácido acético (33%) mientras se agitaba en un baño de hielo; se agitó adicionalmente esta mezcla durante la noche a 4°C. (En cambio, el 1-bromo-2,3,4-tri-O-acetil-galactopiranosido se purificó añadiendo 400 ml, a cada uno de agua helada y acetato de etilo). Tras la separación de fases, se recogió la fase orgánica y se lavó la fase acuosa x3 con 100 ml de acetato de etilo. Posteriormente se neutralizaron las fracciones combinadas de acetato de etilo añadiendo 200 ml de una disolución saturada de bicarbonato de sodio. Entonces se lavó la fase orgánica neutralizada con 200 ml de una disolución de cloruro de sodio al 1%, dando como resultado que las fases se separaron, y se secó la fase orgánica con sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó para dar bromuro de 2,3,4-tri-O-acetil-fucopiranosilo.

Etapa 3: Síntesis de bromhidrato de 2-S-(2,3,4-tri-O-acetil-tiofucopiranosil)-2-tiopseudourea: Según los protocolos desarrollados por Chipowsky y Lee [Chipowsky Y, Lee YC. Synthesis of 1-thioaldosides having an amino group at the aglycon terminal. Carbohydr Res 1973; 31:339-346], se disolvieron 45,17 mmol de 1-bromo-2,3,4-tri-O-acetil-fucopiranosido seco en 20 ml de acetona anhidra. Se transfirió la disolución a un matraz de fondo redondo de 250 ml, y se añadieron 50 mmol de tiourea bajo una atmósfera de argón. Se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante 15 min. y luego se dejó enfriar en un baño de hielo. Se recogió por filtración el bromhidrato de 2-S-(2,3,4-tri-O-acetil-tiofucopiranosil)-2-tiopseudourea así precipitado.

Etapa 4: Síntesis de cianometil-2,3,4-tri-O-acetil-tiofucopiranosido: Se sintetizó cianometil-2,3,4-tri-O-acetil-tiofucopiranosido según [Nishikawa M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Glycosylated cationic liposomes for carbohydrate receptor-mediated gene transfer. Meth Enzymol 2003; 373:384-399; y Lee YC, Stowell CP, Krantz ML. 2-Imino-2-metoxietilen 1-thioglicosides: new reagents for attaching sugars to proteins. Biochemistry 1976; 15:3956-3963]; con agitación continua, se disolvieron 12,3 mmol de bromhidrato de 2-S-(2,3,4-tri-O-acetil-tiofucopiranosil)-2-tiopseudourea en 3,1 ml de cloroacetónitrilo más 24 ml de agua/acetona 1:1 (v/v). Tras la obtención de una disolución casi transparente, se añadieron 14,3 mmol de carbonato de potasio y 24,9 mmol de bisulfato de sodio, y

se agitó la mezcla de reacción durante 30 min. a TA. Para la purificación, se evaporó esta mezcla, y se disolvió el residuo en acetato de etilo. El producto, cianometil-2,3,4-tri-*O*-acetil-tiofucopiranósido, se purificó posteriormente mediante un nuevo procedimiento desarrollado por Schwarz y Streicher. Brevemente, tras emplear cromatografía ultrarrápida (eluyente: acetato de etilo/toluol a 1:1), se combinaron las fracciones que contenían el producto, se evaporaron y se mantuvieron a 4°C durante la noche para permitir la cristalización.

Etapa 5: Desacetilación / Síntesis de 2-imino-2-metoxietil-1-tiofucopiranósido (IME-tiofucósido): Se realizó la desacetilación según [Kawakami S, Yamashita F, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated liposomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252:78-83; y Lee YC, Stowell CP, Krantz ML. 2-Imino-2-methoxyethylen 1-thioglycosides: new reagents for attaching sugars to proteins. *Biochemistry* 1976; 15:3956-3963], es decir se disolvieron 5 mmol de cianometil-2,3,4-tri-*O*-acetil-tiofucopiranósido en 18 ml de metanol y 2 ml de metóxido de sodio 0,1 M y se mantuvieron a TA durante la noche. Tras la evaporación de metanol, se usó el jarabe que contenía IME-tiofucósido resultante para acoplar este producto intermedio a *N*-(4-aminobutil)-(coleston-5-iloxil)formamida (véase la etapa 6, parte 2).

Etapa 6: Síntesis de coleston-5-iloxil-*N*-(4-((1-imino- β -D-tiofucosiletil)amino)butil)formamida: Esta etapa se realizó según [Nishikawa M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M Glycosylated cationic liposomes for carbohydrate receptor-mediated gene transfer. *Meth Enzymol* 2003; 373:384-399]. Parte 1: Se preparó *N*-(4-aminobutil)-(coleston-5-iloxil)formamida combinando 5,22 mmol de *N*-Boc-1,4-butanodiamina y 4,75 mmol de cloroformiato de colestero en 95 ml de cloroformo y agitando durante 24 h a TA. Se añadió gota a gota una disolución de 9,5 ml de ácido trifluoroacético en 24 ml de cloroformo, y se mantuvo la mezcla de reacción a 4°C durante 4 h mientras se agitaba. La evaporación del cloroformo y la eliminación del ácido trifluoroacético mediante co-evaporación con 100 ml de tolueno, dieron *N*-(4-aminobutil)-(coleston-5-iloxil)formamida, que se cristalizó añadiendo 15 ml de *n*-pentano. Parte 2: A continuación, se disolvieron 2,5 mmol del derivado de fucosa IME-tiofucósido en 20 ml de piridina anhidra y se añadieron 153 ml de trietilamina. Se obtuvo la mezcla de reacción final añadiendo posteriormente 1 mmol del derivado de colesterol *N*-(4-aminobutil)-(coleston-5-iloxil)formamida y manteniendo a TA durante 24 h. Tras la evaporación del disolvente y la co-evaporación con tolueno, se suspendió el material en 30 ml de agua destilada, se dializó frente a agua en un tubo de diálisis con un punto de corte de 12-kDa (2 días, 4°C), se liofilizó, y finalmente se lavó con dietil éter. La sustancia resultante, coleston-5-iloxil-*N*-(4-((1-imino- β -D-tiofucosiletil)amino)butil)formamida, se denomina adicionalmente Fuc-C4-Col. Por consiguiente, los otros derivados de azúcar sintetizados se denominan Man-C4-Col y Gal-C4-Col.

Encapsulación de lectina en liposomas dirigidos. Para encapsular concanavalina A (Con-A) conjugada con peroxidasa de rábano (HRPO), es decir, Con-A×HRPO (Sigma, St. Louis, MI, EE.UU.), se empleó un protocolo modificado según Gerber *et. al.* [Gerber CE, Bruchelt G, Falk UB, Kimpfler A, Hauschild O, Kuci S, Bachi T, Niethammer D, Schubert R. Reconstitution of bactericidal activity in chronic granulomatous disease cells by glucose-oxidase-containing liposomes. *Blood* 2001; 98:3097-3105]. Brevemente, se disolvió una mezcla lipídica de (DOPC:Col:Fuc-C4-Col), a una razón molar de 70:25:5 en diclorometano/metanol (1:2 v/v). Se eliminó el disolvente orgánico, y se secó el lípido a vacío. Para encapsular Con-A×HRPO en liposomas, se dispersó el lípido como una película en 1 ml de PBS (pH 6,3) que contenía 0,5 mg de ConA×HRPO. Esta dispersión se liofilizó $\times 5$ y luego se extruyó $\times 11$ a través de una membrana de policarbonato de 0,4 μ m y posteriormente $\times 21$ a través de una membrana de 0,2 μ m usando el dispositivo LiposoFast (Avestin, Ottawa, Canadá). Tras este procedimiento, no pudo excluirse que quedaran embebidas moléculas de Con-A×HRPO dentro de las membranas de los liposomas o que se adhirieran a su superficie exterior. En tal caso, la lectina podría interactuar con azúcares de superficie de células diana, lo que resulta desfavorable. Además, el tamaño de los conjugados de Con-A×HRPO (a pesos moleculares de 102 kDa para Con-A y 44 kDa para HRPO) supera el de los residuos de fucosilo (PM 102 Da) que se supone que actúan como los mediadores de direccionamiento reales en un factor de casi $\times 1500$. Por tanto, algunas moléculas de Con-A×HRPO exoliposómicos podrían invalidar completamente el mecanismo de direccionamiento. Por estos motivos, se sometió a tripsinización el sistema cargado con lectina durante 5 min. tras completar el procedimiento de encapsulación. Finalmente, se purificaron todas las preparaciones liposómicas (tabla 1) mediante cromatografía en gel en columnas de Sepharose 4B-CL (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y se mantuvieron a 4°C en la oscuridad hasta su uso.

Estudios de unión/captación celular. Se recogieron células maduras en el día 7 de cultivo separando el sedimento de células veladas no adherentes de los sobrenadantes y desprendiendo las células débilmente adherentes con EDTA al 1% en PBS durante 30 min. a 4°C; se obtuvieron células fuertemente adherentes aplicando suavemente un raspador de células (TPP). Se reunieron todas las fracciones, se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio 80/20 más FBS al 1% en hielo hasta su uso. Para las pruebas, se sembraron en placa 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 a células dendríticas, se incubaron las 2×10^5 MoDC por aparición en micropocillo (placas de microtitulación de 96 pocillos a 200 μ l/pocillo) en el mismo medio con liposomas a 50 μ M de lípidos a 37°C durante 1, 3 ó 24 horas, u otros tiempos y temperaturas, tal como se describe a continuación en el presente documento. Tras la incubación, se lavaron las células tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2; sin cationes bivalentes) y se analizaron mediante citometría de flujo.

Citometría de flujo. Puede emplearse citometría de flujo (i) para determinar el fenotipo de las células dendríticas

mieloides (denominadas adicionalmente CDm o CD) en diferentes momentos a lo largo de toda la diferenciación de CD estando las CDm infectadas o no con células trópicas M o T seleccionadas de VIH-1, y/o tratadas con el sistema de suministro dirigido por fucosa o liposomas control; y (ii) para determinar la coadministración de calceína/fármaco(s) a CDm infectadas o no infectadas. Se analizaron las CDm marcadas en un citómetro de flujo Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, CA) según las instrucciones del fabricante, inmediatamente tras (i) tinción indirecta con Acm primarios e IgG policlonales secundarios conjugados con 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (eBioscience) (Gieseler R *et al.*, In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes, *Dev Immunol* 6:25-39 [1998]); (ii) incubación con la preparación liposómica que contiene calceína respectiva; o (iii) incubación con controles negativos para tinciones con anticuerpos específicos o estudios de direccionamiento liposómico. Cuando se realizó la citometría de flujo sólo se evaluaron las células separadas para determinar la expresión de antígenos, así como para estudios de captación y direccionamiento liposómico. Brevemente, se separaron las células a través de transferencia puntual por dispersión directa y lateral para excluir desechos. Se establecieron histogramas para las células separadas, tal como resulta comúnmente adecuado para FITC y calceína, es decir, a longitudes de onda de excitación y emisión de $\lambda_{EX} = 488 \text{ nm}$ o $\lambda_{EM} = 525 \text{ nm}$, respectivamente. Se descargaron los datos y los histogramas correspondientes para las muestras de prueba y los controles se superpusieron y se analizaron con el software WinMDI 2.8 (J. Trotter; facs.scripps.edu). Se determinó la eficacia del direccionamiento directamente tras incubar las CDm (o, cuando se emplearon, los macrófagos generados durante 7 días en medio 80/20 complementado con suero de donante autólogo al 10% o FBS al 10%, con resultados similares) con el constructo de liposoma dirigido respectivo, o con controles negativos liposómicos, o tras emplear el anticuerpo IgG control de isotipo irrelevante MOPC-21/P3. Los resultados de los controles negativos que emplean liposomas cuya superficie se mantuvo deliberadamente desprovista de marcaje con hidratos de carbono fueron idénticos a los obtenidos con IgG control irrelevante. Por tanto, pudo excluirse una influencia a través de captación no específica de liposomas por las CDm. Para los análisis de citometría de flujo, se recogieron CDm inmaduras en el día 5 o el día 7. Se recogieron CD adherentes y no adherentes maduras en el día 7 o el día 8. También se recogieron los macrófagos en el día 7 o el día 8.

Leucocitos de sangre periférica (PBL). Se prepararon leucocitos mononucleares (MNL) tal como se describió anteriormente (Gieseler, R. *et al.*, In-vitro differentiation of mature dendritic cells from human blood monocytes, *Dev. Immunol.* 6:25-39 [1998]). Brevemente, se enriquecieron MNL de sangre completa diluida 1:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Cambrex, Walkersville, MD, EE.UU.) mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre Lymphoprep ($\rho = 1,077 \text{ g/cm}^3$; Nyegaard, Oslo, Noruega). Se recogieron y reunieron las capas leucocitarias y se eliminaron las plaquetas residuales mediante 3-4 lavados con PBS. Estos procedimientos implicaron varias etapas de centrifugación de 10 min. a 260 g y 4°C.

Separación magnética de células activadas (MACS) de monocitos. Se aislaron monocitos a través de separación magnética de células activadas negativa (MACS; Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Alemania) eliminando células $\text{CD}3^+$, $\text{CD}7^+$, $\text{CD}19^+$, $\text{CD}45\text{RA}^+$, $\text{CD}56^+$ e IgEm^+ con microperlas magnéticas recubiertas con Acm. Se realizó la separación de monocitos negativa, que se había elegido para evitar una activación indeseable de monocitos recién aislados, según las instrucciones del fabricante. Brevemente, el procedimiento implicó 2 lavados con PBS complementado con albúmina sérica bovina al 0,5% (BSA; calidad para cultivo celular, < endotoxina 0,1 ng/mg; ICN, Irvine, CA, EE.UU.) y EDTA 2 mM (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), y se hicieron pasar las células lavadas a través de una microcolumna magnética LS colocada en un campo magnético definido (Miltenyi), enriqueciendo de ese modo 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 CDm maduras e inmaduras a partir de monocitos de sangre periférica. Brevemente, se aislaron los monocitos mediante centrifugación en gradiente de densidad sucesiva de sangre completa diluida en PBS sobre Lymphoprep ($\rho = 1,077 \text{ g/cm}^3$) (Nyegaard, Oslo, Noruega) y, sucesivamente, mediante separación magnética de células negativa (MACS), según las instrucciones de los fabricantes (Miltenyi). Entonces se sembraron los monocitos a $1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ en placas de microtitulación de 96 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza). Según un protocolo generalmente aceptado anteriormente establecido, se empleó factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4) en el día 0 como factores de diferenciación básicos de CD, conduciendo así a una fase de CDm de captura de antígeno, inmaduro (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 & 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]). Sucesivamente, si se deseó, se obtuvieron CDm maduras añadiendo adicionalmente factor de necrosis tumoral (TNF)- α en el día 5 ó 6, conduciendo así a que las CDm pudieran iniciar la inmunidad dependiente de células T cooperadoras tanto Th1 como Th2 (Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D & Banchereau J. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*; 360:258-61 [1992]; Sallusto F & 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 & Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*; 392:245-52 [1998]).

Recogida de CD e incubación de liposomas. Se recogieron CDm y se incubaron preparaciones de liposomas a

diferentes concentraciones relativas (dependiendo del contexto experimental) durante 3 horas a temperatura ambiente. Se recogieron CDm adherentes y no adherentes inmaduras en el día 7 u 8. Se recogieron CDm adherentes y no adherentes maduras en el día 7 u 8. Para este fin, se recogió el medio de diferenciación, se centrifugó y se recogió la fracción de CD sedimentada de células veladas no adherentes. En segundo lugar, se desprendieron las CD adherentes de los pocillos incubándolas con PBS/EDTA durante 30 min. a 4°C, y empleando sucesivamente un raspador de células (también denominado “*rubber policeman*” (varilla de vidrio con punta de caucho). Se reunieron las CDm adherentes desprendidas con la fracción no adherente y se ajustó la combinación de ambas a los números de células requeridos y después se incubó con liposomas o anticuerpos control irrelevantes.

Tal como se describió anteriormente, se analizaron las CDm mediante citometría de flujo para determinar la expresión de CD1a, CD4, CD14, CD40, CD45RA, CD45R0, CD68, CD69, CD83, CD184, CD195, CD206 (receptor de manosa), CD207, CD208, y/o CD209 (DC-SIGN), con IgG1κ de ratón anti-ser humano (clon MOPC-21/P3) como control negativo (disponible de Serotec, Oxford, RU). Dependiendo de si sólo se empleó uno o dos Acm (también conocido como tinción directa frente a tinción indirecta), o bien se tiñeron los antígenos directamente con anticuerpos monoclonales (Acm) específicos de marcador conjugados con FITC o bien se tiñeron indirectamente con Acm primero no marcados más IgG policlonales secundarios x FITC (disponible de eBioscience).

Se empleó la inmunoglobulina MOPC-21/P3 como el control de isotipo de IgG1κ. Los resultados obtenidos con este anticuerpo sirvieron para tres fines, es decir (i) para verificar que las células diferenciadas *in vitro* mostraban fenotipos de CD genuinos; (ii) para definir sus diferencias fenotípicas y entre individuos; y (iii) para comparar la expresión de un marcador dado con el patrón de histograma presentado tras la incubación con liposomas dirigidos por el mismo anticuerpo.

Para la selección como diana de células, se incubaron alícuotas de suspensiones de CDm de al menos 5×10^4 CD (o, cuando se emplearon, macrófagos) con liposomas, a 0,1, 1,0 ó 10,0 µl por comienzo, durante 2 ó 3 horas a 37°C con agitación continua en un incubador, y luego se examinaron mediante citometría de flujo. Se obtuvieron resultados fiables y reproducibles mediante coincubación durante 2 h; se obtuvieron excelentes resultados de suministro de compuestos y selección como diana con la coincubación durante 3 h).

Cepas de VIH. Se obtuvieron cepas de VIH-1 del depósito de NIH (Rockville Pike, Bethesda, MD), es decir, VIH-1 Ada-M M-trópico (también conocido como trópico para CXCR5 o R5) y VIH-1 Lai T-trópico (también conocido como trópico para CCR4 o X4). Se propagaron las cepas de VIH tal como se facilita en la tabla 2 y se sometieron a prueba para determinar su dosis infectiva al 50% en cultivo tisular (TCID₅₀) según protocolos conocidos en la técnica. En referencia a los resultados de TCID₅₀, se diluyeron previamente de manera apropiada los sobrenadantes virales para su empleo posterior, se dividieron en alícuotas y se congelaron a - 70°C hasta que se emplearon para la infección a dosificaciones especificadas en la leyenda de la figura 11.

ELISA para el antígeno central p24 de VIH. Pueden someterse a prueba los sobrenadantes para determinar la presencia de p24 según las instrucciones del fabricante mediante un ELISA disponible comercialmente (Abbott Laboratories, Chicago, IL, EE.UU.).

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para VIH. Puede determinarse el grado de integración de ADN proviral de VIH en ADN huésped de células dendríticas mediante el uso de pares de cebadores anidados (semi-qPCR anidada) para determinar las secuencias provirales de VIH, tales como las 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: ID NO:3)	5'-cag-ctt-aga-gac-cat-caa-tga-gga-agc-5g-3' (5-FAM) //(SEQ
(éste es un cebador LUX, marcado con 5-carboxifluoresceína, es decir, “5” = 5-FAM)	
	5'-ggt-gca-ata-ggc-cct-gca-t-3' //(SEQ ID NO:4).

El aislamiento de ADN puede llevarse a cabo según las instrucciones del fabricante (“Easy-DNA-Kit”, en el protocolo n.º 3 “Small Amounts of Cells, Tissues, or Plant Leaves”, Invitrogen). La mezcla de reacción para PCR normalmente incluye el tampón siguiente (5 µl de 10X tampón Rxn para PCR, Invitrogen); MgCl₂ (3 µl de MgCl₂ 50 mM, Invitrogen); dNTP (1 µl de mezcla de dATP, dCTP, dGTP, dTTP: 10 µM, 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, Taq ADN polimerasa Platinum, Invitrogen); agua doblemente destilada (37 µl); muestra de ADN (2 µl). Un perfil de ciclado térmico convencional 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; mantenido a 4°C. La PCR se repite generalmente usando dos microlitros de ADN amplificado transferido de la primera reacción en mezcla de reacción de PCR reciente, excepto que se usan cebadores internos (SEQ ID NO:3 y

SEQ ID NO:4) en lugar de los cebadores externos, y empleando un perfil de ciclado térmico 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 desde 95°C hasta 55°C en etapas de 0,5°C).

- 5 En una muestra dada, puede lograrse la cuantificación del ADN mediante la comparación con una dilución en serie de una muestra de ADN de cantidad conocida de ADN proviral de VIH. Para permitir la cuantificación del ADN proviral de VIH de muestras con diferente contenido en ADN celular total (por ejemplo, de células dendríticas), puede realizarse una PCR multiplex. Brevemente, puede realizarse una segunda PCR anidada en la misma reacción, con un cebador LUX marcado con éster succidiminílico de 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, para una secuencia de cromosoma humano (equivalente genómico). Esto permite la cuantificación del contenido en ADN total por muestra. A partir de estos datos puede calcularse el número de copias provirales por equivalente de genoma humano.

Ejemplo 2. Fenotipado de células dendríticas mieloides

- 15 Se evaluaron células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) según su tamaño (dispersión directa) y granularidad (dispersión lateral) y por tanto se separaron como células T y B vírgenes; células T y células B activadas; y monocitos, incluyendo una pequeña proporción de células dendríticas de la sangre (datos no mostrados). Se sometieron a prueba células dendríticas mieloides derivadas de monocitos en cultivo (CDm o CD) para determinar la expresión de marcadores que delimitan su fase de desarrollo (madurez), así como para determinar los marcadores de subtipo de CDm. Las CD expresaban marcadores típicos para fenotipos de CD de piel y mucosa que se considera que desempeñan un papel fundamental en la infección por VIH. Cuando se infectan a través de la vía mucosa, las CDm de la mucosa son el primer tipo de células inmunitarias que se infecta directamente por VIH y (i) integran ocasionalmente su información genética como ADN proviral y/o (ii) fijan el VIH sobre su superficie mediante DC-SIGN y/o (iii) captan el VIH mediante cualquiera de diversos mecanismos para retener el virus en compartimentos intracitoplasmáticos (por ejemplo, endosomas). Tales células migran entonces a ganglios linfáticos regionales y locales cuando pasan del VIH a otros tipos celulares, lo más preferiblemente células T cooperadoras (también conocidas como "células CD4") así como otras células reservorio, incluyendo la siguiente generación de CDM con asentamiento en ganglios linfáticos en el transcurso del recambio continuo de CDm. A la luz de estos hechos, las CDm generadas en el sistema *in vitro* proporcionan un modelo ideal para evaluar la supuesta eficacia de direccionamiento *in vivo* a tales células.

- Se sometieron a prueba CDM maduras mediante un cultivo de 7 días con GM-CSF, IL-4 y posteriormente TNF- α mediante citometría de flujo para determinar la expresión de marcadores que se sabe que expresan las CDm o subpoblaciones de las mismas. Además de DC-SIGN (CD-209), se eligieron marcadores que delimitan CD maduras *in vitro* e *in vivo* (CD40, CD45R0, CD83), así como células dendríticas de la epidermis (CD1a) y la mucosa intestinal (CD4) y nasal (CD14). El fenotipado sirvió por tanto (i) para verificar las CDm generadas *in vitro* como inmaduras o maduras; (ii) para demostrar la fuerte expresión de DC-SIGN (CD209) y el receptor de manosa (CD206) como dianas preconcebidas para el suministro de compuestos inmunoliposómicos a las CDm; y (iii) para determinar si las CDMo generadas expresaban CD1a como un distintivo de las células de Langerhans de la epidermis y la mucosa *in vivo*.

- Las intensidades de fluorescencia medias relativas (Δ MFI) de las condiciones de prueba frente a controles negativos (n = 3) caracterizaron el perfil fenotípico de CDMo maduras como CD1a⁺⁺⁺, CD4[±], CD14^{± a+++}, CD40^{++ a+++}, CD45R0^{a+++}, CD83⁺ y CD209⁺⁺⁺ [siendo: (-), anticuerpo de prueba compatible con control negativo; (±), pico de Δ MFI \leq 5 por encima del control negativo; (+), pico de Δ MFI \leq 10 por encima del control negativo; y (+++), pico de Δ MFI $\times \geq$ 250 control negativo]. De todos los marcadores sometidos a prueba, la expresión de CD14 es la que varió más considerablemente entre los donantes. En cambio, DC-SIGN (CD209) y el marcador de células de Langerhans CD1a revelaron de manera sistemática alta expresión en todos los donantes examinados.

- Ejemplo 3. Selección como diana activa de las CDm con liposomas marcados en superficie con hidratos de carbono: estudios de captación por microscopía de fluorescencia, estudios de unión y captación por citometría de flujo y estudios de inhibición de VIH

- 55 En estudios de control iniciales, se inhibió completamente la unión celular de liposomas dirigidos por Fuc-4C-Col así como a Man-4C-Col mediante la adición de 100 mM de L-fucosa o D-manosa solubles libres (control positivo) a las células antes de su incubación con liposomas. Tal como se esperaba, la adición de D-galactosa (control negativo) fue ineficaz (todos los monosacáridos se adquirieron de Sigma, St. Louis, MI, EE.UU.). Estos controles (resultados no mostrados) demostraron que los liposomas marcados con fucosa y manosa se unían específicamente a las estructuras de selección como diana exocelulares previstas, es decir receptores de lectina de tipo C.

- Un miembro de la familia de CTL, denominado molécula de adhesión intercelular (ICAM)-3 específica de célula dendrítica no integrina de captura (DC-SIGN; CD209), se dirigió a células dendríticas derivadas de monocitos maduras e inmaduras a 37°C. Se logró una unión, una captación y un suministro intracelular de calceína encapsulada específicos de células dendríticas altamente eficaz, cuando se seleccionó como diana DC-SIGN con inmunoliposomas que portaban anticuerpos específicos frente a DC-SIGN. Aunque el suministro intracelular estaba

en su mayor parte limitado a endosomas, la calceína también pudo demostrarse en el citoplasma, pero no en el núcleo. Las variantes de inmunoliposomas dirigidos contra otras moléculas diana probables sobre las superficies celulares (CD1a, CD4, CD14, CD45R0, CD83, y combinaciones duales de las mismas) también investigadas revelaron una eficacia de selección como diana neta superior para inmunoliposomas específicos de DC-SIGN.

5 También se demostró una redundancia de membrana de liposomas específicos para DC-SIGN unidos de aproximadamente 2 horas antes de la captación. (Gieseler RK, Marquitan G, Halm MJ, Perdon LA, Driessen WH, Sullivan SM, Sclaro MJ. DC-SIGN-specific liposomal targeting and selective intracellular compound delivery to human myeloid dendritic cells: implications for HIV disease. *Scand J Immunol* 2004; 59:415-24).

10 La figura 1 muestra el aspecto morfológico básico de células dendríticas mieloides (CDm) humanas durante la diferenciación *in vitro*. Se tomaron fotomicrografías de contraste de fase en los días 3 (a), 5 (b), 7 (c, d). (a) En el día 3, tras la inducción de diferenciación mediante GM-CSF e IL-4, CDm con forma ovalada comenzaron a desarrollar velos de membrana y proyecciones de membrana delgadas (flechas) (ampliación original x400). (b) En el día 5, la mayor parte de las CDm inmaduras habían adoptado una morfología estirada y expresaban proyecciones de membrana (es decir, dendritas), aunque todavía están presentes células con forma ovalada. Incluso en esta fase inmadura, algunas de las CDm se asocian para formar pequeñas agrupaciones homotípicas (flechas) (ampliación original x180). (c) Sin embargo, con la inducción de maduración de CDm mediante TNF- α en el día 5, las CD completamente maduras generalmente se asocian en forma de grandes agrupaciones homotípicas en el día 7. La fuerte agrupación mediante moléculas de adhesión expresadas *de novo* indica que las CDm han alcanzado su madurez funcional completa. Obsérvense las abundantes proyecciones filiformes que señalan hacia fuera de la agrupación (flechas). Cuando se ubican en un órgano linfóide, tales dendritas establecen contacto íntimo con células T para la estimulación específica de antígeno en agrupaciones heterotípicas de CDm-células T (ampliación original x180).

25 Aunque esta serie de acontecimientos representa el transcurso de la diferenciación de las CDm en la mayor parte de donantes sanos, los monocitos obtenidos de una parte minoritaria de donantes responden de manera diferente a las mismas condiciones microambientales. De manera específica, probablemente debido a la predisposición genética, las células de algunos donantes expresan menos dendritas y/o forman agrupaciones más pequeñas, pero más numerosas. Un ejemplo se representa en (d) a x50 de aumento de un pocillo de microtitulación completo. Además, en casos muy poco frecuentes, no se produce en absoluto la diferenciación de CDm y en cambio se desarrollan macrófagos; esto puede deberse a señales de cebado fundamentales que actúan sobre los monocitos en el donante respectivo, por ejemplo, en caso de una infección en curso. De manera importante, los estudios de selección como diana en células dendríticas mieloides humanas se llevaron a cabo en CDm tras la ruta de diferenciación regular observada en aproximadamente el 80-90% de los casos en presencia de GM-CSF/IL-4 y TNF- α secuencial.

35 La figura 2 muestra secciones ópticas en serie a través de células dendríticas mieloides (CDm) inmaduras seccionadas como diana con liposomas marcados con fucosa que suministran el colorante trazador calceína. Las CDm inmaduras generadas durante 5 días con GM-CSF e IL-4 se desprendieron del sustrato mediante EDTA y se incubaron durante 3 h con agitación continua a 37°C con liposomas dirigidos por Fuc-C4-Col que suministran el colorante trazador fluorescente verde calceína. Se contratiñeron las células con colorante DAPI nuclear azul y se fijaron. (a-1) Las superposiciones de microscopía de fluorescencia de secciones en serie (etapas de ~1 μ m) representan la captación del sistema por dos CDm que representan las tasas de captación inferior y superior observadas. En la CDm de la izquierda, la calceína estaba confinada principalmente en los endosomas (por ejemplo, c; flecha), con débil tinción citoplasmática ocasional (por ejemplo, superpuesta al núcleo en el marco g; flecha). En cambio, la CDm de la derecha reveló tinción brillante de ambos endosomas (fluorescencia destacada, por ejemplo, c, f) y citoplasma (por ejemplo, b). Cuando se comparan números de células mayores, todas las CDm de todos los donantes sometidos a prueba (n = 3) habían internalizado el sistema dirigido por fucosa. Tal como resulta evidente a partir de la tinción azul, la carga útil de los liposomas nunca se suministró al núcleo. Los controles positivos dirigidos por Man-C4-Col se captaron de manera menos eficaz y los controles negativos dirigidos por Gal-C4-Col no se unieron y/o internalizaron (no mostrado). Ampliación original x400.

La figura 3 muestra la unión y captación de liposomas marcados con manosa mediante CDm inmaduras tras 5 días de cultivo. El grado de unión o captación se representa en dos donantes (A, fila superior; B, fila inferior) mediante comparación de fotomicrografías de contraste de fase (columna de la izquierda) y fluorescencia (columna de la derecha). En ambos casos, y a diferencia de los liposomas marcados con fucosa, sólo menos del 50% de las células revelaron el colorante trazador, calceína, dentro de liposomas unidos a su superficie o internalizados tras incubación de 3 horas. Aunque algunas CDm positivas para trazador mostraron captación intracelular (B1, B2: círculos superiores y centrales), otras todavía sólo revelaron unión de superficie sin captación (A1, A2 y B1, B2: círculos inferiores) tras la incubación prolongada. En CDm inmaduras, la selección como diana mediante liposomas marcados con Man-C4-Col no sólo alcanzaron por tanto muchas menos CDm que lo observado cuando se empleó el sistema de suministro dirigido por Fuc-C4-Col (compárese también con citometría de flujo), sino que el sistema dirigido por manosa también fue captado de manera mucho menos eficaz mediante endocitosis mediada por receptor. Sin embargo, el direccionamiento con manosa fue igualmente eficaz en macrófagos, probablemente debido a la expresión superior de la lectina de tipo C receptora de manosa (CD206) de estas células (no mostrado). La incubación con liposomas de control negativo marcados con Gal-C4-Col nunca condujo a unión de superficie ni captación intracelular (no mostrado). Las flechas en las micrografías de contraste de fase A1 y B1 señalan células

que habían muerto durante el cultivo, tal como resulta evidente por la formación de vesículas en sus membranas de superficie. Aunque una célula muerta ocasional reveló tinción de calceína no específica (A1, A2: círculos superiores), generalmente no se observó unión no específica de liposomas marcados por fucosa, manosa o galactosa a células muertas en este punto de tiempo (compárense las células en recuadro colocadas exactamente con barras equidistantes en B1 y B2).

La figura 4 muestra la selección como diana específica de lectina de tipo C de CDm maduras agrupadas. Las agrupaciones homotípicas de CDm maduras tras un cultivo de 7 días en presencia de GM-CSF, IL-4 y TNF- α habitualmente son de forma redondeada global y pueden comprender varios cientos de células (véase la figura 1). Las agrupaciones se disgregan parcialmente tras el procesamiento de células cultivadas antes de la incubación con el sistema de direccionamiento. Sin embargo, debido a la estrecha unión de las CDm maduras a través de moléculas de adhesión (por ejemplo, ICAM-1, ICAM-3, LFA-1), fragmentos de tales agrupaciones permanecen físicamente intactos. La fotomicrografía de fluorescencia grande muestra un fragmento de este tipo que comprende varias CDm estrechamente asociadas tras una incubación de 3 horas con liposomas marcados con Fuc-C4-Col. Con un perfilado azul fino que marca el contorno de este fragmento, se enumera cada célula individual en su lado inferior derecho en sentido horario en espiral hacia el interior. Las 17 CDm contadas muestran al menos tinción citoplasmática débil mediante calceína suministrada por liposomas. En la mayoría de los casos, los endosomas teñidos resaltan por su fluorescencia destacada brillante, deslumbrante. El colorante trazador nunca tiñó los núcleos de las células (cuando eran visibles), tal como se indica mediante flechas. Las CDm maduras generalmente revelaron una captación inferior tras la selección como diana de la observada en CDm inmaduras (véase la figura 2 y los resultados de la citometría de flujo). El sistema dirigido por fucosa alcanzó por tanto todas las CDm maduras pese a su estrecha asociación física. Lo mismo puede esperarse por tanto para CDm agrupadas homotípicamente, así como para CDm dentro de agrupaciones heterotípicas de CDm-células T en tejidos y órganos linfoides *in vivo*. Ampliación original x400. Tal como se representa en el inserto pequeño, las CDm individuales de cultivos de 7 días mostraron más a menudo captación intensa de liposomas dirigidos por fucosa y suministro de calceína. El núcleo con forma irregular típico de la CDm con perfilado rojo está completamente separado del suministro de calceína. Los liposomas dirigidos unidos probablemente a receptores de lectina de tipo C de superficie (con perfilado azul) se indican mediante flechas. Ampliación original x1000.

De manera importante, una parte sistemática de las CDm inmaduras representadas en la figura 2 así como las CDm maduras mostradas en la figura 4 expresaban el marcador de las células de Langerhans CD1a (véase la citometría de flujo). Tales células corresponden a subconjuntos de CDm de la mucosa y la epidermis infectadas en primer lugar tras la transmisión sexual del VIH. A la inversa, otra parte de las CDm no expresaba CD1a (véase la citometría de flujo), correspondiendo por tanto a otros subconjuntos de CDm sistémicas y linfoides. Finalmente, las CDm maduras (figura 4) expresaban el marcador CD83 de la superfamilia de inmunoglobulinas expresado de manera sistemática por CDm maduras ubicadas en los órganos linfoides. Todos estos tipos de CDm se seleccionaron como diana satisfactoriamente para suministro citoplasmático y endosómico intracelular de un compuesto encapsulado. Por tanto, estos resultados indican fuertemente que todos los subconjuntos de CDm periféricas y linfoides pueden seleccionarse como diana de manera eficaz con un sistema marcado con Fuc-4C-Col para suministro intracelular de un compuesto terapéutico.

La figura 5 muestra la unión y captación de liposomas marcados con fucosa mediante macrófagos humanos tras 7 días de cultivo. Antes de la incubación, los macrófagos se desprendieron del sustrato mediante tratamiento con EDTA/tripsina y luego se mantuvieron con agitación continua para evitar que volvieran a unirse firmemente, de modo que se permitiera su transferencia posterior a portaobjetos. (a-h) Secciones ópticas en serie a través de un macrófago representativo revelaron, ya tras 2 horas de incubación con liposomas marcados con Fuc-C4-Col, abundante tinción intracelular confinada a endosomas mediante el colorante trazador, calceína, suministrado por el sistema de direccionamiento. A diferencia de las células dendríticas mieloides, la tinción citoplasmática (es decir, suministro liposómico) fue mucho menos evidente en macrófagos. Los liposomas marcados con Man-C4-Col tenían una eficacia de direccionamiento comparable (no mostrada). La incubación con el control negativo marcado con Gal-C4-Col sólo condujo a captación menor por un macrófago ocasional (no mostrado). En el caso representado aquí, las células se generaron en presencia de suero de donante autólogo al 10%. Ampliación original x1000.

La figura 6 es una fotomicrografía de fluorescencia en color de un macrófago representativo de un donante diferente 2 horas tras el direccionamiento con liposomas marcados con fucosa. En este caso, los macrófagos se diferenciaron durante 7 días en presencia de suero bovino fetal (FBS) xenogénico al 10%. En tales condiciones, los resultados de unión y captación fueron idénticos a los obtenidos con macrófagos generados con suero autólogo, incluyendo los resultados tras direccionamiento con los sistemas control positivo (Man-C4-Col) y negativo (Gal-C4-Col). La diferenciación dependiente de FBS puede emplearse por tanto *in vitro* para estudios de direccionamiento de macrófagos. Sección media. Ampliación original x1000.

De manera importante, estos resultados mostraron que el sistema de suministro liposómico dirigido por fucosa también se internalizaba de manera eficaz por los macrófagos representando un sistema de células que, como en la enfermedad por VIH, constituye el principal reservorio celular infeccioso del tracto gastrointestinal y, quizá del cerebro.

La figura 7 muestra secciones ópticas en serie a través de un monocito seleccionado como diana con liposomas marcados con Fuc-4C-Col que suministran el colorante trazador calceína. Se incubaron monocitos de sangre periférica recién aislados durante 3 h con agitación continua a 37°C con liposomas marcados con Fuc-C4-Col que suministran el colorante trazador fluorescente verde, calceína. Se contratiñeron las células con el colorante DAPI nuclear azul y se fijaron. (a-f) Las superposiciones de microscopía de fluorescencia verdes/azules de secciones en serie (etapas de ~1,5 mm) representan la captación del sistema por un monocito representativo (obsérvese la forma nuclear típica). En los monocitos, la distribución intracelular de calceína como la carga libre del sistema dirigido fue idéntica a la observada en las CDm. El compuesto fluorescente se concentró en los endosomas de las células (tal como resulta más evidente en los marcos c, d, y e; fluorescencia destacada), así como, de manera más difusa, en el citoplasma de los monocitos (es decir, todas las micrografías en serie), pero nunca dentro de sus núcleos. Además, tal como se encontró para las CDm, también todos los monocitos de todos los donantes sometidos a prueba (n = 3) habían internalizado el sistema dirigido por fucosa. De nuevo la captación de los controles positivos dirigidos por Man-C4-Col fue menos eficaz y los controles negativos dirigidos por Gal-C4-Col no se unieron y/o internalizaron en absoluto (no mostrado). Ampliación original x400.

De manera importante, estos resultados muestran que, además de alcanzar las células dendríticas mieloides y los macrófagos, el suministro dirigido mediado por fucosa de un compuesto terapéutico puede lograrse también para monocitos. Esta conclusión puede tener un profundo impacto cuando se considera que los monocitos, tal como se explicó anteriormente, potencialmente son el primer tipo celular derivado de linaje mielóide que va a reclutarse como reservorio infeccioso para el VIH y otros agentes infecciosos. De hecho, el caso de que los monocitos se seleccionaran como diana de manera tan eficaz por un sistema específico de lectina de tipo C subraya la importancia de esta ruta para la captación de agentes infecciosos y la posterior formación de reservorios intracelulares infecciosos de manera crónica en una multitud de descendientes monocíticos fisiológicos y patológicos.

La figura 8 muestra que el sistema de suministro de compuestos dirigido por fucosa es altamente específico y tiene una eficacia de direccionamiento extremadamente alta. Cuando se emplean células dendríticas mieloides tanto maduras como inmaduras como poblaciones reservorio importantes para VIH y otros agentes infecciosos, el direccionamiento por fucosa fue el más eficaz en CDm inmaduras. La unión o captación de liposomas marcados con hidratos de carbono que suministran calceína se representa como histogramas rellenos superpuestos con histogramas vacíos de tinción de fondo con liposomas no marcados por azúcares que se unen a células de manera no específica. La eficacia de unión de los liposomas de control negativo marcados con Gal-C4-Col nunca difirió de la de los liposomas de control no específicos, verificando de ese modo la correcta elección del marcaje con galactosa como control negativo. En cambio, los liposomas marcados con fucosa y manosa mostraron diferentes grados de direccionamiento y/o captación de superficie celular específicos. Cuando se comparó con el control positivo de Man-C4-Col, el sistema dirigido por Fuc-C4-Col reveló la eficacia de unión muy superior en CDm inmaduras. En ambos donantes, en una escala logarítmica (abscisas), la eficacia de direccionamiento de los liposomas marcados con fucosa superó a la del control positivo en un orden de magnitud. La selección como diana específica de CDm maduras fue dependiente del donante, porque algunos individuos, tales como el donante A, producen CDm maduras que expresan sólo bajos niveles de lectinas de tipo C. Sin embargo, la mayoría de los donantes, por ejemplo el donante B, revelan al menos densidades de membrana medias de tales moléculas (véase también la figura 10), de modo que su expresión total neta permite el direccionamiento eficaz con un sistema de suministro liposómico marcado con Fuc-4-Col. No obstante, incluso la baja unión a CDm maduras en tales individuos puede aumentarse significativamente mediante concentraciones superiores de este sistema (véase la figura 9).

La figura 9 muestra que concentraciones aumentadas de liposomas marcados con fucosa seleccionan como diana tanto CDm inmaduras como maduras de manera altamente eficaz. Empleando los mismos controles positivos y negativos (véase la leyenda de la figura 8), se incubaron CDm inmaduras y maduras con diferentes concentraciones del sistema dirigido por Fuc-C4-Col. Este experimento se llevó a cabo con dos donantes (C y D) en los que una baja concentración del sistema de direccionamiento (fila inferior) alcanzó de manera eficaz las CDm inmaduras, pero no las maduras. Sin embargo, cuando se aumentó la concentración del sistema en factores de x10 o x100, respectivamente (filas central y superior), las CD inmaduras se seleccionaron como diana de manera altamente eficaz. La concentración media se aplicó en los experimentos representados en la figura 2 y la figura 4. Las flechas de la fila central (donante C) indican posiciones aproximadas de las dos células mostradas en la figura 2 que representan el espectro celular de eficacia de unión y captación del sistema de direccionamiento con Fuc-4C-Col en estas condiciones. Consideradas juntas, ambas células que expresan densidades de membrana de superficie alta y baja de receptores de lectina de tipo C pueden abordarse satisfactoriamente con este sistema de suministro de compuestos dirigido.

La figura 10 representa el fenotipado de células dendríticas mieloides inmaduras y maduras. Las células positivas para marcador se representan como histogramas rellenos y se superponen con histogramas vacíos indicando tinción de fondo con anticuerpo control irrelevante negativo. Las zonas grises a la izquierda del punto de corte de control negativo reflejan la parte de células que no expresan un marcador dado; las zonas grises a la derecha del punto de corte expresan el marcador (tal como se muestra a modo de ejemplo en el gráfico que muestra la expresión de CD1a en CDm inmaduras del donante A). Las abscisas indican intensidades de fluorescencia logarítmicas de marcaje celular con anticuerpos secundarios conjugados con FITC tras añadir anticuerpos monoclonales primarios

que reconocen el marcador respectivo. DC-SIGN y el receptor de manosa como representantes típicos de lectinas de tipo C expresadas por las CDm se expresan ambos de manera más pronunciada en CDm inmaduras que en maduras. Las variaciones individuales son evidentes. Las CD inmaduras *in vivo* residen en tejidos y órganos no linfoides periféricos. Aquí, la fuerte expresión de tales moléculas de superficie garantiza la capacidad de las células para unirse e ingerir muchos patógenos. Una vez que han migrado a los tejidos y órganos linfoides, las CDm maduras regulan por disminución la expresión de lectina de tipo C, pero habitualmente conservan densidades de membrana medias de estos marcadores de direccionamiento. De manera notable, por lo que se sabe actualmente, las CDm generalmente expresan al menos cuatro lectinas de tipo C de superficie diferentes (DC-SIGN, DEC-205, MR y DLEC), de modo que la expresión total neta de tales moléculas siempre permite el direccionamiento eficaz con un sistema de suministro liposómico marcado con fucosa. De manera similar, los macrófagos pueden seleccionarse como diana en todas sus fases de desarrollo, ya que revelan una alta expresión de manera sistemática del receptor de manosa (no mostrado). También puede inducirse que estas células expresen otras lectinas de tipo C tales como DC-SIGN. La expresión de CD83 indica el estado maduro de las CDm. *In vivo*, la expresión de CD1a es indicativa de subconjuntos de CDm de células de Langerhans (que por tanto también expresan langerina como quinta lectina de tipo C) ubicados en las mucosas y la epidermis. Obsérvese que tanto las CDm inmaduras como las maduras, en todo momento, comprendían un espectro de células negativas para CD1a a fuertemente positivas para CD1a, cubriendo por tanto un espectro correspondiente de CDM de tipo células no de Langerhans a de Langerhans. Los liposomas marcados con Fuc-C4-Col suministraban de manera satisfactoria calceína de manera intracelular a todos estos subtipos (véanse las figuras 2, 4), indicando por tanto su alto potencial como sistema para suministrar compuesto(s) terapéutico(s) a sitios endosómicos e intracitoplasmáticos.

La figura 11 muestra los cambios morfológicos en las CDm tras un cultivo de 8 días de CDm infectadas por VIH con o sin tratamiento de direccionamiento. I. Aspecto del cultivo y agrupación homotípica de CDm. Las células se diferenciaron en presencia de GM-CSF/IL-4 (día 0) y TNF- α secuencial (día 5). En los días 2, 4 ó 6, se infectaron las CDm con la cepa M-tópica de VIH-1, Ada-M, o con la cepa T-tópica de VIH, Lai, respectivamente. Las dosis infectivas para cultivo tisular para el 50% de las células fueron I. VIH-1 Ada-M: 67 x TCID50 (es decir, 1 ml de disolución madre de virus + 199 ml de medio de cultivo); y II. VIH-1 LAI: 6,7 x TCID50 (es decir, 0,1 ml de disolución madre de virus + 199,9 ml de medio de cultivo). Los resultados se obtuvieron barriendo todas las zonas de cuatro pocillos de cultivo separados para cada situación. Se evaluó la agrupación homotípica de CDm como criterio que indica la integridad funcional de estas células en el día 8; los resultados se facilitan como valores semicuantitativos y absolutos (redondeados). Un día tras la infección con la cepa respectiva, las CDm se trataron con liposomas dirigidos por Fuc-4C-Col que suministran concanavalina A (Con-A). Este retardo en el tiempo permitió que las células formaran reservorios intracelulares de VIH. Tal como resulta evidente, en ambos tipos de infección por VIH-1, y en todas las condiciones sometidas a prueba, se normalizó el comportamiento de agrupamiento. Puesto que el agrupamiento homotípico y heterotípico de CDm se regula por incremento por el VIH con la infección (Sol-Foulon N, Moris A, Nobile C, Boccaccio C, Engering A, Abastado JP, Heard JM, van Kooyk Y, Schwartz O. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity* 2002; 16:145-55), estos resultados demuestran indirectamente la eliminación satisfactoria del VIH (véase también la figura 12).

La figura 12 muestra los cambios morfológicos en las CDm tras un cultivo de 8 días de CDm infectadas por VIH con o sin tratamiento dirigido. II. Tipos de CDm y viabilidad. Todas las condiciones para generar las CDm, la infección con VIH-1, el tratamiento dirigido son tal como se facilitan en la leyenda de la figura 11. Los resultados se obtuvieron barriendo todas las zonas de cuatro pocillos de cultivo separados para cada situación. La tasa de mortalidad aumentada de las CDm con la infección con VIH-1 se normalizó tras el tratamiento con liposomas dirigidos por fucosa que suministran Con-A. Obsérvese que el procedimiento de lavado tras el tratamiento liposómico durante 3 horas eliminó las células muertas acumuladas tras la infección de las CDm. Los cultivos, por tanto, en ocasiones comprenden números de células significativamente reducidos cuando se comparan con cultivos no infectados en el mismo punto de tiempo dado, lo que, a través de concentraciones inferiores de señales autocrinas de auto-acondicionamiento, puede afectar a la razón relativa de morfologías de CDm. No obstante, el cambio relativo entre tipos de CDm como células veladas y dendriformes tras la infección por VIH se normalizó en su mayor parte tras el tratamiento. Estos resultados demuestran de nuevo indirectamente la eliminación satisfactoria del VIH.

Tabla 1. El sistema de direccionamiento de Fuc-4C-Col y preparaciones control.

Condiciones	Marcaje de superficie del liposoma				Carga útil intraliposómica		
	Fuc	Man	Gal	Ninguno	Con-A	Calceína	Ninguna
A Direccionamiento celular dependiente de fucosa							
Sistema de direccionamiento completo	+	-	-	-	+	-	-
Seguimiento para captación y ubicación	+	-	-	-	-	+	-
Control negativo por lectina	+	-	-	-	-	-	+

	Condiciones	Marcaje de superficie del liposoma				Carga útil intraliposómica		
		Fuc	Man	Gal	Ninguno	Con-A	Calceína	Ninguna
B	Direccionamiento celular dependiente de manosa							
	Control positivo de direccionamiento en superficie	-	+	-	-	+	-	-
	Seguimiento para captación y ubicación	-	+	-	-	-	+	-
	Control negativo por lectina interna	-	+	-	-	-	-	+
C	Direccionamiento celular dependiente de galactosa							
	Control negativo de direccionamiento en superficie	-	-	+	-	+	-	-
	Seguimiento para captación y ubicación	-	-	+	-	-	+	-
	Control negativo por lectina interna	-	-	+	-	-	-	+
D	Sin azúcar de superficie presente							
	Control para captación no específica	-	-	-	+	+	-	-
	Seguimiento para captación y ubicación	-	-	-	+	-	+	-

5 Tabla 2. Propagación de cepas de VIH-1 M-(RS-) y T-(X4-). Se obtuvieron VIH-1 Lai y VIH-1 Ada-M del depósito de NIH. Se muestran las condiciones para propagar reservas altamente infecciosas de estas cepas. Tales reservas se generaron o bien en células mononucleares de sangre periférica (PBMNL) no separadas o bien en monocitos (MO) enriquecidos mediante MACS durante 14 días, cultivándose ambas en matraces de 75 cm² ("T75"). En algunos casos, se emplearon células reunidas de cuatro donantes, creando de ese modo condiciones de cultivo de leucocitos mixtos para estimular la generación, y aumentar por tanto las concentraciones de sobrenadantes, de citocinas para activar las células y provirus potencialmente integrados. La propagación de VIH-1 Lai T-trópico implicó la adición de fitohemaglutinina, tipo M (PHA). La propagación de VIH Ada-M M-trópico se logró en presencia de Polybrene (PB). Se infectaron los cultivos de PBMNL posteriores con los sobrenadantes que contenían el virus recogido, y tras una semana de cultivo, se determinaron las dosis infectivas al 50% del cultivo tisular (TCID₅₀) de ambas cepas según métodos conocidos en la técnica. VIH-1 Ada-M y VIH-1 Lai se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su uso.

15

EXP n.º	Cepa de VIH	Donante	PBMNL	MO	PHA	PB
I.1	VIH-1 Lai	1	+	-	+	-
I.2		2	+	-	+	-
I.3		3	+	-	+	-
I.4		4	+	-	+	-
I.5		1+2+3+4 ¹	+	-	+	-
II.1	VIH-1 Ada-M	1	-	+	-	+
II.2		2	-	+	-	+
II.3		3	-	+	-	+
II.4		4	-	+	-	+
II.5		1+2+3+4 ¹	-	+	-	+

¹ A razones idénticas, es decir, empleando el 25% de células de cada donante sano.

Los datos presentados en el presente documento, incluyendo las figuras y las tablas comentadas anteriormente que se incorporan en el presente documento como referencia, indican que un sistema de suministro liposómico dirigido por fucosa-(Fuc-4C-Col) puede dirigir de manera específica y altamente eficaz diferentes poblaciones reservorio de VIH, incluyendo monocitos, células dendríticas mieloides y macrófagos, para suministrar compuestos de cualquiera o todos los tipos conocidos en la actualidad, o que van a conocerse en el futuro, lo que permite la interferencia con el VIH u otros agentes infecciosos. Según la presente invención, estas poblaciones reservorio, así como poblaciones reservorio y no reservorio adicionales descritas en el presente documento pueden seleccionarse como diana con este sistema de direccionamiento de la invención o con un sistema funcionalmente relacionado, tal como uno que presente, por ejemplo, marcadores de membrana de poli-fucosa como mediadores de direccionamiento celular presumiblemente incluso más eficaz.

De manera importante, la alta eficacia de direccionamiento se logró en presencia de lectina de unión a manosa o manano (MBL) portada por suero que muy probablemente, como sustancia derivada del hígado (Downing, I *et al.*, Immature dendritic cells possess a sugar-sensitive receptor for human mannan-binding lectin, *Immunology* 2003; 109:360-4), constituye un componente de la pequeña cantidad de suero bovino fetal empleado durante el cultivo y la incubación. También se ha demostrado que la MBL se secreta de manera autóloga por CDMo humanas inmaduras (Downing I *et al.*, Immature dendritic cells possess a sugar-sensitive receptor for human mannan-binding lectin, *Immunology* 2003; 109:360-4). Además, la MBL, a través de su propio dominio de lectina de tipo C, puede evitar que el VIH-1 se una a DC-SIGN (Spear GT *et al.*, Inhibition of DC-SIGN-mediated trans infection of T cells by manose-binding lectin, *Immunology* 2003; 110:80-5). Por tanto, la MBL soluble (y otras moléculas no identificadas que presentan potencialmente tales características) no evitó que los liposomas específicos para CTL/CTLD de la invención interaccionaran con la lectina de tipo C unida a membrana.

Mediante el empleo de un trazador atrapado en liposomas, calceína, se demostró una eficacia de direccionamiento superior para lectinas de tipo C mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. La microscopía de fluorescencia reveló adicionalmente captación intracelular y unión de superficie dependiente del tiempo de liposomas específicos de lectina de tipo C por CDM tanto maduras como inmaduras. Estos resultados revelan claramente la unión, internalización y suministro de compuestos intracelulares eficaces. Los datos muestran que los inmunoliposomas marcados con fucosa suministran su contenido a CDM maduras e inmaduras, a monocitos y a macrófagos, y que, además de su distribución citoplasmática más débil, su contenido se acumula fuertemente en el sistema endosómico/lisosómico intracelular. Estas observaciones, junto con el hecho de que el VIH y los liposomas administrados son de tamaño comparable, permiten que el sistema de suministro de la invención alcance exactamente los mismos compartimentos en los que el VIH altamente infeccioso se almacena y queda a salvo de cualquier ataque sistémico hasta que se libera para infectar más células. Los agentes terapéuticos suministrados adecuados, según la presente invención, alcanzarán por tanto un importante santuario que todavía no se ha abordado por ninguna estrategia terapéutica. Otro beneficio importante es que, debido al hecho de que estos liposomas quedan retenidos en la superficie de las CDM durante tiempos prolongados, también se puede alcanzar a los subconjuntos de células T que interaccionan con las CD dentro de tejidos y órganos linfoides en el transcurso de la estimulación específica de antígeno para inducir un(os) efecto(s) terapéutico(s) en estas células no reservorio.

Por tanto, si se administran mediante cualquiera o todas las vías de aplicación dirigidas a médula ósea, intracutáneas, subcutáneas, intraperitoneales, intraplacentarias o intrauterina, u otras vías de aplicación previstas, los métodos y productos de la invención ofrecen el beneficio de direccionamiento, a través de receptores de lectina de tipo C o receptores que presentan dominios similares a lectina de tipo C, a aquellas células reservorio que aparentemente desempeñan un papel clave en la transmisión dentro de un individuo, así como entre individuos (por ejemplo transferencia de VIH de madre a hijo, también conocida como transmisión vertical) del VIH y otros agentes infecciosos de manera crónica, así como a células no reservorio que replican activamente el VIH u otro agente infeccioso (figura 13). De manera similar, los mismos resultados pueden permitir el direccionamiento de lectinas de tipo C restringidas de manera regional (por ejemplo, restringidas de manera gastrointestinal o hepática) implicadas en enfermedades no infecciosas crónicas, de modo que se suministre un(os) agente(s) terapéuticamente activo(s) o se permitan/mejoren enfoques novedosos para vacunación. El potencial inherente global de la tecnología se representa en la figura 14.

55 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Let There Be Hope Medical Research Institute (Cesionario)

Gieseler, Robert K. (Inventor)

60 Marquitan, Guido (Inventor)

Scolaro, Michael J. (Inventor)

65 Schwarz, Andreas (Inventor)

<120> LIPOSOMAS DERIVATIZADOS CON HIDRATOS DE CARBONO PARA LA SELECCIÓN COMO DIANA DE DOMINIOS DE RECONOCIMIENTO DE HIDRATOS DE CARBONO CELULARES DE LECTINAS CTL/CTLD, Y SUMINISTRO INTRACELULAR DE COMPUESTOS TERAPÉUTICAMENTE ACTIVOS

5 <130> 23046-81260
 <140> No cedido
 <141> 21-03-2005
 10 <150> 60/554.790
 <151> 19-03-2004
 15 <160> 4
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 <210> 1
 20 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 1
 agtgggggga catcaagcag ccatgcaaat 30
 35 <210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador
 <400> 2
 tcatctggcc tgggcaa 18
 50 <210> 3
 <211> 28
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador, marcado con 5-carboxifluoresceína
 <400> 3
 65 cagcttagag accatcaatg aggaagcg 28

<210> 4

<211> 19

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador

15

<400> 4 19

ggtgcaatag gcctgcat

19

REIVINDICACIONES

1. Uso de un complejo de lípido-agente activo que comprende el agente activo y que comprende además al menos un ligando de direccionamiento en la superficie externa del complejo de lípido-agente activo que se une a un grupo/familia de marcadores en la superficie de una célula reservorio para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una infección provocada por un agente infeccioso, o para la prevención o el tratamiento de una enfermedad crónica degenerativa o maligna no infecciosa, en el que dicho ligando de direccionamiento es fucosa, polifucosa o un derivado de polifucosa, en el que la célula reservorio es una célula dendrítica, una célula precursora asociada al linaje mielóide premonocítico, un monocito, un macrófago o una célula T, y en el que la composición farmacéutica es para su administración por una vía transvascular, una vía subcutánea, una vía intradérmica, una vía dirigida a la médula ósea, una vía intraplacentaria, una vía intrauterina, vía intrahepática, una vía intraperitoneal o una vía parenteral.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que el agente infeccioso es un virus, bacteria, hongo o protozoo.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que el virus se selecciona del grupo que consiste en VIH-I, VIH-2, VHC, CMV, VHS, VEB, VPH, virus influenza y virus del Ébola.
4. Uso según la reivindicación 2, en el que la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium spec.*
5. Uso según la reivindicación 2, en el que el protozoo se selecciona del grupo que consiste en *Leishmania amastigotes* y las fases de maduración diferenciadas del ciclo de vida de *Plasmodium*.
6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el complejo de lípido-agente activo es un complejo de agente activo frente a liposomas.
7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente activo es una lectina vegetal, un fármaco antiviral, un fármaco anti-VIH, un fármaco anticancerígeno, un agente citotóxico, un inhibidor de la apoptosis, un fármaco antifúngico, un fármaco antibacteriano o un agente inmunomodulador.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que el agente activo es indinavir, saquinavir, nelfinavir, o tenofovir disoproxil fumarato.
9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el complejo de lípido-agente activo comprende además uno o más agente activos secundarios.
10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el complejo de lípido-agente activo comprende además uno o más factores auxiliares, siendo los factores auxiliares cationes bivalentes, coenzimas, activadores de enzima o agentes de modificación del pH.
11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente activo es un ARN de interferencia pequeño (ARNip).
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente activo es un ARN sentido o uno antisentido.
13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente activo es un vector de expresión adecuado para vacunación mediada por células dendríticas, tal como vacunación tumoral.
14. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente activo es una proteína o péptido procesado previamente adecuado para vacunación mediada por células dendríticas, tal como vacunación tumoral.
15. Uso según la reivindicación 7, en el que el agente inmunomodulador es un agente inmunosupresor o inmunoactivante.
16. Uso según la reivindicación 6, en el que el agente activo se encapsula en el liposoma del complejo de agente activo frente a liposomas.
17. Uso según la reivindicación 1, en el que la administración por la vía intrahepática es mediante infusión en la arteria hepática.
18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la célula dendrítica es una célula dendrítica mielóide, una célula dendrítica folicular o una célula dendrítica plasmocitoide.
19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la célula T es una célula T cooperadora

CD4+, una célula T de memoria CD4+, una célula T de memoria CD8+ o una célula T reguladora CD4+.

20. Uso según la reivindicación 7, en el que la lectina vegetal es Con-A o MHL.

5 **21.** Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el derivado de polifucosa es un derivado de fucosil-colesterol.

22. Uso según la reivindicación 20, en el que el complejo de lípido-lectina vegetal comprende además Ca^{2+} y iones de metales de transición.

10 **23.** Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en el que la MHL es una variante dimérica o multimérica de MHL.

15 **24.** Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 23, en el que el complejo de lípido-lectina vegetal comprende una razón de lípido con respecto a lectina vegetal de entre 5:1 y 7:1.

25. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 24, en el que el complejo de lípido-lectina vegetal tiene entre 30-250 nm de diámetro.

20 **26.** Uso según la reivindicación 1, en el que el complejo de lípido-agente activo es un complejo de liposoma-lectina vegetal, en el que la superficie externa del liposoma comprende un derivado de fucosa y en el que el agente infeccioso es VIH.

27. Uso según la reivindicación 26, en el que la fucosa es Fuc-4C-Col.

25 **28.** Uso según la reivindicación 26 ó 27, en el que la lectina vegetal es Con-A.

29. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que la composición farmacéutica es para su administración por una vía subcutánea.

30 **30.** Uso según la reivindicación 27, en el que la lectina vegetal es Con-A y en el que la superficie externa del liposoma comprende un Fuc-4C-Col.

35 **31.** Complejo de lípido-agente activo adecuado para un suministro dirigido de un agente activo a una célula reservorio para su uso en un método de prevención o tratamiento de una infección provocada por un agente infeccioso, o prevención o tratamiento de una enfermedad crónica degenerativa o maligna no infecciosa, en el que dicho complejo de lípido-agente activo comprende el agente activo, y comprende además un ligando de direccionamiento en la superficie externa del complejo de lípido-agente activo, en el que dicho ligando de direccionamiento es fucosa, polifucosa o un derivado de polifucosa, en el que la célula reservorio es una célula dendrítica, una célula precursora asociada al linaje mielóide premonocítico, un monocito, un macrófago o una célula T, y en el que el complejo de lípido-agente activo es para su administración por una vía transvascular, una vía subcutánea, una vía intradérmica, una vía dirigida a la médula ósea, una vía intraplacentaria, una vía intrauterina, vía intrahepática, una vía intraperitoneal o una vía parenteral.

45 **32.** Complejo de lípido-agente activo para su uso según la reivindicación 31, siendo el complejo de lípido-agente activo un complejo de agente activo frente a liposomas.

33. Complejo de lípido-agente activo para su uso según la reivindicación 32, en el que el agente activo es una lectina vegetal.

50 **34.** Complejo de lípido-agente activo para su uso según la reivindicación 33, en el que la lectina vegetal es Con-A o MHL.

55 **35.** Complejo de lípido-agente activo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, en el que el complejo de agente activo frente a liposomas comprende además Ca e iones de metales de transición.

36. Complejo de lípido-agente activo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35, en el que el complejo de agente activo frente a liposomas comprende además uno o más factores auxiliares, siendo los factores auxiliares cationes bivalentes, coenzimas, activadores de enzima o agentes de modificación del pH.

60 **37.** Complejo de lípido-agente activo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 36, en el que el complejo de agente activo frente a liposomas comprende una razón de lípido con respecto a agente activo de entre 5:1 y 7:1, 3:1 y 10:1 o 3:1 y 100:1.

65 **38.** Complejo de lípido-agente activo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 37, en el que el complejo de agente activo frente a liposomas tiene entre 30-250 nm de diámetro.

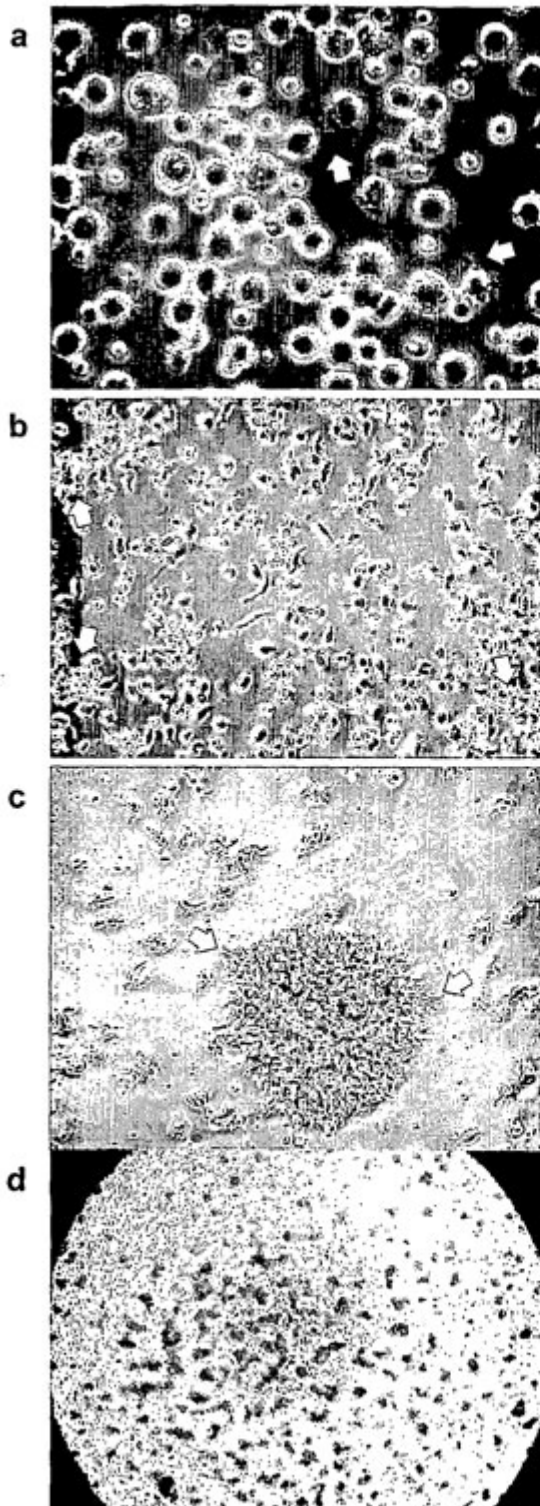
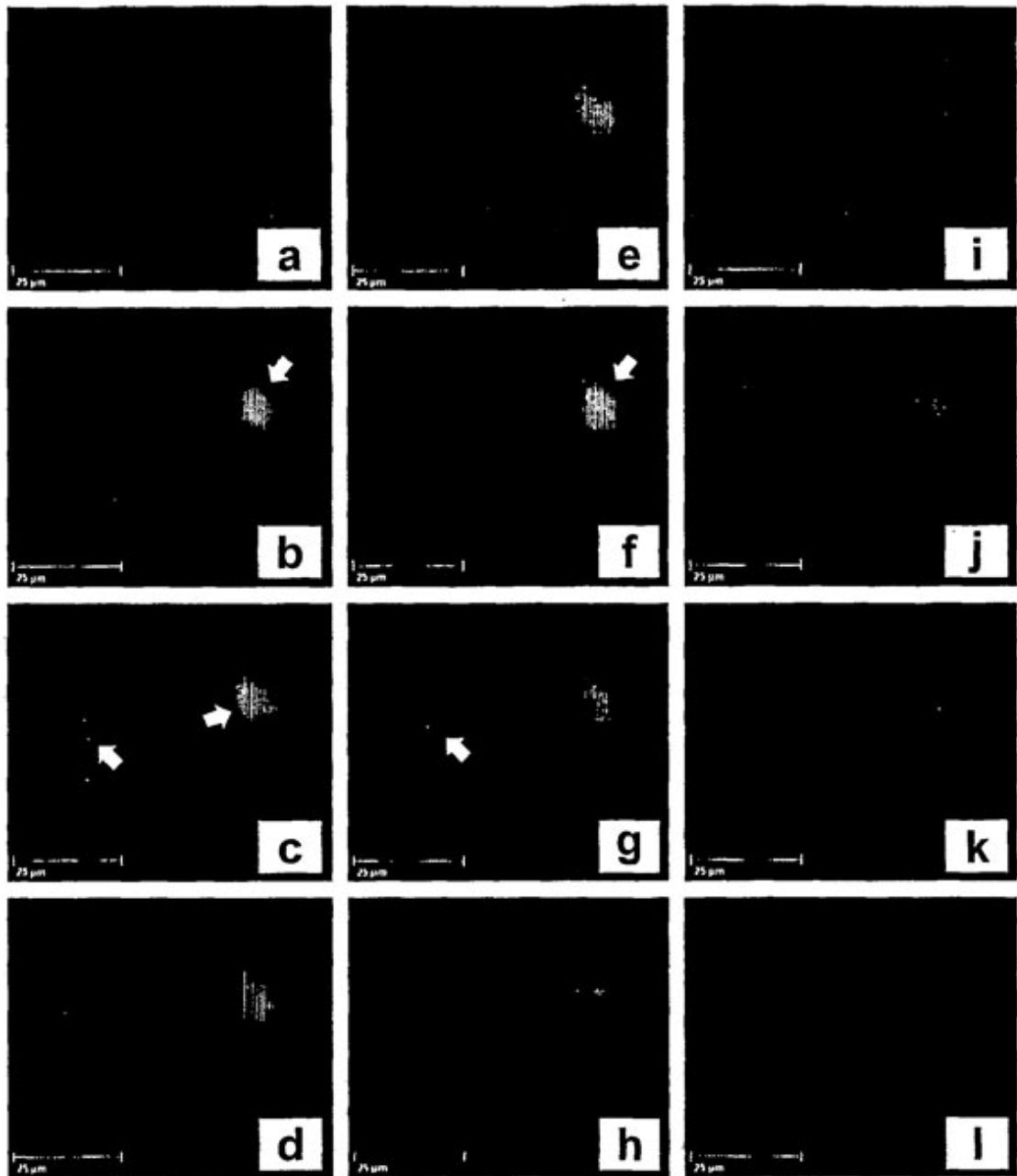


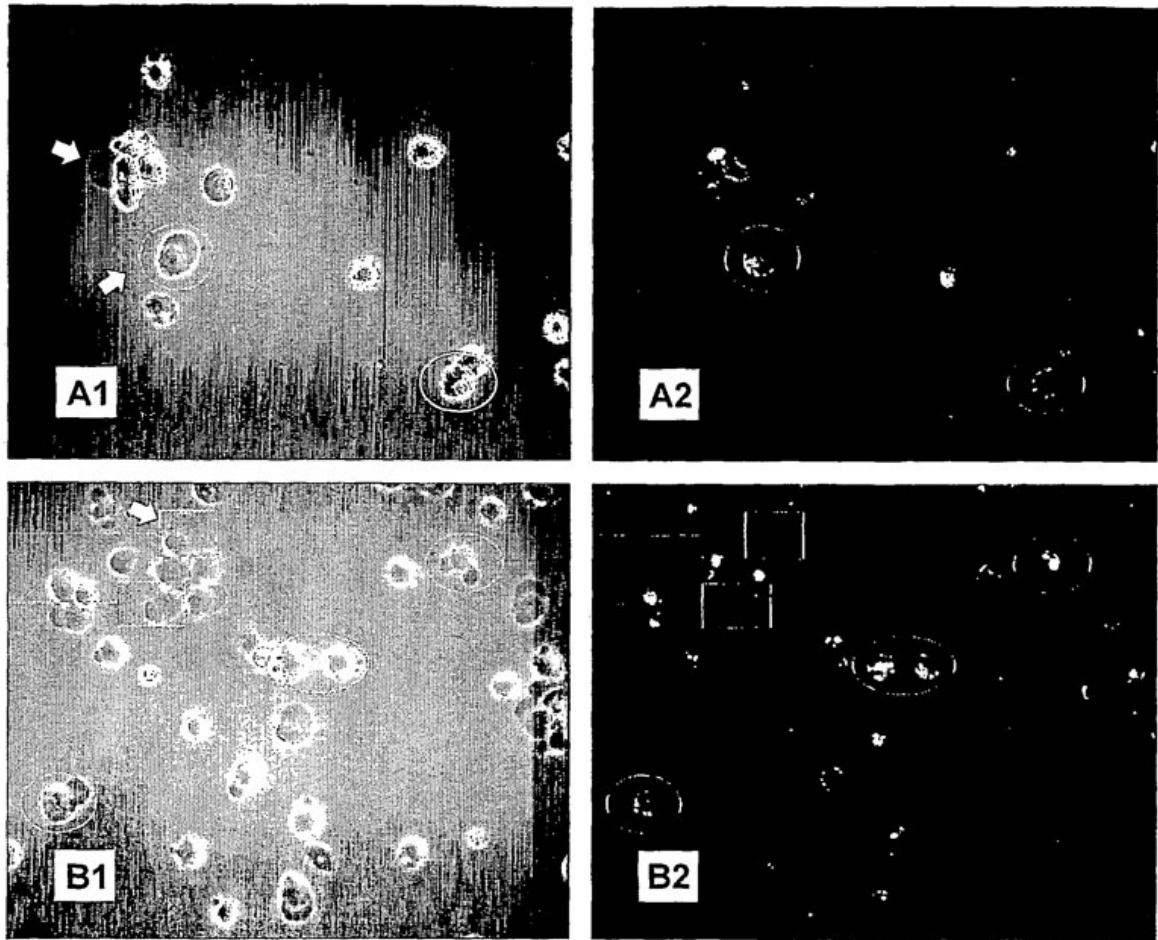
FIG. 1

Aspecto morfológico básico de células dendríticas mieloides (CDm) humanas durante la diferenciación *in vitro*



Secciones ópticas en serie a través de células dendríticas mieloides (CDm) inmaduras seccionadas como diana con liposomas marcados con fucosa que suministran el colorante trazador calceína

FIG. 2



Unión y captación de liposomas marcados con manosa mediante CDm inmaduras tras 5 días de cultivo

FIG. 3

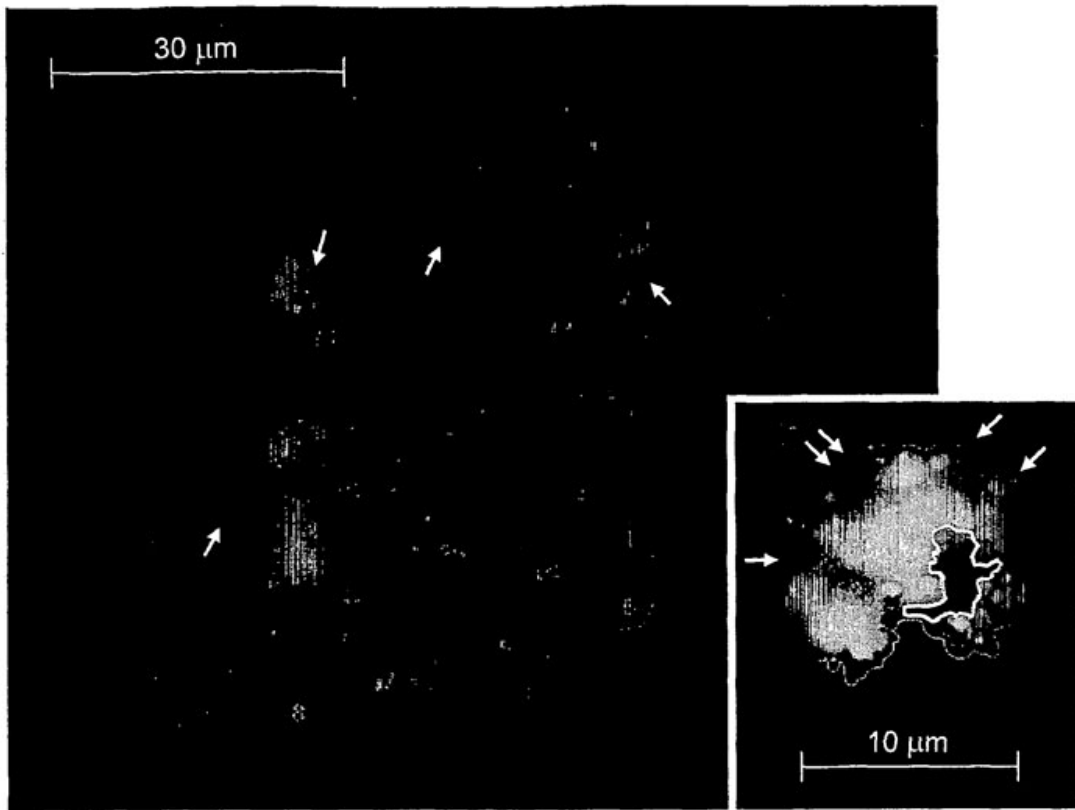
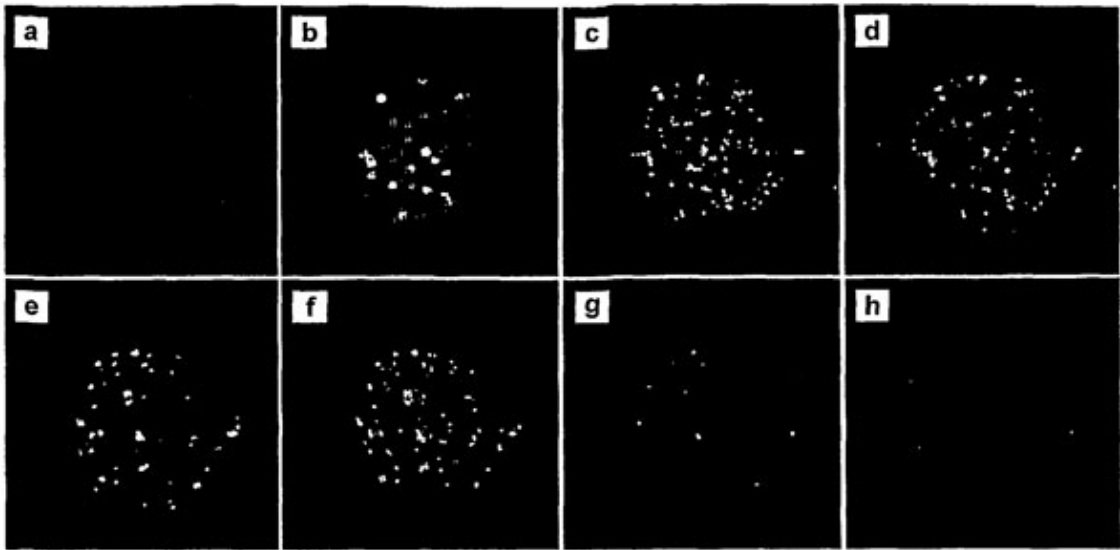


FIG. 4

Selección como diana específica de lectina de tipo C de CDm maduras agrupadas



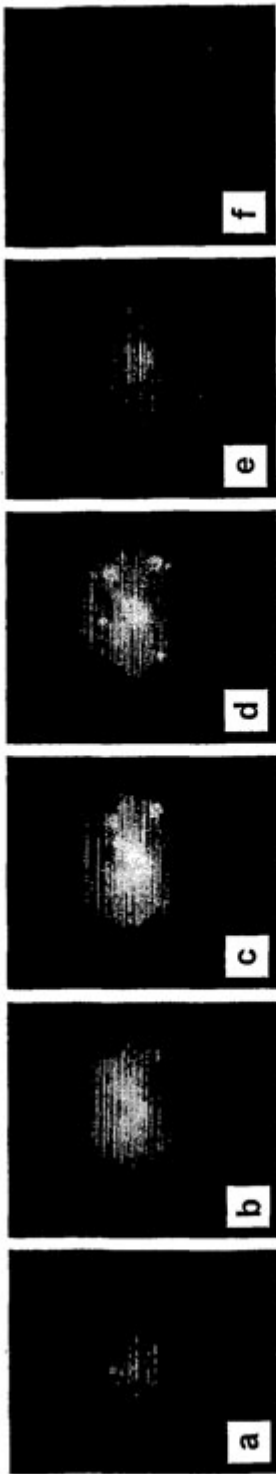
Unión y captación de liposomas marcados con fucosa mediante macrófagos humanos tras 7 días de cultivo

FIG. 5



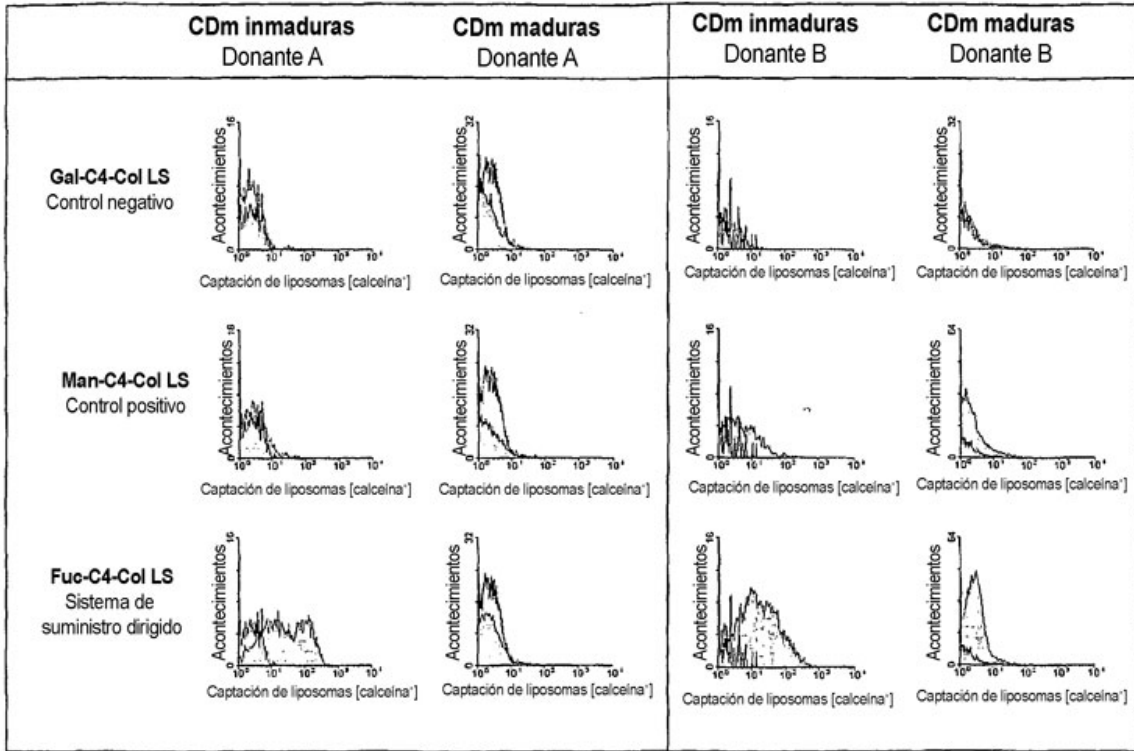
Fotomicrografía de fluorescencia en color de un macrófago representativo de un donante diferente 2 horas tras el direccionamiento con liposomas marcados con fucosa

FIG. 6



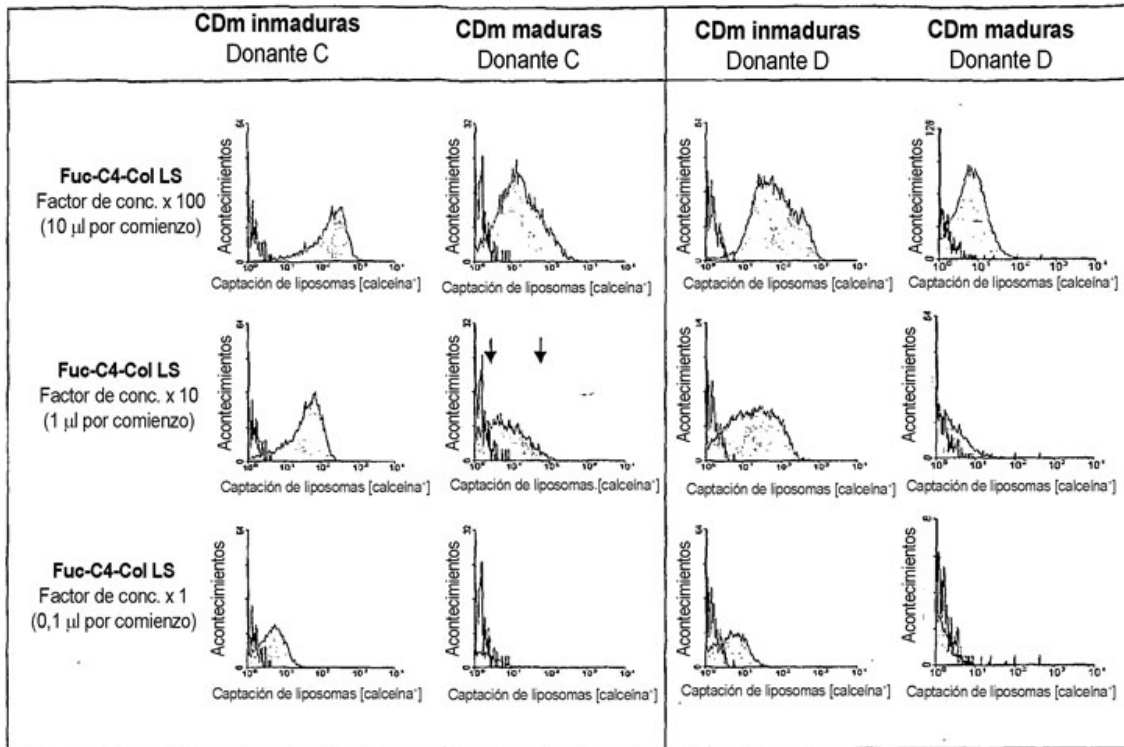
Secciones ópticas en serie a través de un monocito dirigido con liposomas marcados con Fuc-4C-Col que suministran el colorante trazador calceína

Fig. 7



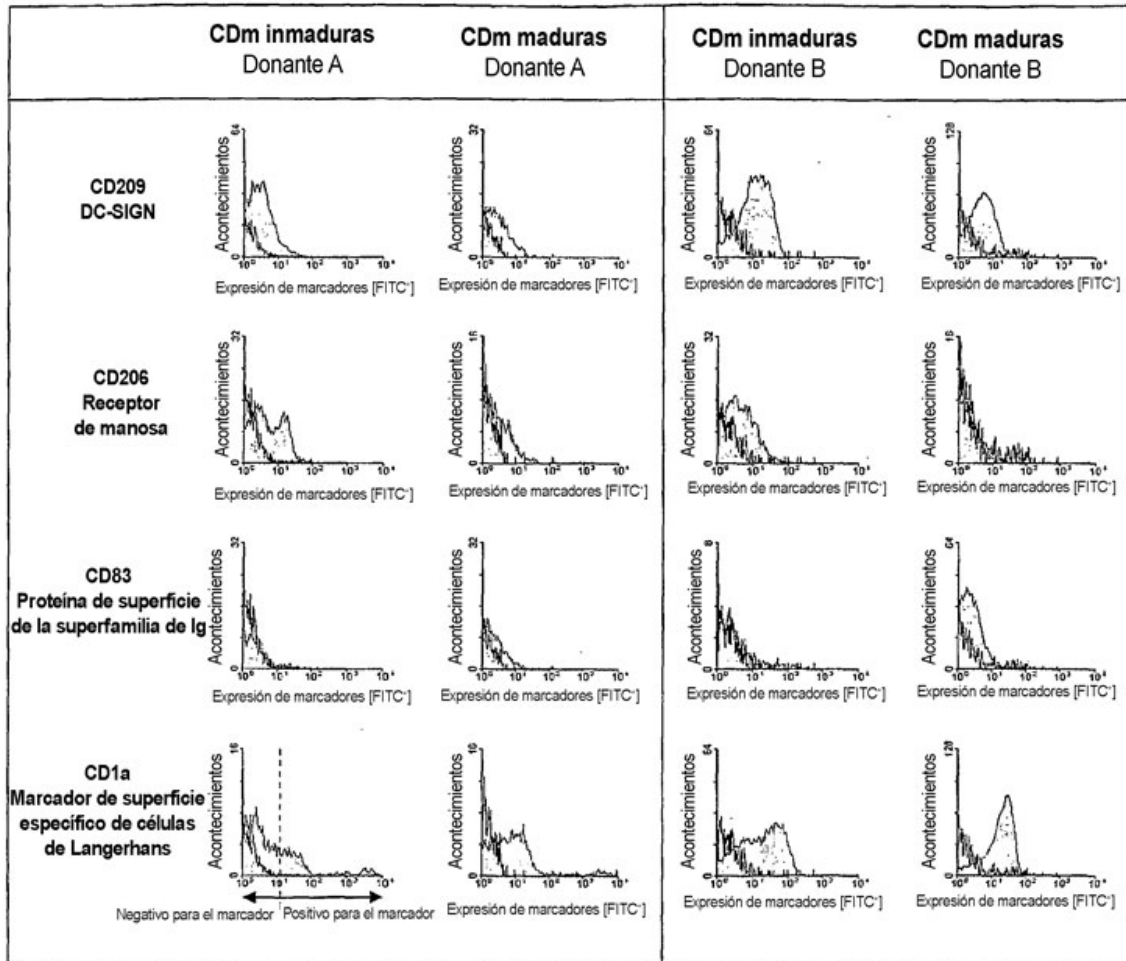
El sistema de suministro de compuestos dirigido por fucosa es altamente específico y tiene una eficacia de direccionamiento extremadamente alta

FIG. 8



Concentraciones aumentadas de liposomas marcados con fucosa seleccionan como diana tanto CDm inmaduras como maduras de manera altamente eficaz

FIG. 9



Fenotipado de células dendríticas mieloides inmaduras y maduras

FIG. 10

FIG. 11

Cambios morfológicos en las CDM tras cultivo de 8 días de VIH con o sin tratamiento de direccionamiento. I.
Aspecto del cultivo y agrupación homotípica de CDM

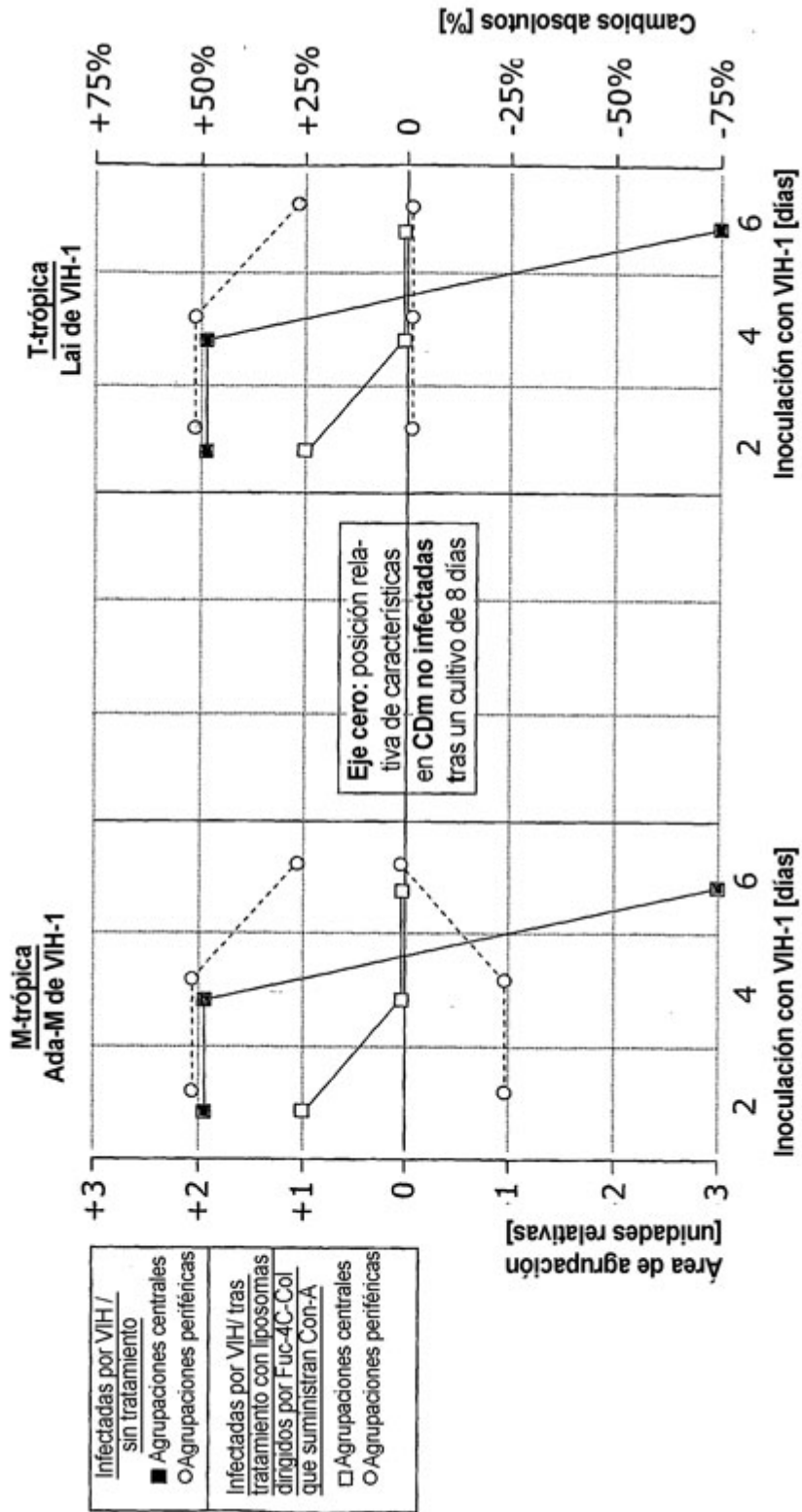


FIG. 12

Cambios morfológicos en las CDm tras un cultivo de 8 días de CDm infectadas por VIH con o sin tratamiento dirigido. II. Tipos de CDm y viabilidad

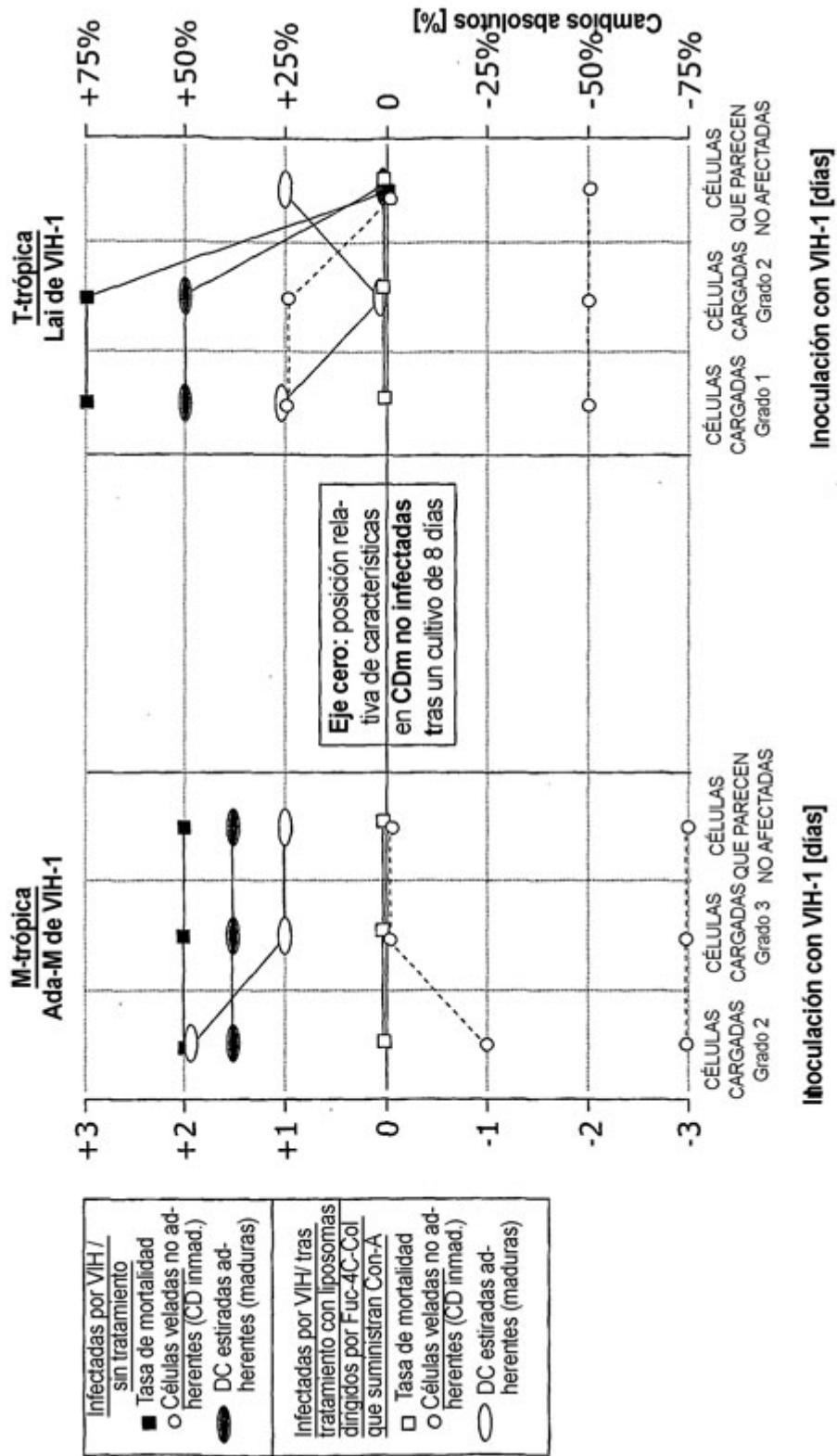
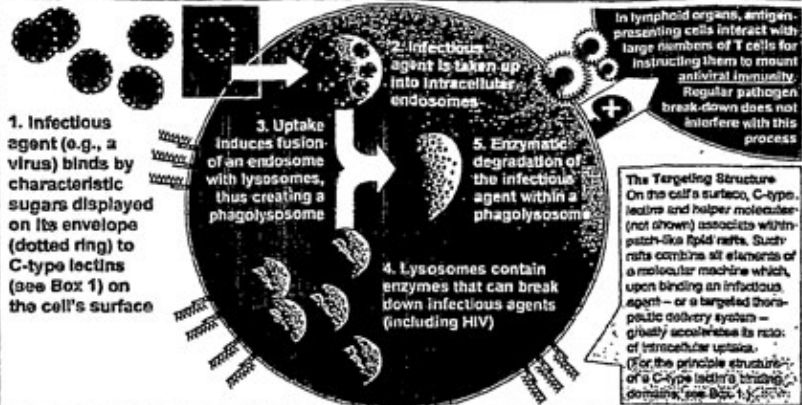


Fig. 13. (I) eliminación normal de patógenos, (II) evasión por VIH; y (III) el sistema de tratamiento y direccionamiento de hidrato de carbono-lectina de la invención

I. Normal Destruction of an Infectious Agent

In the human immune system, the first cells recognizing infectious agents are antigen-presenting cells (dendritic cells, macrophages, and others). Normally, these cells digest and dismantle infectious agents presenting their fragments to T cells for induction of specific immunity. The large circle represents such a cell, as well as key processes involved in the recognition and destruction of infectious agents. The cell section on the upper right depicts a T cell instructed for action.

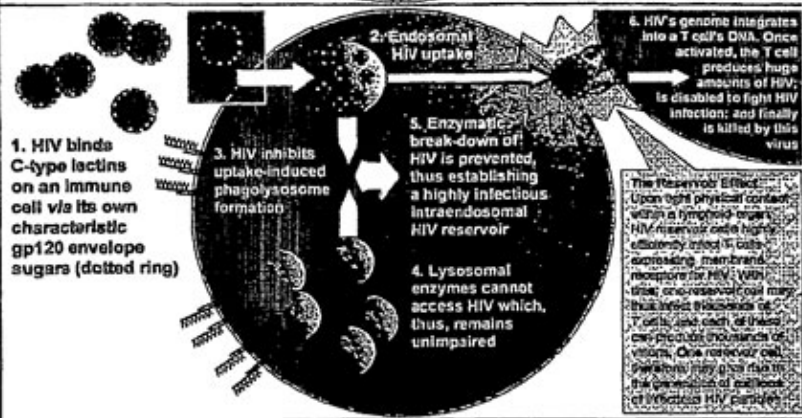


II. Evasion of Destruction by HIV and Formation of a Chronic HIV Reservoir

HIV reservoir populations can retain highly infectious virus for prolonged, yet different periods of time, i.e.,

- Days to months (dendritic cells);
- Months (follicular dendritic cells);
- Months to years (macrophages);
- Years (T-memory cells)

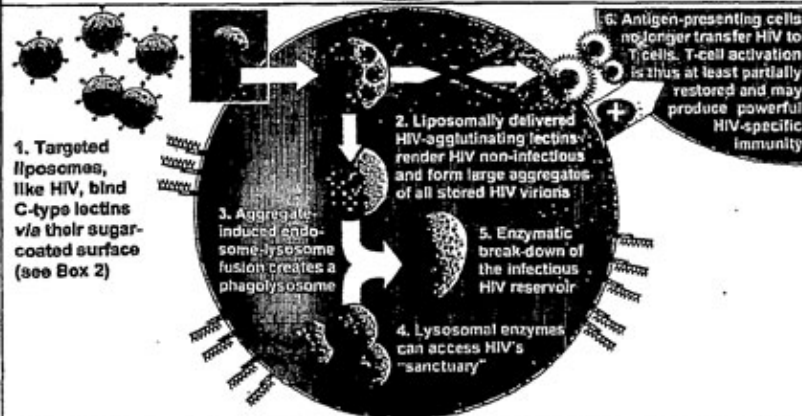
Dendritic cells, with their high turnover rate, their many physiologic subsets, and their extremely tight and frequent physical interaction with T cells, strike as the most virulent HIV reservoir when compared to the other reservoir cells.



III. Elimination of the HIV Reservoir: a Two-Step Process Mediated by Carbohydrate-Lectin Interaction

1st Level:
Specific liposomal targeted delivery to the reservoir cell's surface lectins, with subsequent endosomal uptake of the liposomes;

2nd Level:
Delivery of liposomally encased HIV-agglutinating lectins into the endosomes leads to the break-down of the infectious endosomal HIV reservoir



Box 1: Cellular Targeting Structure
Carbohydrate (Sugar) Recognition Domain (CRD) of a C-Type Lectin

C-type lectin-like domains expressed by T-memory and NK HIV-reservoir cells also bear CRDs and thus can be targeted, too

Box 2: Liposomal Targeting & Delivery System

Carbohydrate (Sugar) Labeling
Cholesterol Membrane Anchor
Liposome Membrane
Aqueous Interior
Therapeutic Payload (Lectin)

Note that some of the processes depicted are simplified and/or do not reflect actual sizes and ratios

Fig. 14. El sistema de tratamiento y direccionamiento de hidrato de carbono-lectina de hidrato de carbono-lectina de la invención

