

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 080**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/7028 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05750814 .5**

96 Fecha de presentación: **03.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1767216**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **Fármaco que presenta un ligando de células reguladoras contenido en el liposoma**

30 Prioridad:
11.06.2004 JP 2004173844
28.10.2004 JP 2004313830

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.10.2012

73 Titular/es:
RIKEN (100.0%)
2-1 HIROSAWA
WAKOU-SHI, SAITAMA 351-0198, JP

72 Inventor/es:
ISHII, YASUYUKI;
NOZAWA, RISA y
TANIGUCHI, MASARU

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 389 080 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

Fármaco que presenta un ligando de células reguladoras contenido en el liposoma.

5 La presente invención se refiere a un fármaco y su utilización en el tratamiento de una enfermedad, seleccionada de entre el grupo consistente en enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunitarias y enfermedades injerto contra huésped, y que comprende un liposoma que contiene, como un principio activo, KRN7000

10 Las enfermedades inmunológicas, como las enfermedades alérgicas, las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades de injerto contra huésped (EICH), son enfermedades provocadas por una anomalía o incompatibilidad del sistema inmune. Entre ellas, pacientes con algunas dolencias de las enfermedades alérgicas tienden a aumentar cada año, y se ha informado que el 70% de los japoneses ya están afectados por alguna enfermedad alérgica. Una categoría de las enfermedades alérgicas es amplia e incluye asma, dermatitis atópica, polinosis, alergia a alimentos y alergodermia. Es conocido que muchos de los pacientes con alergia desarrollan varias enfermedades alérgicas secuencialmente, lo que se conoce como la marcha alérgica. En Japón, durante los últimos años los pacientes con polinosis o asma atópica pediátrica complicada con rinitis alérgica o conjuntivitis alérgica han aumentado notablemente. Se ha considerado que una razón para que esto ocurra puede deberse al cambio de las condiciones de vida, particularmente el cambio de las condiciones inmunológicas (disminución de infecciones bacterianas, aumento de la densidad de polvo en el hogar en hogares herméticos) en niños en los que el sistema inmunológico está formado puede aumentar la producción del anticuerpo IgE. Es evidente que las definidas estrictamente enfermedades alérgicas como la rinitis alérgica, la conjuntivitis alérgica y el asma atópica están causadas por la reacción alérgica de tipo I en la que están implicados el anticuerpo IgE y las células Th2 que provocan la producción del anticuerpo. Se ha informado con frecuencia de que el anticuerpo IgE y las células Th2 predominantes están profundamente implicados durante la etapa de aparición de varias enfermedades alérgicas aparte de éstas. Así, se ha pronosticado que una disminución en la producción del anticuerpo IgE que es responsable de la reacción alérgica de tipo I y la inhibición de la diferenciación de las células Th2 pueden ser procedimientos prometedores para la terapia de enfermedades alérgicas. Se ha considerado que para los pacientes con enfermedades alérgicas que se ha pronosticado que irán aumentando en el futuro, una terapia causal de medicamentos realizada sobre la base de los mecanismos de incidencia de la alergia o un procedimiento preventivo (vacunas) que reduce la incidencia de alergias pueden ser de alguna manera eficaces. Es necesario garantizar un perfil de seguridad elevado (efectos secundarios) para el medicamento.

35 El anticuerpo IgE humanizado (rhuMab-E25, Genentech Inc.) ha demostrado ser altamente eficaz en ensayos clínicos con pacientes con asma atópica (ver bibliografía no patente 1). En un intento de inhibir la producción del anticuerpo de un antígeno específico IgE que utiliza un compuesto artificial, se indujo una respuesta inmunológica de tipo Th1 en ratones BALB/c inmunizados con un plásmido de ADN en el que se incorporó el gen *cry j1* del antígeno de polen de cedro. Como resultado, se produjo el anticuerpo IgG2a, e incluso cuando se estimuló el antígeno *cry j1* y el aluminio, la producción de los anticuerpos IgG1 y IgE se suprimió (ver bibliografía no patente 2). Cuando los ratones se inmunizaron con la proteína de fusión OVA-IL-12, se indujo la respuesta inmunológica específica de tipo Th1 al OVA. Su eficacia fue mucho más elevada que en el caso de la inmunización con una mezcla de solución de OVA y IL-12, y se produjo el anticuerpo IgG2 específico para OVA (ver bibliografía no patente 3). Este informe indica que la respuesta puede estar sesgada para el tipo Th1 mediante la inmunización con un complejo del antígeno y un inductor de la citoquina y junto con esto se puede suprimir la producción del antígeno específico del anticuerpo IgE.

45 El control de células reguladoras que suprimen la diferenciación, la proliferación y las funciones de los linfocitos Th y anticuerpos IgE que producen linfocitos B puede ser un procedimiento eficaz para evitar enfermedades alérgicas o para curarlas. Se piensa que los linfocitos T NK son una de las células reguladoras que juegan un papel importante en las células cancerosas, parásitos y protozoos, y para la eliminación de infecciones bacterianas intracelulares como las bacterias de *Listeria* y tuberculosis (ver bibliografía no patente 4). Se ha demostrado que los linfocitos T NK son un intermediario de los linfocitos T CR (linfocitos TCR_{int}) que expresa un receptor de los linfocitos T (TCR) moderadamente, y es el análogo celular de la célula "asesina natural" (NK) en términos de que muestra una morfología similar a linfocito granular grande (LGL), que expresa de forma constitutiva la cadena IL-2R β en la superficie y que presenta gránulos de perforina, pero es absolutamente diferente de los linfocitos NK ya que presenta TCR (ver bibliografía no patente 5). Un linfocito T NK Vα14⁺ es uno de los subgrupos de los linfocitos T NK anteriores, muchas de células T NK Vα14⁺ expresan ARNm Vα14Ja281 y lo presenta como una cadena TCR α. Una cadena Vα24JaQ, un homólogo humano que es homólogo a la cadena murina Vα214Ja281, está presente en un 20% a un 50% en los linfocitos T CD4⁺/CD8⁻ de la sangre periférica de donantes sanos (ver bibliografía no patente 6).

60 La α-galactosil ceramida, que es un compuesto ligando de estas células T NK, induce la producción de citoquina tanto de IFN-γ como IL-4. Por consiguiente, se ha demostrado que las células T NK son las células reguladoras para la diferenciación de Th1/Th2 (ver bibliografía no patente 7). Cuando se administró una α-galactosil ceramida a ratones C57BL/6, se inhibió la producción del anticuerpo IgE inducido por DNP-OVA y aluminio. En el mismo experimento, utilizando ratones deleción de las células Vα14-NK, no se inhibió la producción del anticuerpo IgE (ver bibliografía no patente 8). En los experimentos en los que se administró el compuesto de α-galactosil ceramida a ratones NOD, un modelo de diabetes tipo I, se observó una mejora sintomática. Por consiguiente, se ha

sugerido la posibilidad que las células V α 14-NK aumenten la respuesta inmunológica a través de la células Th2 (ver bibliografía no patente 9). Sin embargo, el efecto que se obtiene con el compuesto de α -galactosil ceramida solo es limitado y es necesaria una mejora adicional de la eficacia médica.

5 Por otro lado, las sustancias de β -galactosil ceramida y de β -glicosil ceramida están presentes *in vivo*, pero se ha demostrado que presentan una actividad inferior en comparación con los efectos de inmunopotenciación y antitumorales del compuesto de α -galactosil ceramida (ver bibliografía no de patente 10 a 12, y documento de patente 1).

10 Adicionalmente, se sabe que la célula T NK funciona eficazmente en las enfermedades autoinmunitarias (ver bibliografía no patente 13 a 16). Por consiguiente, si las funciones inmunosupresoras, por ejemplo, la producción de IL-10 en las células T NK se puede aumentar selectivamente, se cree que es eficaz para el tratamiento no sólo de enfermedades alérgicas sino también de otras enfermedades inmunológicas como las enfermedades autoinmunitarias y EICH. Sin embargo, no se conoce un ligando que por si solo pueda aumentar selectivamente la
15 función inmunosupresora de la célula T NK. No se ha utilizado ningún liposoma para este propósito.

Documento de patente 1: JP Hei-1-93562 A, Publicación ;
Bibliografía no patente 1: Immunopharmacology, 48:307 (2000);
Bibliografía no patente 2: Immunology, 99:179 (2000);
20 Bibliografía no patente 3: J. Immunol., 158:4137 (1997);
Bibliografía no patente 4: Clin Immunol., 28, 1069 (1996);
Bibliografía no patente 5: J. Immunol., 155, 2972 (1995);
Bibliografía no patente 6: J. Exp. Med., 182, 1163 (1995);
Bibliografía no patente 7: Nakayama, T., et al., Int. Arch. Allergy Immunol., 124:38-42 (2001);
25 Bibliografía no patente 8: J. Exp. Med., 190, 783-792 (1999);
Bibliografía no patente 9: Nat. Med., 7:1052-1056 (2001);
Bibliografía no patente 10: Biochem. Biophys. Acta, 280, 626 (1972);
Bibliografía no patente 11: Biochem. Biophys. Acta, 316, 317 (1973);
Bibliografía no patente 12: Biol. Pharm. Bull., 18, 1487 (1995);
30 Bibliografía no patente 13: J. Exp. Med., 186:677 (1997);
Bibliografía no patente 14: J. Immunol., 166:62 (2001);
Bibliografía no patente 15: J. Exp. Med., 194:1801 (2001); y
Bibliografía no patente 16: Nature, 413:531 (2001).

35 En este contexto, *Berson et al.* (Berson, J. F. *et al.*, Perspectives in Drug Discovery and Design, 5, pp. 169-180, 1996) describe la interacción de la proteína de envoltura del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 con liposomas que contienen galactosilceramida. Además, la patente US nº 4.416.872 describe un tratamiento para la interrupción del ciclo vital del parásito de la malaria que comprende la administración del fármaco 8-aminoquinolina que contiene liposomas. Además, el documento WO 99/33475 A1 describe el uso de glicolípidos que incluyen galactosil ceramida
40 y receptores específicos para ella para su uso en la terapia de diabetes. Además, Long *et al.* (Long, D. *et al.*, Journal of Virology, 68(9), pp 5890-5898) describe la caracterización del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 gp120 que se une a liposomas que contienen galactosilceramida. Finalmente, el documento WO 03/009812 A2 describe procedimientos y composiciones para aumentar la inmunogenicidad de un antígeno en un mamífero, que comprende la administración del antígeno junto con un adyuvante que incluye glicosilceramida.

45 Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un fármaco dirigido a una célula reguladora *in vivo* para las enfermedades inmunológicas que incluye las enfermedades alérgicas, las enfermedades autoinmunitarias y
50 las enfermedades del injerto contra huésped.

Se ha descubierto que una composición que presenta un ligando de células reguladoras como la β -galactosil ceramida y los compuestos de α -galactosil ceramida contenidos en un liposoma presentan una acción inducible de los linfocitos T productores de IL-10 y una acción inhibitoria de la producción del anticuerpo IgE que no se ejerce con
55 una solución de este compuesto solamente y que es eficaz como un agente preventivo o terapéutico para las enfermedades inmunológicas como las enfermedades alérgicas. Se ha descubierto además que una composición que presenta β -galactosil ceramida contenida en un liposoma puede inhibir la diferenciación y proliferación de los linfocitos T patógenos mediante el aumento selectivo de las funciones inmunosupresoras de las células T NK y por consiguiente es eficaz como agente preventivo o terapéutico para las enfermedades inmunológicas y la enfermedad
60 de injerto contra huésped, y han completado la presente invención.

Es decir, la presente invención es como se define en las reivindicaciones.

65 La figura 1 muestra los resultados de los experimentos de la producción *in vitro* de citoquina en los se añadió una composición Lipo- β u otras composiciones de liposomas o soluciones salinas a un sistema de cultivo de CD11c* CD del bazo de ratones BALB/c. El eje vertical muestra las concentraciones de varias citoquinas en los sobrenadantes

del cultivo después de la adición.

5 La figura 2 muestra los resultados de los experimentos de la producción *in vitro* de citoquina en los se añadió una composición Lipo- β u otras composiciones de liposomas o soluciones salinas a un sistema de cultivo de CD11c* CD del bazo de ratones C57BL/6. El eje vertical muestra las concentraciones de varias citoquinas en los sobrenadantes del cultivo después de la adición;

10 La figura 3 muestra los resultados de los experimentos de la producción *in vitro* de citoquina en los se añadió una composición Lipo- β u otras composiciones de liposomas o soluciones salinas a un sistema de cultivo de CD11c* CD del bazo de ratones BALB/c. El eje vertical muestra las concentraciones de IL-10 en los sobrenadantes del cultivo después de la adición;

15 La figura 4 muestra los resultados de las mediciones de la producción del anticuerpo específico DNP-OVA en plasma mediante ELISA. Se administró Lipo- β o solución salina a ratones BDF1, después se inmunizaron con DNP-OVA y aluminio seguido de la estimulación con DNP-OVA sola. El test ELISA se realizó después de la inmunización primaria y después de la estimulación.

20 La figura 5 muestra los resultados de las mediciones de las concentraciones de citoquinas en los sobrenadantes del cultivo después del cultivo de células CD11c* obtenidas del bazo de ratones BALB/c 7 días después de que se administrara Lipo- β o solución salina (control negativo) y de células T CD4⁺ derivadas de ratones DO11.10 (ratones transgénicos transfectados con TCR $\alpha\beta$ específico para OVA) en presencia de péptido OVA durante 4 días.

25 La figura 6 muestra los resultados de las mediciones de títulos de anticuerpos en sangre en el 14^º día después de la inmunización con DNP-OVA y aluminio después de que se transfirieran por transferencia adoptiva las células, que proliferaron en los experimentos mostrados en la figura 5, en ratones BALB/c.

30 La figura 7 muestra los resultados de las mediciones de la producción de citoquinas *in vitro*. Se añadió un medio, una solución acuosa de α -galactosil ceramida (α -GalCer), una composición de liposoma como control (Lipo(-)) o un liposoma que contenía α -galactosil ceramida (Lipo- α GC), a los cultivos de células del bazo completas (paneles superiores) y a las células del bazo en las que se había añadido el anticuerpo de neutralización anti-CD1d o en las que las células T NK se habían suprimido (paneles inferiores) en ratones C57BL/6. El eje horizontal representa la concentración de cada citoquina en el sobrenadante del cultivo 2 días después de la adición.

35 La figura 8 muestra los resultados del análisis de los valores de las células V α 14-NK en el bazo mediante citometría de flujo 3 días o 7 días después de que se administrara solución salina, Lipo(-) o Lipo- α GC a ratones C57BL/6. El eje horizontal y el eje vertical representan la intensidad fluorescente del anticuerpo anti-TCR β marcado por FITC y el tetrámero+CD1d α -GalCer marcado por PE, respectivamente.

40 La figura 9 muestra los títulos de anticuerpo de anti-NP-IgE, anti-NP-IgG1 y anti-NP-IgG2a en sangre. Se administró solución salina, α -GalCer, Lipo(-) o Lipo- α GC a ratones C57BL/6 (paneles superiores) o a ratones con deficiencia genética de IL-10 (paneles inferiores), después de 3 días, a los que se inmunizó con DNP-OVA y aluminio, y se midieron los títulos después de 14 días.

45 La figura 10 muestra los títulos de anticuerpos de anti-DNP-IgE, anti-DNP-IgG1 y anti-DNP-IgG2a y los niveles totales de IgE, IgG1 y IgG2a. Se administró solución salina, α -GalCer, Lipo(-) o Lipo- α GC a ratones BDF1, después de 3 días (día 0), a los que se inmunizó con DNP-OVA y aluminio, y se estimularon con DNP-OVA sola el día 55. Los títulos se midieron los días 0, 14, 55 y 64.

50 La figura 11 muestra los resultados de las mediciones de la capacidad de proliferación celular mediante el procedimiento MTT. Se administró solución salina, α -GalCer, Lipo(-) o Lipo- α GC a ratones BDF1, después de 3 días, a los que inmunizó con DNP-OVA. Después de 7 días, se estimularon los linfocitos T CD4* del bazo y las células completas del bazo irradiadas por radiación de ratones BDF1 intactos con NDP-OVA o PMA/vomicina. Después de 48 horas, se midió la capacidad de proliferación. En la figura de la izquierda, el eje horizontal y el eje vertical representan la concentración de DNP-OVA y la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm, respectivamente.

55 La figura 12 muestra los resultados de los análisis de las células mediante citometría de flujo. Se administró solución salina, α -GalCer, Lipo(-) o Lipo- α GC a ratones BALB/c. Después de 3 días, se tiñeron las células del bazo con el anticuerpo anti-CD11c y el anticuerpo anti-CD45RB.

60 La figura 13 muestra el número de células CD11c^{bajo} CD45RB^{alto} y el número de células CD11c^{alto} CD45RB^{bajo} obtenidas mediante la multiplicación de una proporción del número celular obtenido en la memoria del análisis por citometría de flujo en la figura 11 por el número de células completas del bazo.

65 La figura 14 muestra los resultados de las mediciones de citoquinas en los sobrenadantes del cultivo. Se administró Lipo- α GC a ratones BALB/c. Después de 3 días, las células CD11c^{bajo} CD45RB^{alto} y las células CD11c^{alto} CD45RB^{bajo}

separadas de las células del bazo se estimularon con LPS. Después de 2 días, se analizaron los sobrenadantes del cultivo. El eje horizontal representa la concentración de la citoquina en el sobrenadante del cultivo.

5 La figura 15 muestra los resultados de las mediciones de la capacidad de proliferación celular mediante el procedimiento MTT. Las células CD11c^{bajo} CD45RB^{alto} o las células CD11c^{alto} CD45RB^{bajo} pulsadas con el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ se cocultivaron con células T CD4* derivadas del bazo de un ratón DO11.10, y después de 48 horas, se midió la capacidad de proliferación celular. El eje horizontal representa la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

10 La figura 16 muestra los resultados de los análisis con citometría de flujo utilizando el anticuerpo anti-CD4, y el anticuerpo anti-CD25, el anticuerpo anti-CD28, el anticuerpo anti-CD152 o el anticuerpo anti-ICOS. Se analizaron las células proliferadas mediante cocultivo de las células CD11c^{bajo} CD45RB^{alto} o las células CD11c^{alto} CD45RB^{bajo} pulsadas con el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ con los linfocitos T CD4* derivadas del bazo de ratones DO11.10.

15 La figura 17 muestra los resultados de los análisis de la expresión intracelular de la citoquina mediante citometría de flujo. Las células proliferadas mediante el cocultivo de células CD11c^{bajo} CD45RB^{alto} o células CD11c^{alto} CD45RB^{bajo} pulsadas con el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ con los linfocitos T CD4* derivadas del bazo de ratones DO11.10 se estimularon con PMA e vomitina, y se analizaron mediante citometría de flujo. Los paneles superiores representan los patrones de tinción intracelular mediante el correspondiente anticuerpo de control de isotipo. Los paneles inferiores representan los patrones de tinción intracelulares mediante el anticuerpo específico a la citoquina.

20 La figura 18 muestra los resultados de los análisis de la expresión intracelular de la citoquina mediante citometría de flujo. Los linfocitos T CD4* del bazo de ratones BDF1 administrados con Lipo- α GC o Lipo- α GC+OVA se cultivaron *in vivo* con células del bazo irradiadas con radiación del mismo BDF1 en presencia de OVA, y después de 6 días, las células se estimularon con PMA e iomicina. Los paneles superiores representan el patrón de tinción intracelular de los linfocitos T CD4* del bazo de los ratones administrados con Lipo- α GC, y los paneles inferiores representan el patrón de tinción intracelular de los linfocitos T CD4* del bazo de los ratones administrados con Lipo- α GC+OVA.

25 La figura 19 muestra los títulos de los anticuerpos de anti-DNP-IgE, anti-DNP-IgG1, anti-DNP-IgG2a (paneles superiores), y los niveles totales de IgE, IgG1 y IgG2a (paneles inferiores) en sangre. Los ratones BDF1 se inmunizaron con DNP-OVA y aluminio, los días 21, 28 y 35 se administró un solo liposoma (vehículo), Lipo- α GC o Lipo- α GC+OVA, y después, el día 42, los ratones se estimularon con antígeno DNP-OVA solamente. El día 48, se examinaron los anticuerpos. * p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,001.

35 Formas de realización de la invención

En la presente memoria, "células reguladoras" incluye, pero no está limitado, las células T NK (células asesinas naturales T), células Tr1 productoras de IL-10 y células dendríticas (CD), y entre ellas, las células NK son las especialmente preferidas.

40 Un "ligando de células reguladoras" no está especialmente limitado siempre y cuando el ligando está unido a un receptor de la superficie celular de la célula reguladora anterior para facilitar la diferenciación/proliferación o activación de la célula reguladora, e incluye los siguientes. Pero, el ligando de células reguladoras no está limitado a éstos.

- 45
- (i) Galactosil Ceramidas como las sustancias α -galactosil ceramida y β -galactosil ceramida que son los ligandos de las células T NK.
 - 50 (ii) Vitamina D3, dexametasona, TGF- β y IL-10 que sirven para la diferenciación/proliferación de las células dendríticas reguladoras (CD).
 - (iii) Sustancias que inducen la expresión de IL-10 o FoxP3 que sirven para la diferenciación/proliferación de células T reguladoras.

55 Un "agente inductor de célula reguladora" se refiere a un medicamento que induce la diferenciación/proliferación o la activación de las células reguladoras. La facilitación de la diferenciación/proliferación o la activación de las células reguladoras se puede identificar, por ejemplo, como se describe en los ejemplos, utilizando CD11c* CD del bazo midiendo la proliferación de células NK o de las células Tr1 productoras de IL-10 contenidas en el mismo, o cuantificando las citoquinas (IFN- γ , IL-10, IL-4) producidas por las células T NK y las células Tr1 productoras de IL-10.

60 Acerca de el "liposoma que contiene el ligando de células reguladoras", los preferidos son los inductores de las células T NK y de las células Tr1 productoras de IL-10 que son las células reguladoras, que además presentan una actividad para suprimir la activación de los linfocitos T y que presentan una acción inhibidora sobre la producción del anticuerpo IgE liberado por los linfocitos B. Específicamente, los que contienen el "ligando de células reguladoras" como el anterior en el liposoma son los preferidos y entre estos una composición que incluye una α -galactosil

ceramida o una β -galactosil ceramida en un lípido de doble membrana del liposoma es la preferida. El "liposoma que contiene el ligando de células reguladoras" puede contener dos o más "ligandos de células reguladoras".

5 El "liposoma que contiene el ligando de células reguladoras" puede contener además ligandos de la familia de TLR (receptor similar a Toll) en adición al ligando de células reguladoras. La adición de los ligandos de la familia de TLR pueden aumentar la producción de citoquinas que regulan la acción de las "células reguladoras" y además mejora el efecto. Los ligandos de la familia de TLR incluyen oligonucleótido CpG (CpGODN) e imiquimod (1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c] quinolin-4-amino).

10 El "liposoma que contiene el ligando de células reguladoras" también puede contener alérgenos. Los alérgenos se refieren a sustancias que causan la alergia, e incluyen preferentemente un antígeno de polen y un antígeno de ácaro. El alérgeno incluye específicamente OVA (ovoalbúmina).

15 La presente invención proporciona el liposoma en el que se ha incorporado KRN7000 como una sustancia macromolecular soluble en agua. En el presente documento, una que presenta una estructura vesicular en la que una micela (partícula soluble en agua que se obtiene moléculas anfipáticas que incluyen una región hidrofílica y una región hidrofóbica) se ha cerrado y se denomina liposoma. Un componente del liposoma puede ser cualquiera siempre que sea la molécula anfipática la que puede formar la micela mediante procedimientos conocidos, y preferentemente incluye lípidos. El lípido en la presente invención incluye fosfolípidos como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleilfosfatidilcolina (DOPC) y dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE), esfingoglicolípido y gliceroglicolípido. Estos se utilizan para fabricar el liposoma, por separado o en combinación de dos o más o en combinación con un derivado de lípido en la que una sustancia no polar como colesterol o un polímero soluble en agua como polietileno se ha unido al lípido.

25 El liposoma se puede preparar según los procedimientos públicamente conocidos. Por ejemplo, se pueden utilizar los procedimientos descritos en Liposome Technology, vol. 1, 2nd edition (por Gregory Gregoriadis (CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Londres, Tokio), Capítulo 4, pp 67-80, Capítulo 10, pp 167-184 y Capítulo 17, pp 261-276 (1993)). Más específicamente, los procedimientos comprenden de manera no limitativa, un procedimiento de sonicación, un procedimiento con inyección de éter, un procedimiento de ácido cólico, un procedimiento de fusión de calcio, un procedimiento por liofilización y un procedimiento por evaporación de fase revertida. El tamaño del liposoma de la presente invención no está especialmente limitado, y normalmente resulta preferida una media de 100 a 200 nm y más preferentemente de 100 a 150 nm. La estructura del liposoma no está especialmente limitada, y puede ser un liposoma como unilamela y multilamela. Acerca de la solución encapsulada dentro del liposoma, es posible utilizar un tampón y una solución salina además de agua. También es posible añadir un solvente orgánico soluble en agua (por ejemplo, glicerina) en una cantidad adecuada y utilizarlo.

40 El liposoma utilizado para el fármaco de la presente invención puede ser un liposoma obtenido mediante la modificación de la superficie del liposoma para dirigir el "liposoma que contiene el ligando de células reguladoras" a un sitio diana. El sitio diana incluye, por ejemplo, hígado, bazo, nódulo linfático, médula ósea, pulmón, ojo, piel y nariz.

45 La sustancia que modifica la superficie del liposoma incluye compuestos de bajo peso molecular, compuestos de peso molecular elevado, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas y cadenas de azúcar. El compuesto molecular de gran peso molecular incluye polietilenglicol, (ver patente No. 2948246). El ácido nucleico incluye, por ejemplo, ARN de cadena sencilla y ADN de cadena sencilla que reconoce TLR-7 o TLR-9 del receptor de tipo Toll en la célula diana, y derivados de estos ácidos nucleicos. La proteína incluye, por ejemplo, anticuerpos y receptores que reconocen las moléculas expresadas específicamente en la superficie de las células diana como son las células dendríticas (CD) que son células que presentan antígenos o sus células precursoras. La modificación con la cadena de azúcar incluye la modificación con el lípido de unión de la manosa que puede estar unido a un receptor de la manosa expresado en la superficie de la CD (por ejemplo, ver Copland, M. J. et al., (2003) Liposome delivery of antigen to human dendritic cells, Vaccine, 21:883-890).

50 La inclusión del ligando en el liposoma se puede realizar mediante procedimientos ordinarios. Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos, el liposoma que contiene el ligando de células reguladoras se puede obtener disolviendo separadamente el componente del liposoma y el ligando en el solvente orgánico, mezclándolos y añadiendo agua. Pero el procedimiento para la producción de liposoma que contiene el ligando de células reguladoras no está limitado al anterior.

60 El "liposoma que contiene el ligando de células reguladoras" se puede utilizar como el principio activo del fármaco.

65 Es decir, el fármaco de la presente invención es eficaz como agente preventivo o como agente terapéutico para las enfermedades alérgicas provocadas por el anticuerpo IgE porque el "liposoma que contiene el ligando de células reguladoras" que induce a las células NK o las células Tr1 productoras de IL-10 que son las células reguladoras, presenta la capacidad de suprimir la activación de los linfocitos T cooperadores y presenta una acción inhibitoria de la producción del anticuerpo IgE liberado por los linfocitos B. El anticuerpo IgE está profundamente asociado en particular con las enfermedades alérgicas y, por consiguiente, suprimiendo la producción (secreción) del mismo, es

5 posible obtener el efecto preventivo o el efecto terapéutico en las enfermedades alérgicas de tipo I. Las enfermedades alérgicas asociadas con el anticuerpo IgE incluyen asma bronquial atópica, dermatitis atópica y alergia nasal como la rinitis y polinosis alérgica. En la presente invención, la prevención de la enfermedad alérgica abarca no sólo conseguir que mamíferos, incluyendo humanos, que no han contraído la enfermedad no la contraigan sino también conseguir que los pacientes (mamíferos, incluyendo humanos) con la enfermedad alérgica que no han presentado los síntomas temporalmente se liberen del síntoma.

10 El fármaco también es eficaz como agente preventivo o agente terapéutico para enfermedades como la hepatitis fulminante porque el "liposoma que contiene el ligando de células reguladoras" presenta la acción de suprimir la activación de los linfocitos T.

15 El fármaco que contiene el liposoma que contiene la α -galactosil ceramida como el principio activo es eficaz como fármaco que presenta una capacidad inmunosupresora porque el liposoma que contiene la α -galactosil ceramida presenta el efecto de aumentar selectivamente la función inmunosupresora de las células T NK. Específicamente, el fármaco es eficaz como fármaco para enfermedades autoinmunitarias como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico y enfermedades del colágeno y como fármaco para el rechazo de trasplantes como EICH.

20 La α -galactosil ceramida no está especialmente limitada siempre que esté unida a la superficie del receptor de la célula NKT para aumentar selectivamente la función inmunosupresora de la célula NKT, pero resulta preferida una unión al receptor compuesto de Va24JaQ en humanos o Va14Ja281 en ratones. Su peso molecular es preferentemente de 400 a 2.000.

25 Por otro lado, el peso molecular de la β -galactosil ceramida es preferentemente de 400 a 2.000.

30 En otra forma de realización de la presente invención, se proporciona el fármaco que comprende el liposoma que contiene imiquimod como el principio activo. Al contener imiquimod en el liposoma, se aumentan las cantidades de producción de IL-10 y IFN α y de este modo se activan las células NK en comparación con el procedimiento de utilizar solamente imiquimod. Por consiguiente, el fármaco que comprende el liposoma que contiene imiquimod como el principio activo es útil para la prevención o para el tratamiento de las enfermedades alérgicas descritas anteriormente.

35 Acerca de la vía de administración del fármaco de la presente invención, el fármaco se puede administrar tanto oral como parenteralmente, y la vía se selecciona opcionalmente por un médico. El "liposoma que contiene el ligando de células reguladoras" como el principio activo se puede administrar por separado o en combinación con un vehículo que se utilice habitualmente.

40 Cuando el fármaco de la presente invención se administra oralmente, una forma del fármaco incluye formulaciones sólidas como comprimidos, comprimidos recubiertos, agentes en polvo, gránulos, cápsulas y píldoras, formulaciones líquidas como agentes líquidos (por ejemplo, gotas oculares, gotas nasales), suspensión, emulsión y jarabe, inhaladores como agentes aerosol, atomizadores y nebulizadores, y agentes de inclusión del liposoma.

45 Cuando el fármaco de la presente invención se administra parenteralmente, la forma del fármaco incluye agentes inyectables (agentes líquidos, suspensiones) utilizados para inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular e inyección intraperitoneal, agentes líquidos, suspensiones, emulsiones y agentes de goteo.

50 Cuando el fármaco de la presente invención es una formulación líquida, el fármaco se puede guardar congelado o liofilizado extrayendo el agua. Se añade agua destilada inyectable a la formulación liofilizada para redisolver la formulación antes de su utilización.

55 Los vehículos farmacéuticamente aceptables utilizados para el fármaco de la presente invención, es posible ejemplificar aglutinantes, disgregantes, surfactantes, aceleradores de absorción, agentes de retención de humedad, absorbentes, lubricantes, expansores, extensores, agentes transmisores de humedad, conservantes, estabilizadores, emulsionantes, agentes solubilizantes, sales que controlan la presión osmótica, agentes de dilución como tampones y excipientes utilizados habitualmente dependiendo de la forma de la formulación.

60 Adicionalmente, el fármaco de la presente invención puede contener agentes colorantes, agentes conservantes, perfumes, aromatizantes y edulcorantes, y otros componentes farmacéuticos si son necesarios para preparar el agente.

65 Una cantidad eficaz del "liposoma que contiene el ligando de células reguladoras" se puede determinar fácilmente por los expertos en la materia en base a las técnicas convencionales, y es, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a 100 mg por 1 kg de peso corporal y preferentemente aproximadamente de 1 a 10 mg, y se puede administrar repartido entre 1 a 3 veces al día. Resulta preferido ajustar opcionalmente la dosis dependiendo de la forma de cada formulación, el género, la edad y la patología del paciente.

Ejemplos

5 La presente invención se describirá haciendo referencia a los ejemplos siguientes, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos, y no es necesario destacar que se pueden introducir los cambios habituales en la técnica de la presente invención.

Ejemplo 1 (Ejemplo preparativo)

10 <Preparación de un liposoma que contiene un ligando y medición de la actividad>

1. Preparación de un liposoma que contiene una β -galactosil ceramida (Lipo- β)

15 L- α - fosfatidiletanolamina, dioleoil (DOPE; Wako Pure Chemical # 166-16183, 0,77 mg), 0,83 mg de clorhidrato de colesteryl 3 β -N- (dimetilaminoetil)carbonato (DC-chol; SIGMA-Aldrich) y 0,029 mg de 1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina- N- [metoxi (polietilenglicol)-2000] (AVANTI POLAR-LIPIDS, INC. # i88653) se disolvieron en 250 μ l de solvente cloroformo/metanol (1:1). La β -galactosil ceramida (β -D- galactosido de ceramida; Sigma Aldrich # C4905, 0,16 mg) se disolvieron separadamente en 250 μ l de solvente cloroformo/metanol (1:1). Ambos se
20 mezclaron y se evaporaron utilizando un evaporador; y posteriormente se dejaron secando durante toda la noche en un desecador al vacío. Después, se añadieron 800 μ l de agua, la mezcla se trató con un sonicador durante un minuto, después se seleccionaron los tamaños de partícula por filtración por presión utilizando un extrusor (AVESTIN; LipoFast-Basic), y las partículas se esterilizaron con una membrana que presenta un tamaño de poro de 0,22 μ m. Esta composición de liposoma (Lipo- β) se ajustó a una concentración final de 200 μ l/ml. Utilizando el mismo procedimiento, se preparó una composición de liposoma que no contiene una β -galactosil ceramida (Lipo-0).
25 Un producto eluido con una columna de separación NAP-10 después de la mezcla con el oligonucleótido CpGODN (1668) (suministrado por SIGMA GENOSIS) se recogió con Lipo- β a una proporción en peso de 5:1 se transformó en Lipo- β -CpG.

2. Preparación de un liposoma que contiene imiquimod

30 L- α - fosfatidiletanolamina, dioleoil (DOPE; Wako Pure Chemical # 166-16183, 0,77 mg), 0,83 mg de clorhidrato de colesteryl 3 β -N- (dimetilaminoetil)carbonato (DC-chol; SIGMA-Aldrich) y 0,029 mg de 1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina- N- [metoxi (polietilenglicol)-2000] (AVANTI POLAR-LIPIDS, INC. # i88653) se disolvieron en 250 μ l de solvente cloroformo/metanol (1:1). Imiquimod (Sequoiq Research Productos Lts; SRP0058i, 0,16 mg) se
35 disolvieron separadamente en 250 μ l de solvente cloroformo/metanol (1:1). Ambos se mezclaron y se evaporaron utilizando un evaporador; y posteriormente se dejaron secando durante toda la noche en un desecador al vacío. Después, se añadieron 800 μ l de agua, la mezcla se trató con un sonicador durante un minuto, después se seleccionaron los tamaños de partícula por filtración por presión utilizando un extrusor (AVESTIN; LipoFast-Basic), y las partículas se esterilizaron con una membrana que presenta un tamaño de poro de 0,22 μ m. Esta composición
40 de liposoma (Lipo-Imq) se ajustó a una concentración final de 200 μ l/ml. Utilizando el mismo procedimiento, se preparó una composición de liposoma (Lipo-Imq- BGC) que no contiene una β -D-galactósido de ceramida (Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich # C4905). Un producto eluido con una columna de separación NAP-10 después de la mezcla con el oligonucleótido CpGODN (1668) (suministrado por SIGMA GENOSIS) se recogió con Lipo-Imq a una proporción en peso de 5:1 se transformó en Lipo-Imq-CpG.

3. Medición de la actividad *in vitro* del liposoma que contiene un ligando para las células dendríticas (CD)

Se inyectó colagenasa D (1 mg/ml, Roche) en el bazo de ratones BLBC/c o C57BL/6, los cuales se incubaron después en un incubador de CO₂ durante 45 minutos. Posteriormente, las células se recogieron del bazo, se
50 suspendieron en 3 ml de HistoDenz (14,1%, SIGMA), y se les superpuso X-VIVO 15 (Takara Bio) que contiene 50 μ M de 2-mercaptoetanol (2ME). Después se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos, las células de una capa intermedia se recogieron y se incubaron en un medio X-VIVO 15 que contiene 2ME 50 μ M, medio bovino fetal 0,5% y 20 ng/ml de rmGM-CSF (Pharmingen) en el incubador de CO₂ durante 1 hora y media. Después de pipetear suavemente, las células suspendidas se eliminaron, se añadió medio X-VIVO 15 que contiene 2ME 50 μ M, medio
55 bovino fetal 0,5% y 20 ng/ml de rmGM-CSF (Pharmingen) y las células se incubaron en un incubador de CO₂ durante 18 horas. Las células suspendidas se recogieron, y las células unidas a las micropartículas magnéticas de anticuerpo anti-CD11c (Miltenyi) para transformar las células CD CD11c⁺ del bazo. Las células CD CD11c⁺ a 1×10^4 células se suspendieron en 200 μ l de medio RPMI que contiene suero bovino fetal al 10% en una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos, se añadió la composición de liposoma a una concentración final de
60 1 μ g/ml, y la placa se incubó en el incubador que contiene 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. Después de 48 horas, los sobrenadantes del cultivo se recogieron, y se midieron los niveles de IFN- α , IL-10 e IL-12 mediante ELISA (figuras 1 y 2). Los niveles de IL-10 y de IFN- α fueron superiores mientras que los niveles de IL-12 fueron bajos en los grupos Lipo- β y Lipo-Imq. En cambio, en los grupos Lipo- β -CpG y Lipo-Imq-CpG, los niveles de IL-10 e IFN α fueron bajos mientras que los niveles de IL-12 fueron elevados. Al mismo tiempo, en el grupo de no adición (control), y los grupos Lipo-0 y la solución de β -galactosil ceramida, la producción de todas las citoquinas no se detectó o fue
65 muy baja. En el mismo procedimiento de evaluación, se midieron los niveles de producción de IL-10 en las CD

CD11c+ por Lipo-Imq- β GC. Como resultado, se encontró que Lipo-Imq- β GC indujo una producción de IL-10 a unos niveles mucho más elevados que Lipo- β sola o Lipo-Imq sólo (figura 3).

Ejemplo 2 (Ejemplo comparativo)

5

<Efecto inhibitorio de Lipo- β sobre la producción *in vivo* de un anticuerpo IgE>

Se inyectaron ratones BDF1 (5 ratones/grupo) por vía intraperitoneal con Lipo- β (2 μ g/ratón), después de 7 días (día 0), que fueron inmunizados primariamente con 0,1 μ g de DNP-OVA (Cosmobio) y 10 mg de aluminio. Al día 14 después de la inmunización primaria, se extrajo sangre del plexo venoso orbital, y se midieron en plasma los títulos de los anticuerpos de ant-DNP-IgG1, ant-DNP-IgE y ant-DNP-IgG2a mediante ELISA (día 14 en la figura 4). Los ratones fueron estimulados con DNP-OVA solo al día 35 de la inmunización primaria, y 7 días después, se midieron en plasma los títulos de los anticuerpos de ant-DNP-IgG1, ant-DNP-IgGE a partir de la sangre extraída del plexo venoso orbital mediante ELISA (día 42 en la figura 4). En el grupo Lip- β , al día 14, la producción de anticuerpos IgG y anticuerpos IgE parecía estar ya inhibida, y al día 42, el aumento de anticuerpos IgG y anticuerpos IgE se inhibió completamente después de la estimulación de la inmunización.

Ejemplo 3 (Ejemplo comparativo)

20 <Inducción de los linfocitos T reguladores por células dendríticas (CD) derivadas de ratones que han recibido Lipo- β >

1. Evaluación de la capacidad de activación *in vitro* de los linfocitos T

25 Se administró por vía intraperitoneal Lipo- β o solución salina (2 μ l/ratón) a ratones BALB/c, después de 7 días, se extrajo el bazo. Se inyectó Colagenasa D (1 mg/ml, Roche) en el bazo, que después se incubó en un incubador de CO₂ durante 45 minutos. Posteriormente, se recogieron las células del bazo, se suspendieron en 3 ml de HistoDenz (14,1%, sigma), y después se les superpuso X-VIVO 15 que contiene 50 μ M de 2-mercaptoetanol (2ME). Después se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos, las células de una capa intermedia se recogieron y se incubaron en un medio X-VIVO 15 que contiene 2ME 50 μ M, suero bovino fetal al 0,5% y 20 ng/ml de rmGM-CSF (Pharmingen) en el incubador de CO₂ durante 1 hora y media. Después de pipetear suavemente, las células suspendidas se eliminaron, se añadió medio X-VIVO 15 que contiene 2ME 50 μ M, suero bovino fetal 0,5% y 20 ng/ml de rmGM-CSF (Pharmingen) y se incubaron en un incubador de CO₂ durante 18 horas. Las células suspendidas se recogieron, y las células unidas a las micropartículas magnéticas de anticuerpo anti-CD11c (Miltenyi) para transformar las células CD11c⁺ del bazo. Los linfocitos T se recogieron de un ratón DO11.10 transgénico TCR $\alpha\beta$ específico para OVA (suministrado por Toshinori Nakayama, Graduate School of Medicine Chiba University; Science, 1990, vol. 250, p1720) utilizando unas micropartículas magnéticas de anticuerpo (Miltenyi). Posteriormente, se cultivaron las CD CD11c⁺ a una concentración de 2 x 10⁴ células y los linfocitos T a una concentración 1 x 10⁵ células se cultivaron en presencia del péptido OVA en el incubador durante 4 días, posteriormente se recogió el sobrenadante del cultivo, y se determinaron los niveles de IFN γ , IL-4 e IL-10 mediante ELISA (figura 5). Como resultado, cuando se utilizaron CD del bazo del ratón que recibió Lipo- β y cuando se utilizaron CD del bazo del ratón que recibió solución salina (normal), no se observaron diferencias en los niveles de IL-4 ni en la producción de IFN γ . Sin embargo, la producción de IL-10 sólo se observó a unas concentraciones del péptido OVA de 3 nM y 30 nM cuando se utilizaron las CD del bazo del ratón que recibió Lipo- β . Simultáneamente, también se identificó la proliferación de las células reguladoras.

2- Evaluación del efecto inhibitorio *in vivo* de la producción de anticuerpos IgE mediante un procedimiento de transferencia adoptiva

50 Se recogieron los linfocitos T CD4⁺ DO11.10 que habían proliferado a unas concentraciones de péptido OVA de 3 nM o 30 nM y las CD del bazo del ratón que recibió Lipo- β en el experimento *in vitro* del punto 1 anterior, y 1x10⁶ células de los mismos se transfirieron por vía intraperitonealmente a unos ratones BALB/c (3 ratones/grupo). Después de 1 hora, los ratones se inmunizaron primariamente con DNP-OVA (10 μ g) y aluminio (10 mg), y al día 14 se extrajo sangre del plexo venoso orbital. Los títulos de los anticuerpos anti-DNP-IgG1, anti-DNP-IgE y anti-DNP-IgG2a en plasma se midieron mediante ELISA (figura 6). Como resultado se observó que la producción de anticuerpos IgE se inhibió completamente en los ratones en los cuales los linfocitos T DO11.10-CD4⁺, que crecieron mediante la estimulación del péptido OVA a 3 nM, se transfirieron por transferencia adoptiva. Al mismo tiempo, el efecto inhibitorio de la producción de anticuerpos IgE fue bajo en los ratones en los cuales los linfocitos T DO11.10-CD4⁺, que crecieron mediante la estimulación del péptido OVA a 3 nM, se transfirieron por transferencia adoptiva. La inhibición de la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a no fue destacable en ambos grupos.

60

Ejemplo 4

<Preparación de un liposoma que contiene un ligando y medición de la actividad>

5 1. Preparación de un liposoma que contiene una α -galactosil ceramida

Se disolvieron L- α - fosfatidiletanolamina, dioleoil (DOPE; Wako Pure Chemical # 166-16183, 077 mg) y 0,83 mg de clorhidrato de colestiril 3 β -N- (dimetilaminoetil)carbonato (DC-Chol; Sigma-Aldrich) disolvieron en 250 μ l de solvente cloroformo/metanol (1:1). La α -galactosil ceramida (0,16 mg, suministrados por RIKEN Research Center for Allergy and Immunology; KRN7000, ver el documento de Publicación Internacional WO 98/44928,) se disolvió separadamente en 250 μ l de solvente cloroformo/metanol (1:1). Ambos se mezclaron y se evaporaron utilizando un evaporador; y posteriormente se dejaron secando durante toda la noche en un desecador al vacío. Después, se añadieron 800 μ l de agua, la mezcla se trató con un pulverizador ultrasónico durante un minuto, y se filtraron a través de una membrana que presenta un tamaño de poro de 0,22 μ m. Esta composición de liposoma (Lipo- α GC) se ajustó a una concentración final de 200 μ l/ml. Utilizando el mismo procedimiento, se preparó una composición de liposoma que no contiene una α -galactosil ceramida (Lipo(-)) como control.

20 2. Medición de la producción de citoquinas por Lipo- α GC

Las células del bazo a una concentración de 2×10^5 de ratones C57BL/6 se suspendieron en 200 μ l de medio RPMI que contiene suero bovino fetal al 10% (FCS) al que se añadieron 100 ng/ml de Lipo(-), Lipo- α GC o solución acuosa de α -galactosil ceramida (α - GalCer), después la suspensión de células se añadió a una placa de cultivo con fondo U de 96 pocillos, y se cultivó en un incubador que contiene 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C durante 2 días. Los niveles de IFN- γ , IL-4 e IL-10 producidos en el sobrenadante del cultivo se midieron mediante ELISA (figura 7 paneles superiores). Los niveles de IFN- γ e IL-4 fueron equivalentes en el grupo Lipo- α GC y en el grupo α - GalCer, pero el nivel de IL-10 en el grupo Lipo- α fue 5 veces superior a la del grupo α - GalCer. Cuando se realizaron los mismos experimentos en presencia de un anticuerpo de neutralización anti-CD1d (1B1, BD Bioscience Pharmingen) a una concentración final de 10 μ g/ml o utilizando células del bazo de ratones deficientes en células V α 14-NKT (partiendo de C57BL/6), no se detectaron IFN- γ , IL-4 e IL-10 en el sobrenadante del cultivo (figura 7 paneles inferiores).

30 3. Evaluación de la capacidad de proliferación de las células V α 14-NKT por Lipo- α GC

Se administró por vía intraperitoneal Lipo- α GC (2 μ g/ratón), o Lipo(-) o solución salina a ratones C57BL/6. Al tercer día (día 3) y al 7º día (día 7), las células del bazo se tiñeron con el tetrámero α GalCer/CD1d y el anticuerpo anti-TCR β y se analizó el número de células doble positivo (células V α 14-NKT) por citometría de flujo. A modo de resultado, se identificó que el número de células V α 14-NKT en el bazo del ratón 3 días después de la administración de Lipo- α se incrementó 2 veces o más comparado con el de bazo al cual se administró solución salina, pero al día 7, el número se redujo inversamente comparado con el de los ratones control (figura 8).

40 **Ejemplo 5**

<Efecto inhibidor de Lipo- α GC en la producción de anticuerpo *in vivo*>

45 1. Evaluación de la actividad en el sistema de producción de anticuerpo *in vivo* utilizando ratones C57BL/6 y ratones deficientes en IL-10

Se administró por vía intraperitoneal solución salina, α GalCer, Lipo(-) o Lipo- α GC (2 μ g/ratón) a ratones C57BL/6 (5 ratones/grupo), después de 3 días, estos ratones se inmunizaron por inmunización primaria con DNP-OVA y aluminio. Al día 14 después de la inmunización primaria, se extrajo sangre del plexo venoso orbital, y se midieron en plasma los títulos de los anticuerpos de ant-DNP-IgG1, ant-DNP-IgE y ant-DNP-IgG2a mediante ELISA. A modo de resultado, el efecto inhibidor en la producción de anticuerpos en el grupo Lipo- α GC tiende a ser superior al del grupo α GalCer para todos los isotopos examinados (figura 9 paneles superiores). Se llevó a cabo el mismo experimento utilizando ratones deficientes en IL-10 con la base de ratones C57BL/6. A modo de resultado, no se observó ningún efecto inhibidor en la producción de anticuerpos (figura 9 paneles inferiores).

60 2. Evaluación de la actividad en el sistema de producción de anticuerpo *in vivo* utilizando ratones BDF1

Se administró por vía intraperitoneal solución salina, α GalCer, Lipo(-) o Lipo- α GC (2 μ g/ratón) a ratones BDF1 (C57BL/6x DBA/2F1) (5 ratones/grupo), después de 3 días (día 0), estos ratones se inmunizaron por inmunización primaria con DNP-OVA y aluminio, y después el ratón fue estimulado con DNP-OVA sólo al 55º día (día 55) después de la inmunización primaria. A los días 0, 14, 55 y 64, se extrajo sangre del plexo venoso orbital, y se midieron los títulos de los anticuerpos de ant-DNP-IgE, anti-DNP-IgG1, y ant-DNP-IgG2a y los niveles plasmáticos de IgE total, IgG1 total e IgG2a total mediante ELISA. A modo de resultado, se identificó que el aumento en los títulos de los anticuerpos de todos los isotopos anti-DNP y la producción de IgE total fue casi completamente inhibida en el grupo

Lipo- α GC (figura 10). Al mismo tiempo, los cambios de IgG1 total e IgG2a total fueron prácticamente equivalentes en el grupo Lipo- α GC y en el grupo α GalCer o el grupo Lipo(-) (figura 10).

3. Evaluación de la capacidad de activación de los linfocitos T utilizando ratones BDF1

5 Se administró por vía intraperitoneal solución salina, α GalCer, Lipo(-) o Lipo- α GC (2 μ g/ratón) a ratones BDF1, después de 3 días, estos ratones se inmunizaron por inmunización primaria con DNP-OVA y aluminio. Después de 7 días, se extrajo el bazo, y los linfocitos T CD4⁺ se prepararon utilizando unas micropartículas magnéticas (Miltenyi).
 10 Posteriormente, las células presentadoras de antígeno por irradiación de las células de bazo completo del ratón BDF1 normal con radiación de 20 Gy. Los linfocitos T CD4⁺ a una concentración de 2×10^5 y las células presentadoras de antígeno a una concentración de 2×10^5 pulsada con DNP-OVA suspendidas en 200 μ l de medio se colocaron en un pocillo de una placa de cultivo con un fondo en U de 96 pocillos, y se cultivaron en el incubador que contiene 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. Después de 48 horas, se analizó la proliferación celular mediante el procedimiento MTT (Promega # G4000). Como resultado, se observó que los linfocitos T CD4⁺
 15 derivados del bazo del ratón al cual se administró Lipo- α GC no proliferaron en respuesta a DNP-OVA a todas las concentraciones examinadas, mientras que otros linfocitos T CD4⁺ proliferaron notablemente según el orden α GalCer, solución salina y Lipo(-) (figura 11, panel izquierdo). Por otra parte, cuando los linfocitos T CD4⁺ a una concentración de 2×10^5 se estimularon de forma no antígeno específica con 50 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich # P-1585) y 500 nM iomicina (Sigma- Aldrich # I-0634) en el incubador que contiene
 20 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C durante 48 horas, los linfocitos T CD4⁺ derivados del ratón al cual se administró Lipo- α GC mostraron una respuesta proliferativa menor pero significativa comparada con otros linfocitos T CD4⁺ (figura 11, panel derecho).

4. Análisis de las células dendríticas (CD) en el bazo de ratones a los cuales se administró Lipo- α GC

4.1 Análisis utilizando citometría de flujo

Se administró por vía intraperitoneal solución salina, α GalCer, Lipo(-) o Lipo- α GC (2 μ g/ratón) a ratones BALB/c, después de 3 días, se extrajo el bazo. Se inyectó colagenasa D (1 mg/ml, Roche) en el bazo, después éste se incubó en un incubador de CO₂ durante 45 minutos. Posteriormente, las células se recogieron del bazo, se suspendieron en 3 ml de HistoDenz (14,1%, SIGMA ALDRICH), y se les superpuso el medio X-VIVO 15 (CAMBREZ Bio Science Walkerville, Inc.) que contiene 50 μ M de 2-mercaptoetanol (2ME). Después se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos, se recogieron las células de la capa intermedia. Las células se lavaron con el medio X-VIVO 15 que contiene 2ME 50 μ M y SBF al 10%, se suspendieron en solución salina de fosfato tamponada (PBS) que contiene SBF al 0,5%. Se añadieron a la suspensión de células los anticuerpos biotinilados anti-CD3, -CD11b, -CD19, -CD49b, -GR-1, -TER-119 y -B220 (todos de BD Bioscience Pharmingen). Las células se incubaron a una temperatura de 10°C durante 20 minutos, después se lavaron una vez con PBS que contiene SBF al 0,5% y posteriormente se les añadieron partículas magnéticas conjugadas con estreptoavidina (SA) (Miltenyi). Las células se incubaron a una temperatura de 10°C durante 15 minutos, después se lavaron dos veces con PBS que contiene SBF al 0,5% y posteriormente se recogieron las células de micropartículas magnéticas negativas utilizando una columna de separación de micropartículas magnéticas y un imán Miltenyi). Las células resultantes se tiñeron con anticuerpo anti-CD11c marcado con PE (BD Bioscience Pharmingen) y anticuerpo anti-CD45RB marcado con APC(BD Bioscience Pharmingen), y se analizó por citometría de flujo. A modo de resultado, en las células derivadas del bazo del ratón al cual se administró Lipo- α GC, la proporción de células CD45RB^{alto}CD11c^{bajo} fue superior a la proporción de células CD45RB^{bajo}CD11c^{alto}, mientras que la proporción se invirtió en las células derivadas del ratón al cual se administró solución salina, Lipo(-) o α GalCer (figura 12). Las proporciones además se compararon en términos de número de células en el bazo. Como resultado, se demostró que el número de células CD45RB^{alto}CD11c^{bajo} en el bazo del ratón al cual se administró Lipo- α GC aumentó tres veces más que el número de células correspondientes al bazo del ratón al cual se administró α GalCer mientras que inversamente el número de CD45RB^{bajo}CD11c^{alto} aumentó en el ratón al cual se administró α GalCer más que el ratón al cual se administró Lipo- α GC (figura 13).

Las células CD45RB^{alto}CD11c^{bajo} es el grupo de células descrito como células dendríticas controlable y presenta una función inmunosupresora. Al contrario, la célula CD45RB^{bajo}CD11c^{alto} es la célula dendrítica que activa los linfocitos T y presenta una función inmuno-estimuladora. De este modo, se ha especulado que la función inmunosupresora de los linfocitos T se producía gracias al aumento en el número de células CD45RB^{alto}CD11c^{bajo}.

4.2. Evaluación de la capacidad de producción de citoquinas

60 Las células CD45RB^{alto}CD11c^{bajo} y las células CD45RB^{bajo}CD11c^{alto} que se han separado mediante el procedimiento descrito anteriormente se recogen separadamente utilizando citometría de flujo (FACS Vantage Se, BD Bioscience), y las células a una concentración de 1×10^5 /200 μ l del medio se añadieron en un pocillo en la placa de cultivo con fondo U de 96 pocillos. Las células se cultivaron en presencia o en ausencia de lipopolisacárido (LPS; T3382, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 μ g/ml durante 2 días. Los niveles de las citoquinas IL-10 e IL-12 en el sobrenadante del cultivo se midió mediante ELISA. Como resultado, la IL-10 se detectó y la IL-12 no se detectó en el sobrenadante del cultivo de las CD45RB^{alto}CD11c^{bajo} estimuladas con LPS mientras IL-12 se detectó e

IL-10 no se detectó en el sobrenadante del cultivo de las CD45RB^{bajo}CD11c^{alto} independientemente de la presencia o ausencia de LPS (figura 14).

4.3. Evaluación de la capacidad de activación de los linfocitos T

La población de células CD45RB^{alto}CD11c^{bajo} y la población de células CD45RB^{bajo}CD11c^{alto} separadas mediante el procedimiento descrito anteriormente en el punto 2 se añadieron en un pocillo en la placa de cultivo con fondo U de 96 pocillos a una concentración de $1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ del medio. Los linfocitos T CD4⁺ purificados del bazo de D011.10 mediante micropartículas magnéticas (Milyenyi) se añadieron a una concentración de $4 \times 10^6/200 \mu\text{l}$ del medio. Las células se cultivaron en presencia o en ausencia del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ a una concentración final de 600 nM en el incubador que contiene 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. Después de 48 horas, se analizó la proliferación celular mediante el procedimiento MTT (Promega # G4000). Como resultado, se observó que los linfocitos T CD4⁺ estimulados con las células CD45RB^{alto}CD11c^{bajo} y el péptido OVA mostraron una respuesta proliferativa ligeramente inferior pero significativa comparada con la respuesta proliferativa inducida por las células CD45RB^{bajo}CD11c^{alto} (figura 15). Los linfocitos T CD4⁺ crecieron mediante estimulación con las CD45RB^{alto}CD11c^{bajo} y el péptido OVA durante 7 días se recogieron, y se cultivaron con las células CD45RB^{alto}CD11c^{bajo} o las células CD45RB^{bajo}CD11c^{alto} separadas/recolectadas de nuevo en presencia del péptido OVA durante 7 días. Este cultivo se realizó una vez más, y al 5º día, las células en cultivo se analizaron por citometría de flujo. Como resultado, se identificó que el grupo de células que creció era una población de células prácticamente homogénea que presentaba CD4⁺, CD25⁺, CD28⁺, CD152⁻ e ICOS⁺ (figura 16). Posteriormente, estas células a una concentración de 5×10^5 se cultivaron en presencia de PMA a una concentración final de 50 ng/ml, ionomicina 500 nM y Monensina 2 μM (Sigma-Aldrich # M5273) en el incubador que contiene 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C durante 4 horas. Las células se recogieron, se suspendieron en 100 μl de una solución BD Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience) y se incubaron a una temperatura de 4°C durante 15 minutos. Las células se lavaron con BD Perm/Wash (BD Bioscience), se tiñeron intracelularmente con anticuerpo anti-IFN γ marcado con FITC, anticuerpo anti-IL-4 marcado con PE (BD Bioscience Pharmingen), anticuerpo anti-IL-10 marcado con APC (BD Bioscience Pharmingen) y también simultáneamente mediante tinción intracelular triple utilizando unos anticuerpos control con isotopo marcado con fluorescencia (figura 17 panel superior). Después, las células se analizaron por citometría de flujo. Como resultado, en el grupo de células que expresan citoquinas, se identificó que prácticamente ninguna célula que expresa únicamente IL-4 y el número de células era mayor en orden de las células que sólo expresan IFN γ < las células que expresan tanto IL-10 como IFN γ < las células que sólo expresan IL-10 (figura 17, paneles inferiores).

Ejemplo 6 (Ejemplo comparativo)

<Efecto inhibidor del liposoma que contiene alérgeno y ligando de células reguladoras sobre la producción de anticuerpo IgE>

1. Preparación de un liposoma que contiene una α -galactosil ceramida y ovoalbúmina

Se disolvieron L- α -fosfatidiletanolamina, dioleoil (DOPC; Wako Pure Chemical # 166-16183, 0,77 mg) y 0,83 mg de clorhidrato de colesteril 3 β -N- (dimetilaminoetil)carbonato (DC-Chol; Sigma-Aldrich) y 0,029 mg de 1,2- distearoil-sn-glicero-3- fosetanolamina -N- [metroxil (polietilenglicol)-2000] (sal de amonio; PEG-PE, AVANTI POLAR-LIPIDS) en 250 μl de solvente cloroformo/metanol (1:1). La α -galactosil ceramida (0,16 mg, suministrados por RIKEN Research Center for Allergy and Immunology) se disolvió separadamente en 250 μl de solvente cloroformo/metanol (1:1). Ambos se mezclaron y se evaporaron utilizando un evaporador; y posteriormente se dejaron secando durante toda la noche en un desecador al vacío. Posteriormente, se añadieron a la mezcla 200 μl de solución acuosa que contiene 0,4 mg/ml de ovoalbúmina (OVA; Seikagaku Kogyo), la mezcla se trató utilizando un sonicador durante 10 minutos, y se filtraron a través de una membrana que presenta un tamaño de poro de 0,22 μm para la esterilización. Después, se seleccionaron los tamaños de partículas pasándola 25 veces a través de un extrusor LipoFast -Basic (Avestin Inc.) provisto de una membrana de policarbonato que presenta un tamaño de poro de 100 nm. La proteína OVA que no se había encapsulado en el liposoma se eliminó por concentración de los liposomas en los cuales OVA se había encapsulado utilizando un filtro de centrifugación Amicon Ultra-4 (PL-100) (Millipore) y se lavaron con agua purificada y finalmente se preparó el liposoma en 800 μl de una solución acuosa con agua purificada. Esta solución acuosa que contiene la composición del liposoma (Lipo- α GC+OVA) se analizó con electroforesis SDS, y posteriormente se identificó que la concentración de proteína OVA era de 50 $\mu\text{g/ml}$. Se supone que todas las α -GalCer se incorporaron en la membrana del liposoma, y a la concentración final de α -GalCer en la solución de Lipo- α GC+OVA fue de 200 $\mu\text{g/ml}$.

2. Inducción de los linfocitos T CD4⁺ reguladores que producen IL-10 mediante Lipo- α GC+OVA

Se administró Lipo- α GC o de Lipo- α GC+OVA (2 μg en términos de cantidad de α -GalCer) intraperitonealmente en ratones BDF1 (C57BL/6 x BDA/2 F1), después de 7 días, se extrajo el bazo, y los linfocitos T CD4⁺ se prepararon utilizando micropartículas magnéticas (Miltyenyi). Posteriormente, las células presentadoras de antígeno se prepararon mediante irradiación de las células totales del bazo a partir de un ratón BDF1 normal con una radiación de 20 Gy. Después, 3 ml de medio, los linfocitos T CD4⁺ a una concentración de $1,5 \times 10^6$, las células presentadoras de antígeno a una concentración de $7,5 \times 10^6$ y la proteína OVA a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ se añadieron

en un pocillo de una placa de cultivo de fondo en U de 6 pocillos, y se cultivaron en el incubador que contiene 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C durante 6 días. Posteriormente, las células a 5×10^5 se cultivaron en presencia de PMA a una concentración final de 50 ng/ml, 500 nM de ionomicina y Monensina 2 uM (Sigma -Aldrich) en el incubador que contiene 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C durante 4 horas. Se recogieron las células, se tiñeron con anticuerpo anti-CD4 biotinilado y Streptoavidina-Per CP-Cy5.5 (BD Bioscience). Posteriormente, las células se suspendieron en 100 µl de solución BD Cytotfix/cytoperm (BD Bioscience) y se incubaron a una temperatura de 4°C durante 15 minutos. Las células se lavaron solución BD Perm/Wash (BD Bioscience), después se tiñeron intracelularmente con anticuerpo anti-IFN γ marcado con FITC, anticuerpo anti-IL-4 marcado con PE (BD Bioscience Pharmingen), y anticuerpo anti-IL-4 marcado con APC (BD Bioscience Pharmingen) y se analizaron por citometría de flujo (figura 18). Como resultado, en el grupo de los linfocitos T derivados del bazo del ratón al cual se administró Lipo- α GC sin encapsular OVA, se detectó que 1,4% de células expresan sólo IL-4 y 1,1% células que expresan sólo IFN γ pero la población de linfocitos T CD4⁺ reguladores que expresa sólo IL-10 o IFN γ e IL-10 apenas se detectó. Por otra parte, en el análisis de los linfocitos T CD4⁺ derivados del bazo del ratón al cual se administró Lipo- α GC+OVA, se detectó la población de linfocitos T cooperadores que sólo expresa IL-4 (1,0%) y sólo IFN γ (9,9%), la población de linfocitos T CD4⁺ reguladores que producen IL-10 (14,1%) y la población de linfocitos T CD4⁺ reguladores (9,1%) que expresan tanto IL-10 como IFN γ . A partir de los resultados anteriores, se sugirió que Lipo- α GC que contiene alérgeno puede diferenciar y proliferar *in vivo* los linfocitos T CD4⁺ reguladores que presentan el efecto inhibitor en la producción de IgE.

3. Efecto inhibitor de la Lipo- α GC+OVA en la respuesta secundaria a un anticuerpo en ratones

Los ratones BDF1 se inmunizaron principalmente con DNP-OVA (0,1 µg) y gel de hidróxido de aluminio (2 mg). Después de 14 días, se midieron los títulos del anticuerpo en sangre anti-DNP-IgE, y se prepararon 3 grupos (5 ratones por grupo) de modo que el título medio de anticuerpos fue equivalente entre ellos. A los días 21, 28 y 35 después de la inmunización primaria, se administraron intraperitonealmente el liposoma sólo (vehículo), Lipo- α GC o Lipo- α GC+OVA a 2 µg en términos de cantidad de α -GalCer. Al día 42 después de la inmunización primaria, los ratones fueron estimulados con DNP-OVA solo. Al día 48, se midieron los títulos de anticuerpos de anti-DNP-IgE, anti-DNP-IgG1, anti-DNP-IgG2a, y los niveles de IgE total, IgG1 total y IgG2a total en sangre mediante ELISA (figura 19). Como resultado, el grupo Lipo- α GC+OVA, los títulos de los anticuerpos anti-DNP-IgE, anti-DNP-IgG1, anti-DNP-IgG2a se suprimieron significativamente. Por otra parte, en el grupo de Lipo- α GC que no contiene OVA, no se observó supresión significativa excepto la que se observó en el título del anticuerpo anti-DNP-IgG1. De los resultados anteriores, se sugiere que Lipo- α GC que contiene el alérgeno puede suprimir la respuesta secundaria del anticuerpo inducido por el alérgeno.

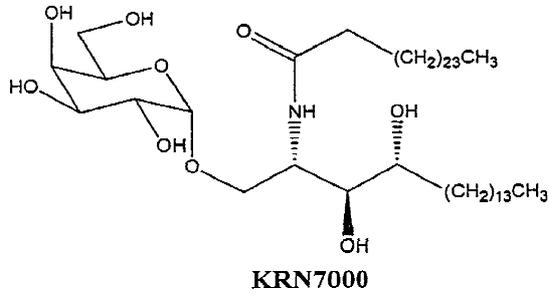
El "liposoma que contiene KRN7000" de la presente invención presenta acción inhibitora sobre la activación de los linfocitos T colaboradores y sobre la producción de anticuerpo IgE mediante la inducción de la diferenciación/proliferación y la activación y la activación de las células reguladoras. De este modo, el liposoma de la presente invención resulta útil como agente preventivo y agente terapéutico para las enfermedades alérgicas causadas por la respuesta alérgica de tipo I en la cual el anticuerpo IgE está muy implicado, en particular en el asma bronquial atópico, la dermatitis atópica y la rinitis alérgica como la polinosis y la conjuntivitis.

El liposoma resulta útil como fármaco para las enfermedades autoinmunitarias y en la enfermedad del injerto contra huésped porque el liposoma puede inhibir la diferenciación/proliferación de los linfocitos T patógenos aumentando selectivamente la función inmunosupresora en los linfocitos T NK.

Además, no es necesario considerar la aparición de efectos adversos para el fármaco de la presente invención porque el fármaco retiene la molécula unida selectivamente a la célula diana y presenta el liposoma que incluye KRN7000 en la membrana lipídica como principio activo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Fármaco para su utilización en el tratamiento de una enfermedad, seleccionada de entre el grupo constituido por las enfermedades alérgicas, enfermedades autoinmunitarias y enfermedad de huésped contra injerto, que comprende un liposoma que contiene como principio activo esencial, el KRN7000, que está representado por la fórmula:



- 10 2. Fármaco para su utilización según la reivindicación 1, en el que dicho liposoma contiene además el oligonucleótido CpG o imiquimod.
3. Fármaco para su utilización según la reivindicación 1 o 2, en el que la enfermedad es una enfermedad alérgica y dicho liposoma contiene además un alérgeno.
- 15 4. Fármaco para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las enfermedades alérgicas son asma bronquial atópica, rinitis alérgica, polinosis o dermatitis alérgica.

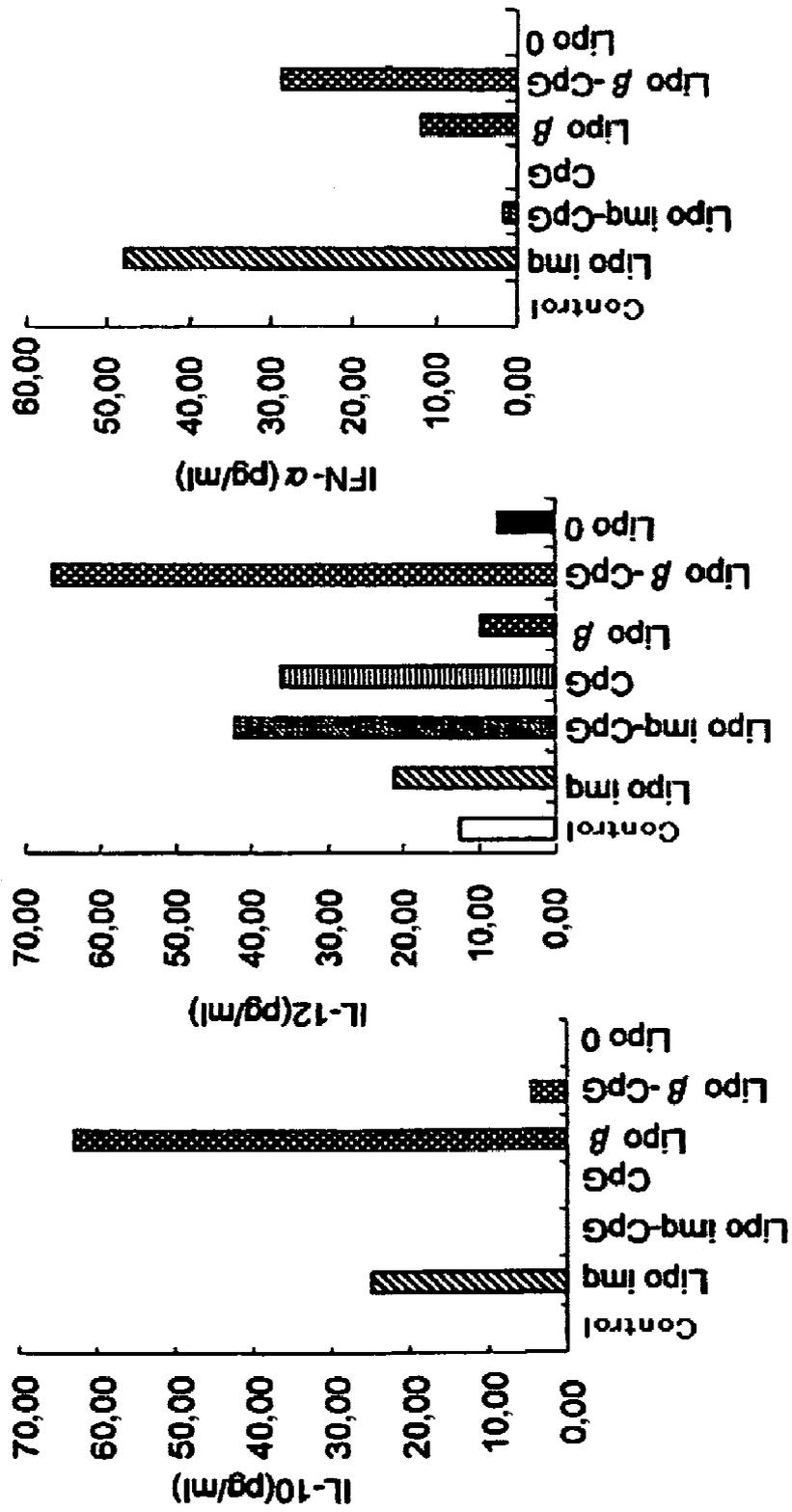


FIG. 1

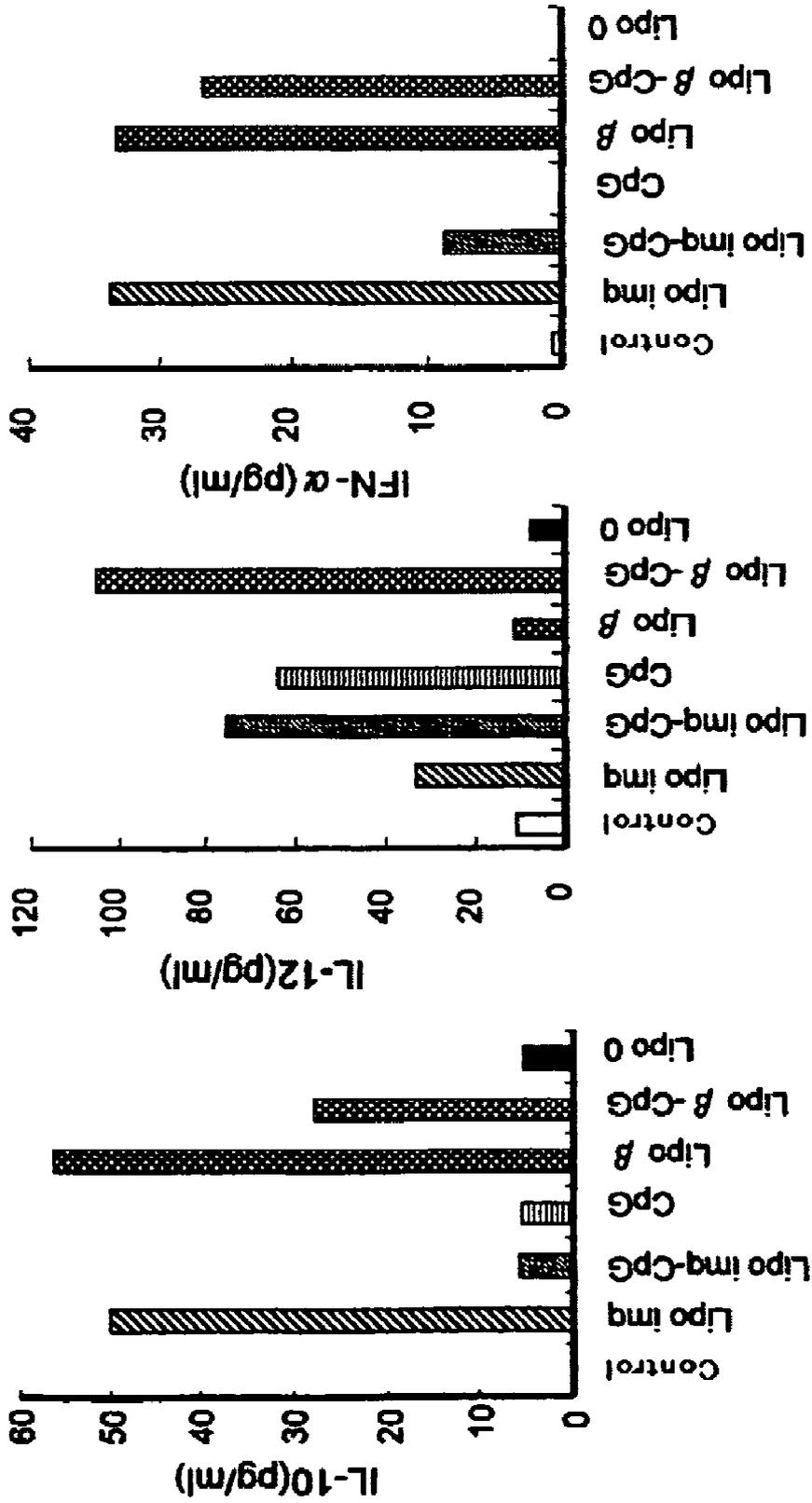


FIG. 2

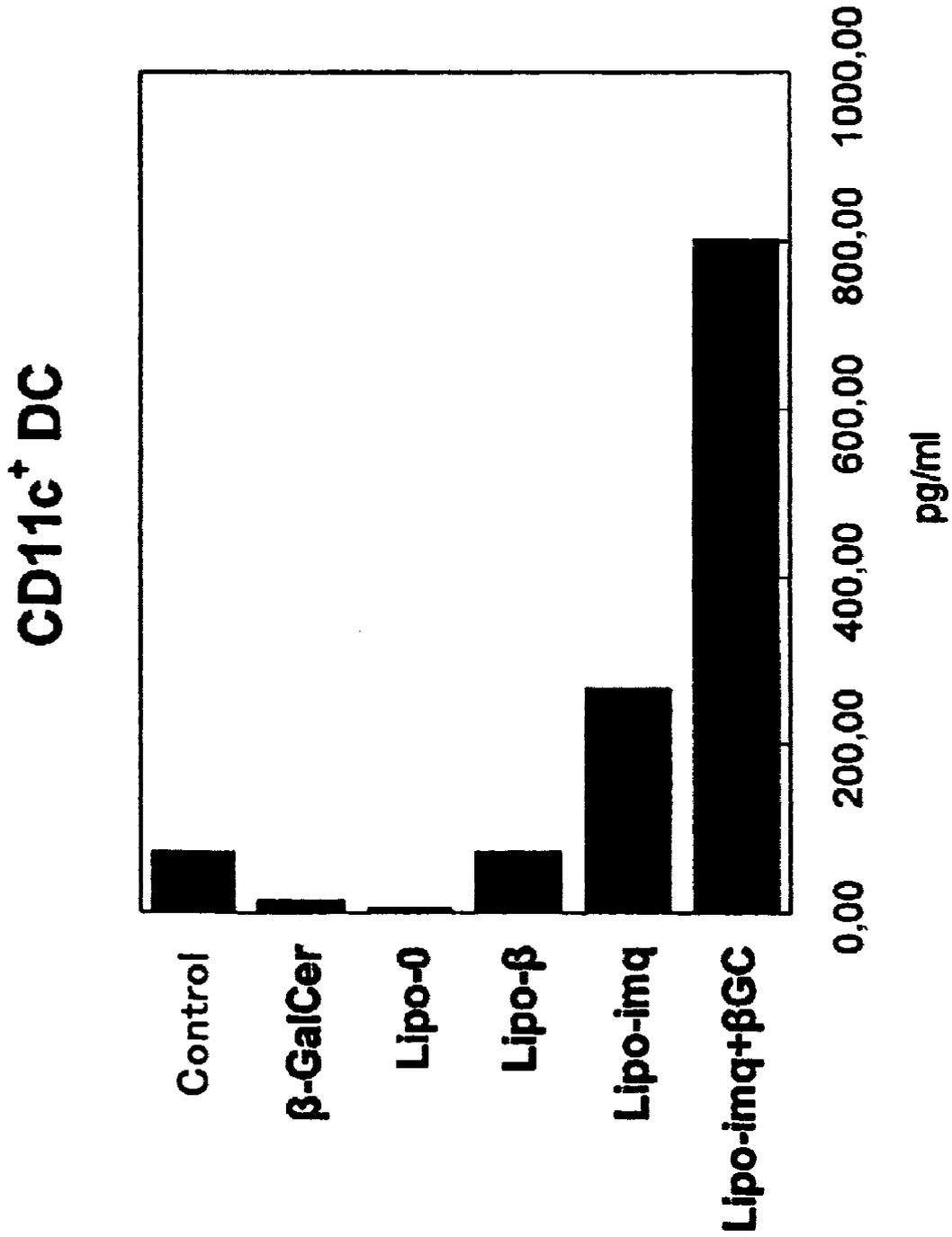


FIG. 3

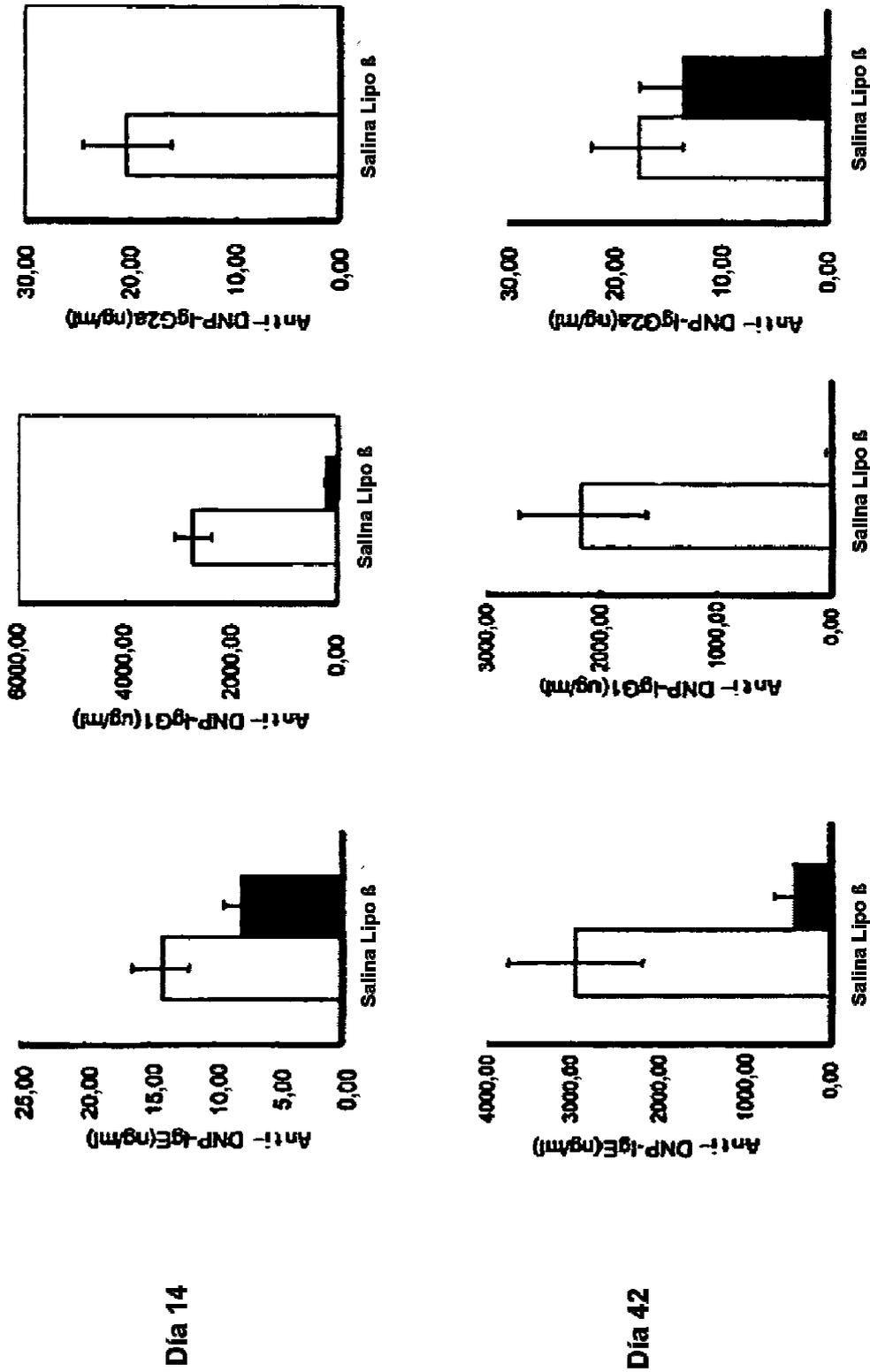


FIG. 4

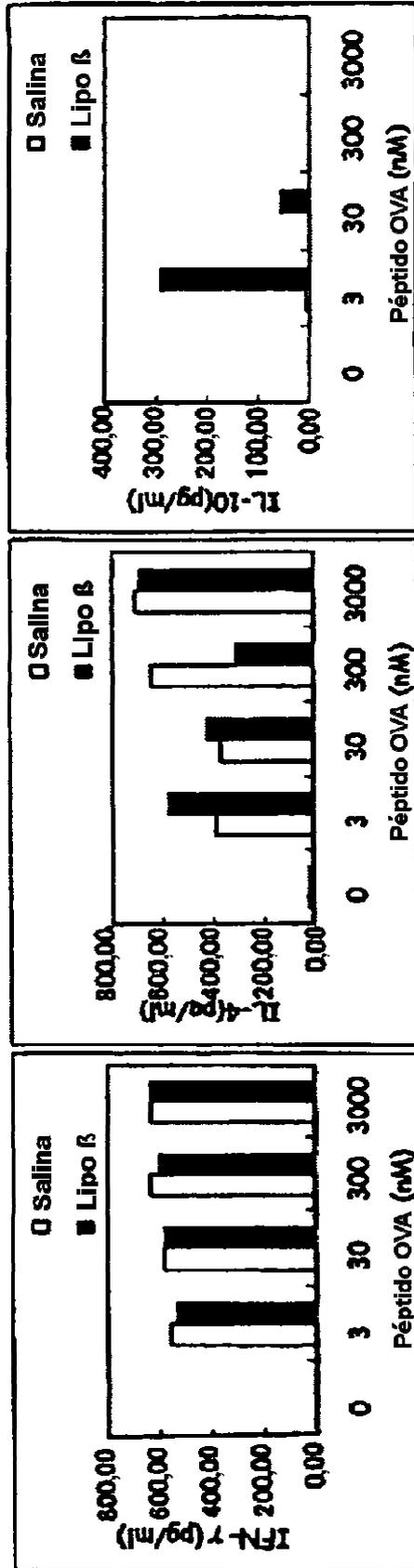


FIG. 5

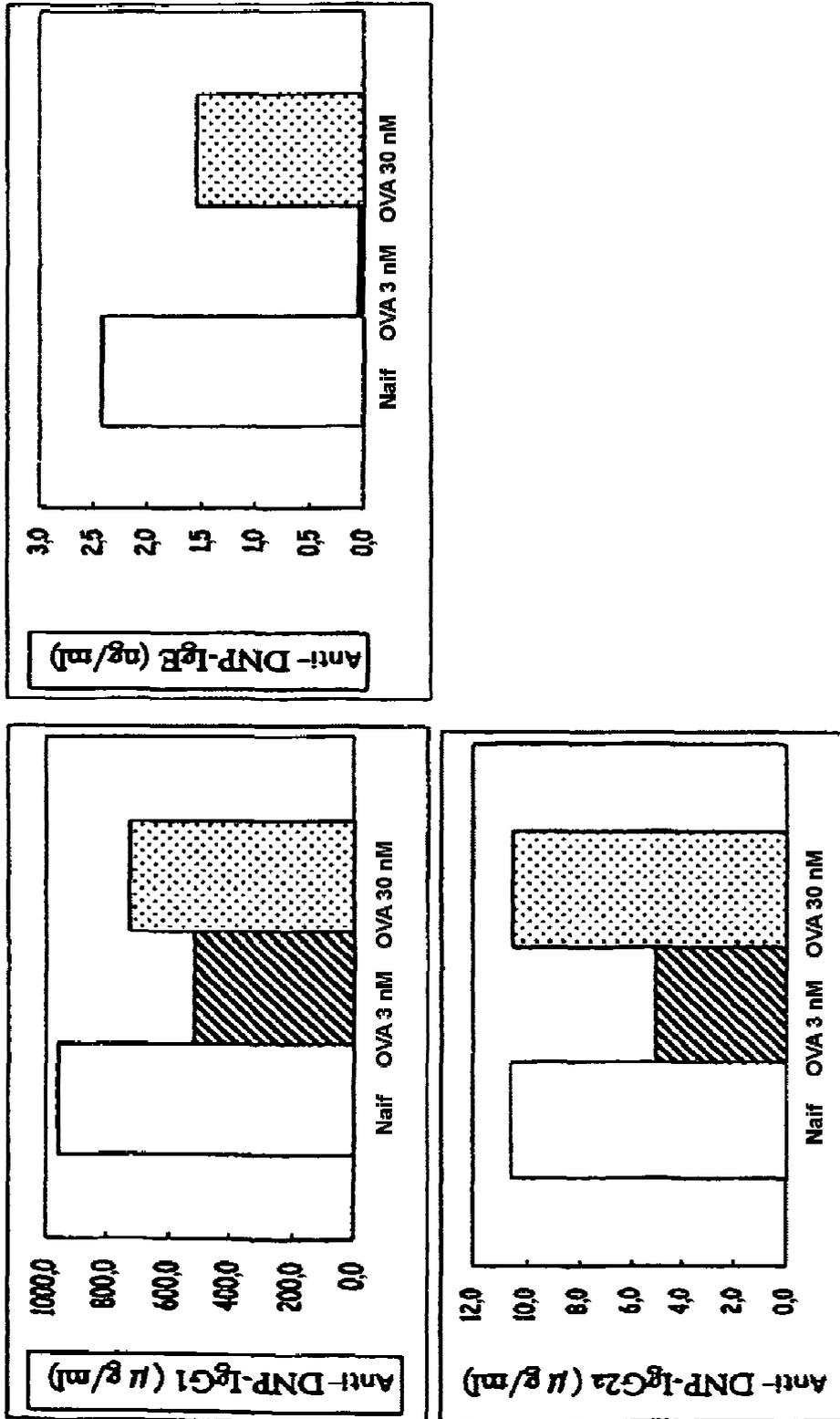


FIG. 6

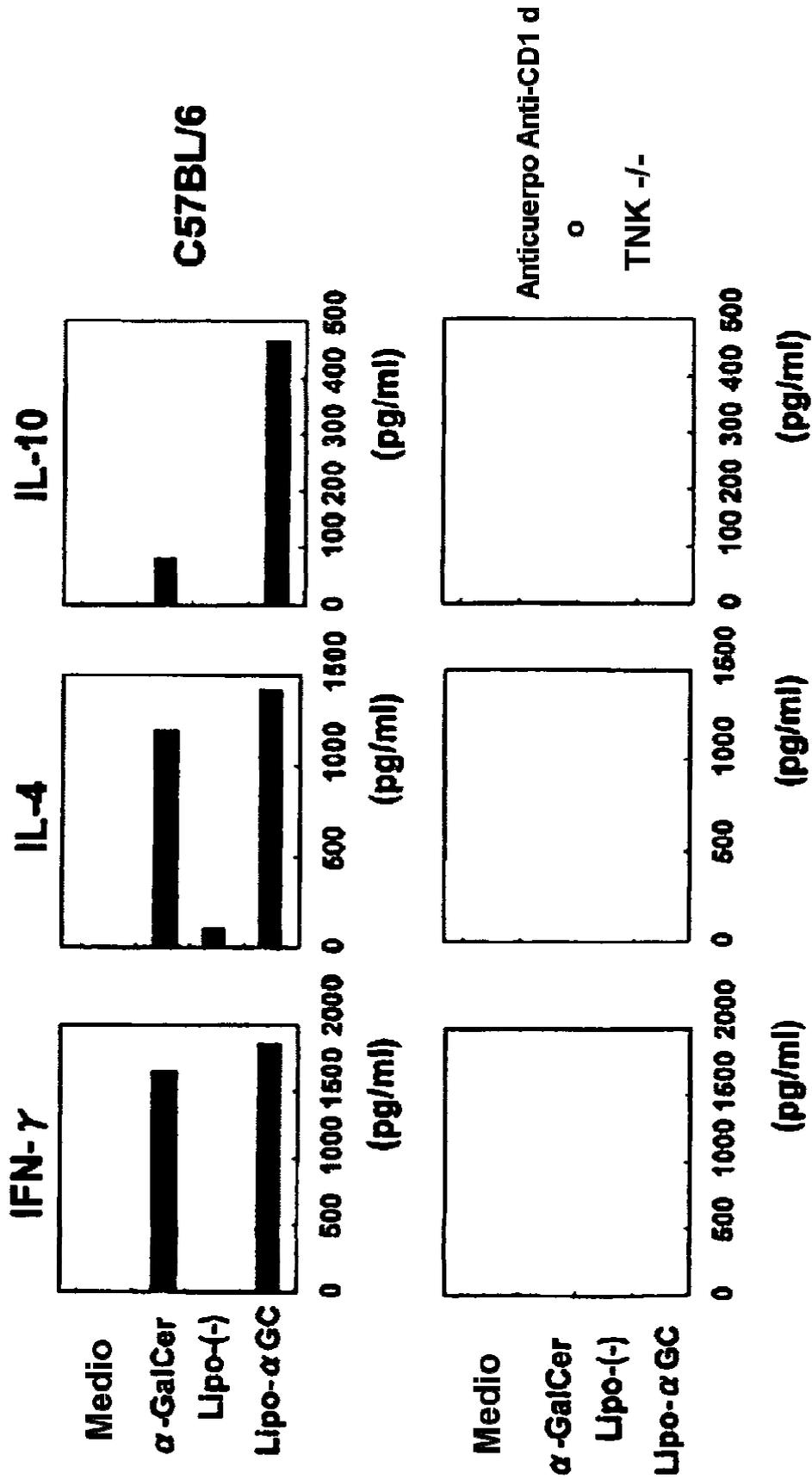


FIG. 7

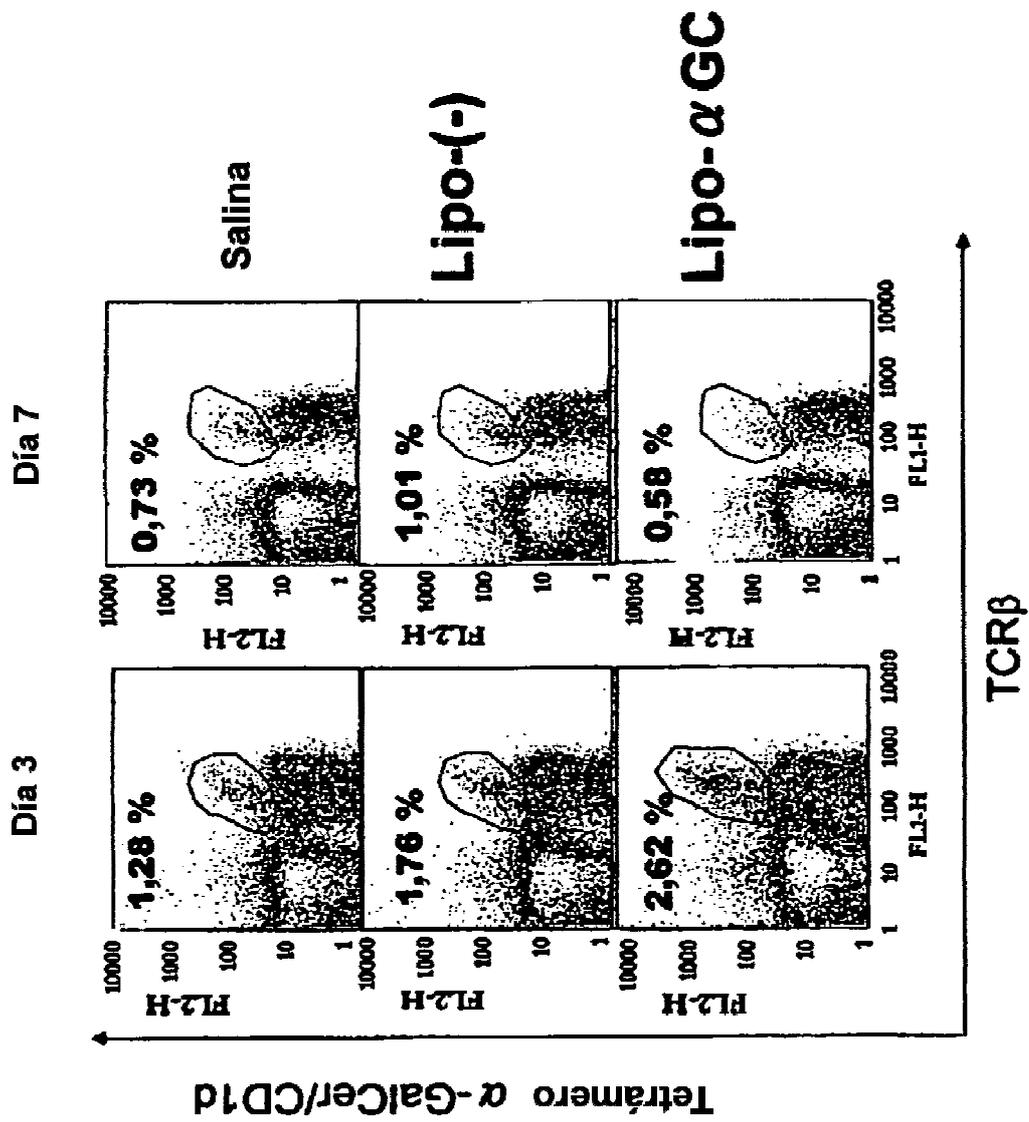


FIG. 8

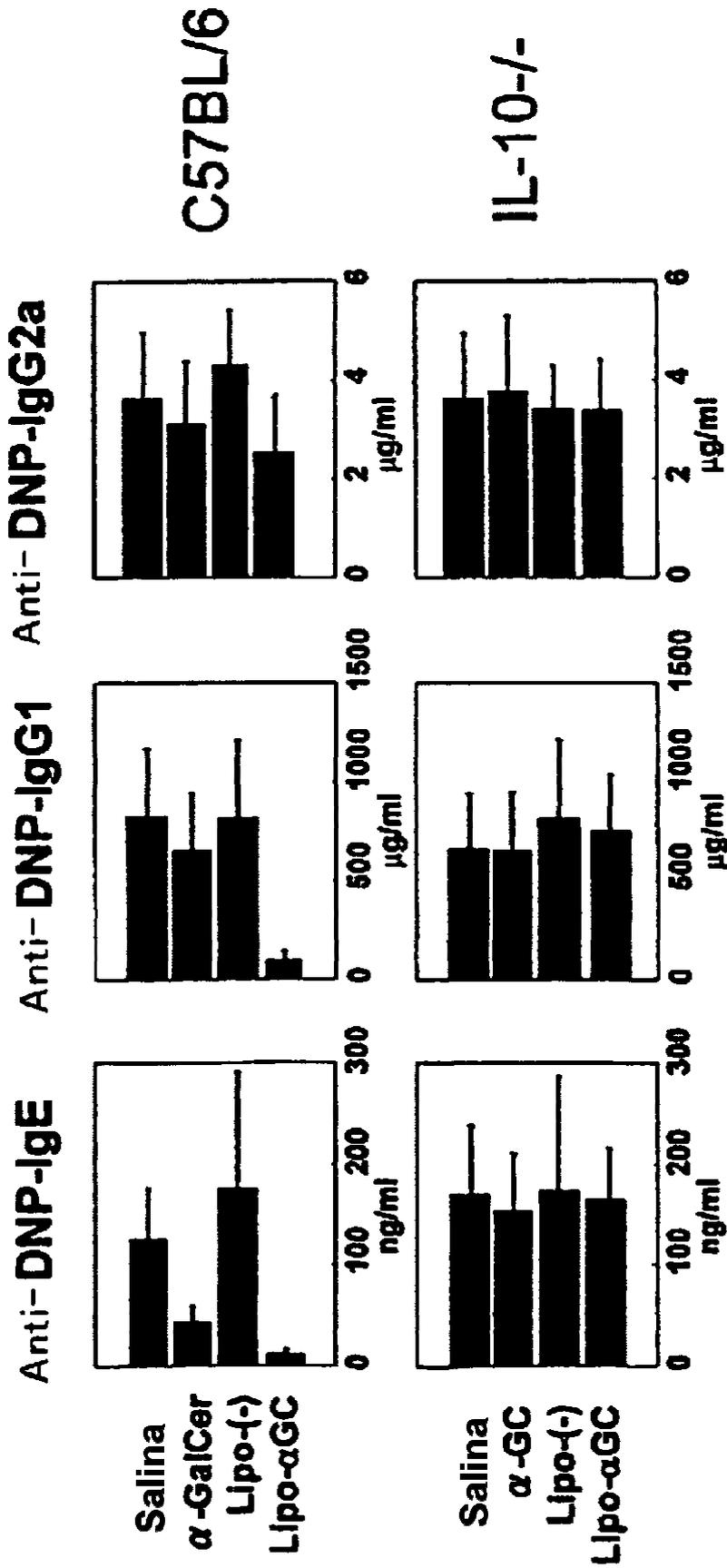


FIG. 9

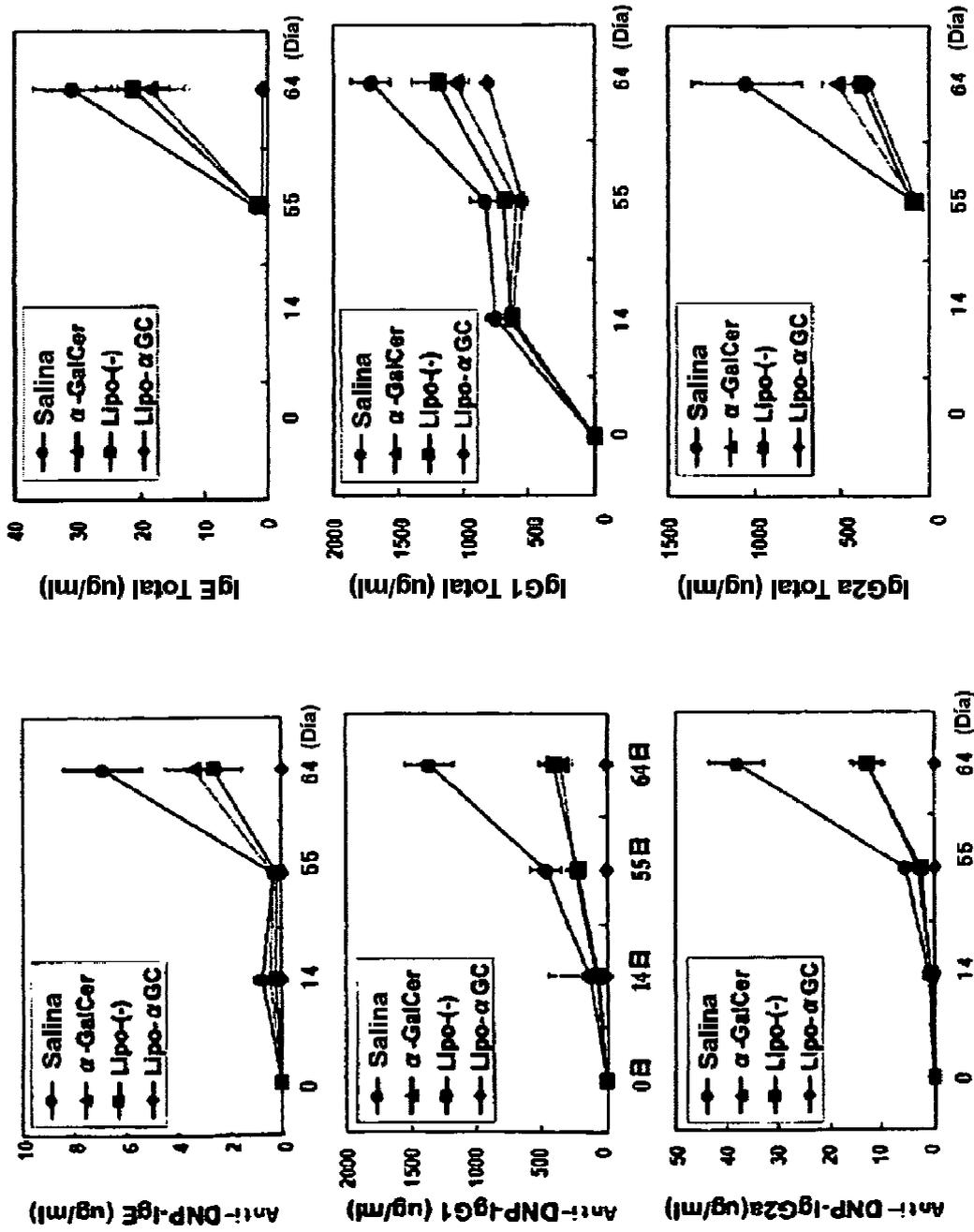


FIG. 10

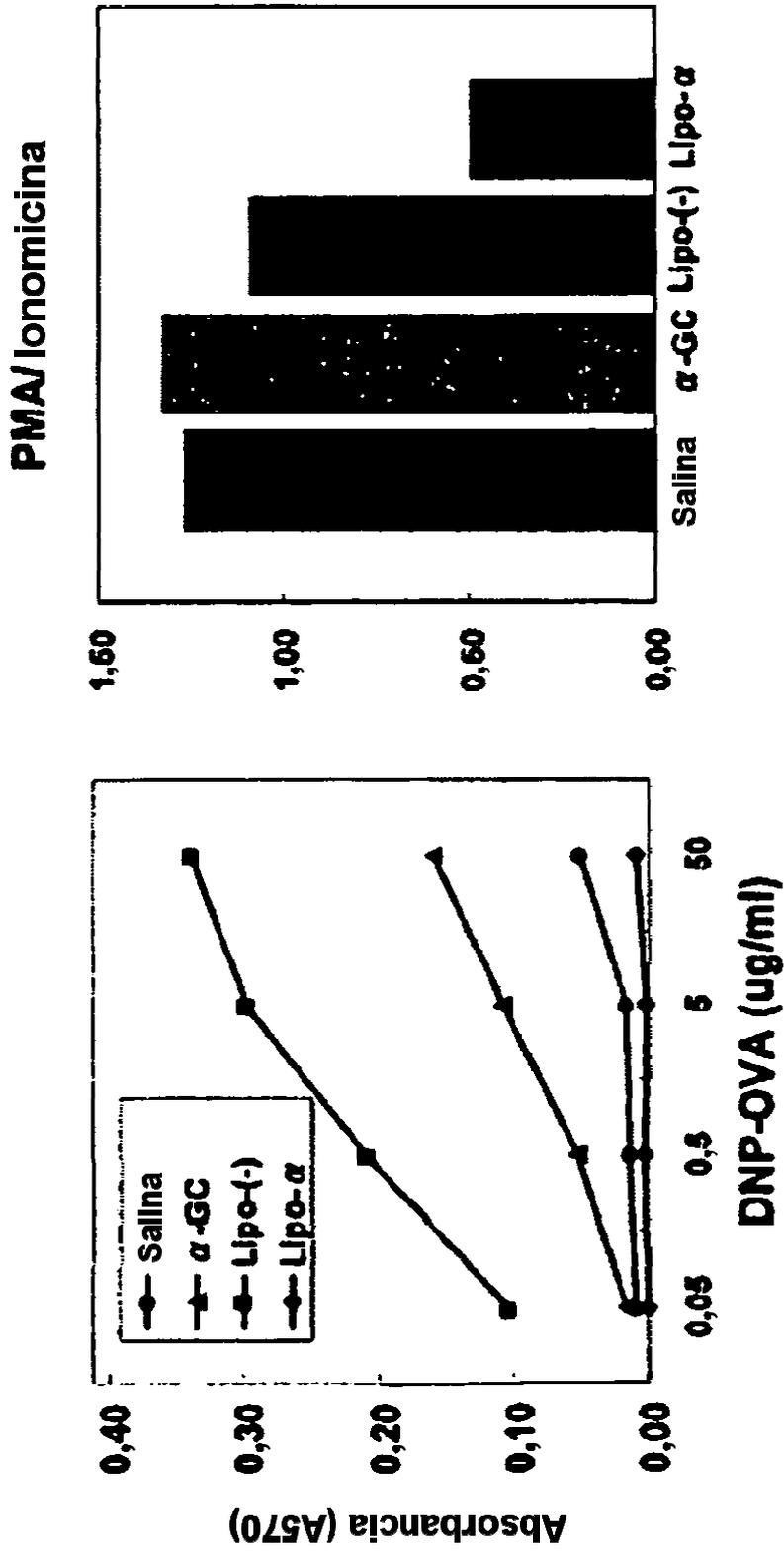


FIG. 11

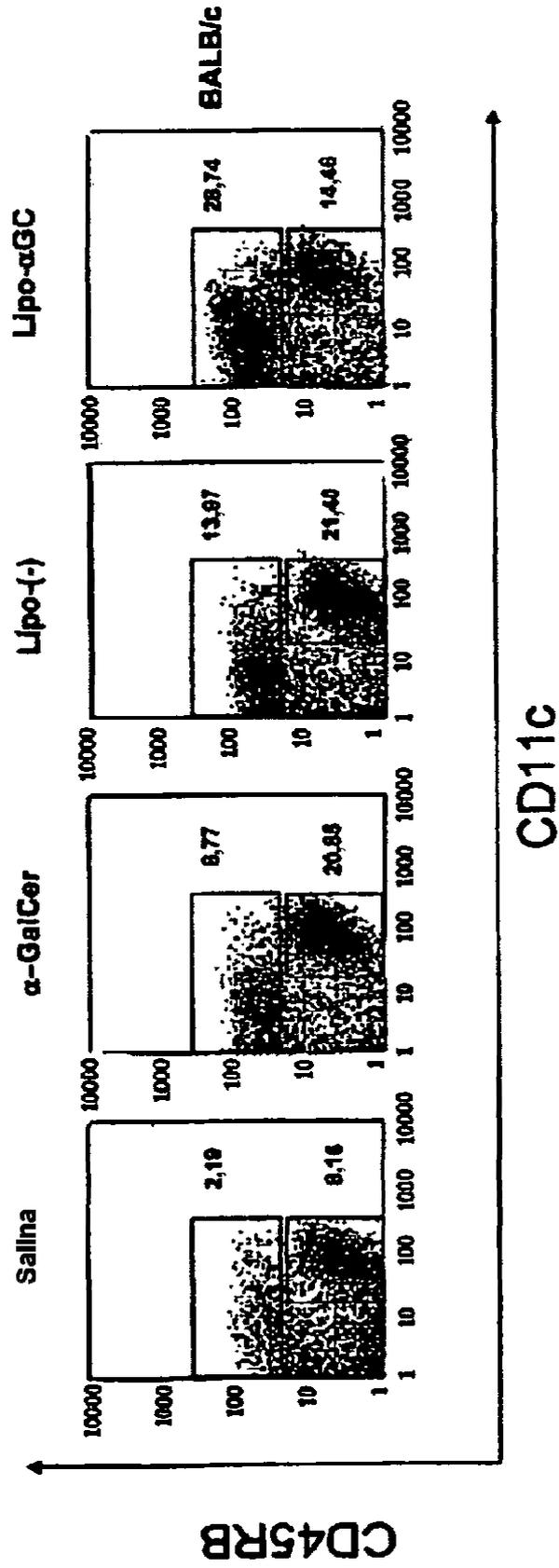


FIG. 12

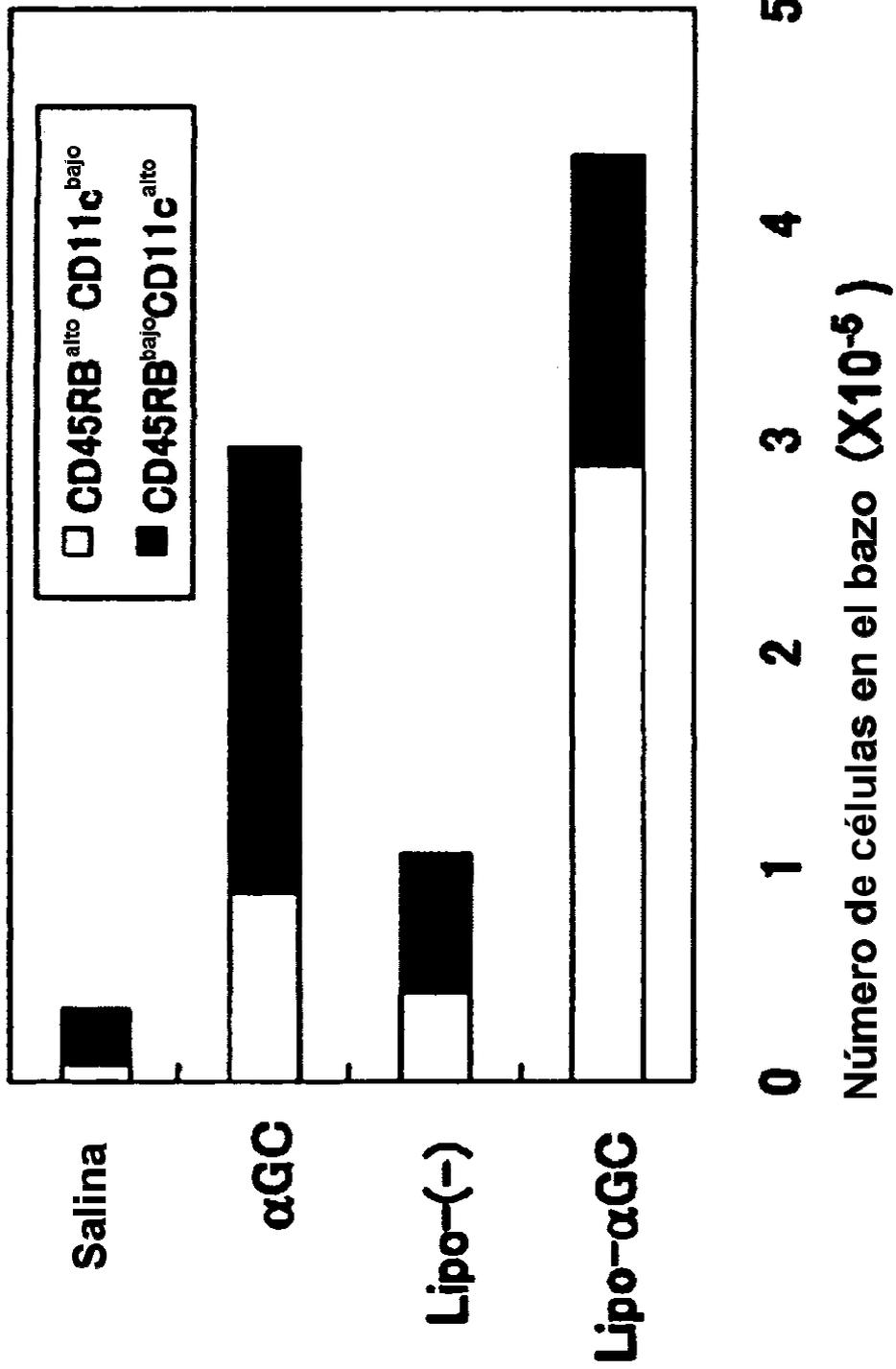


FIG. 13

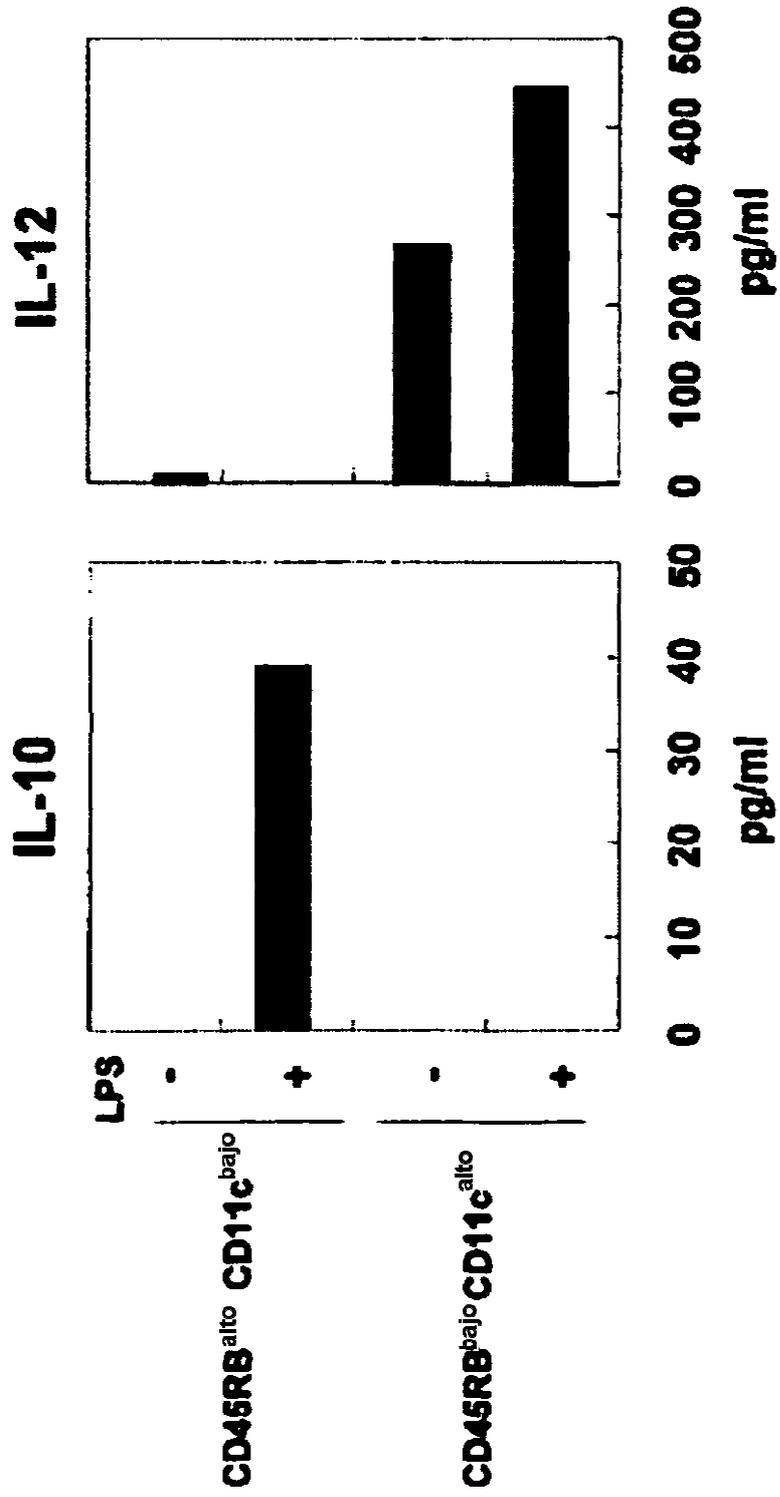


FIG. 14

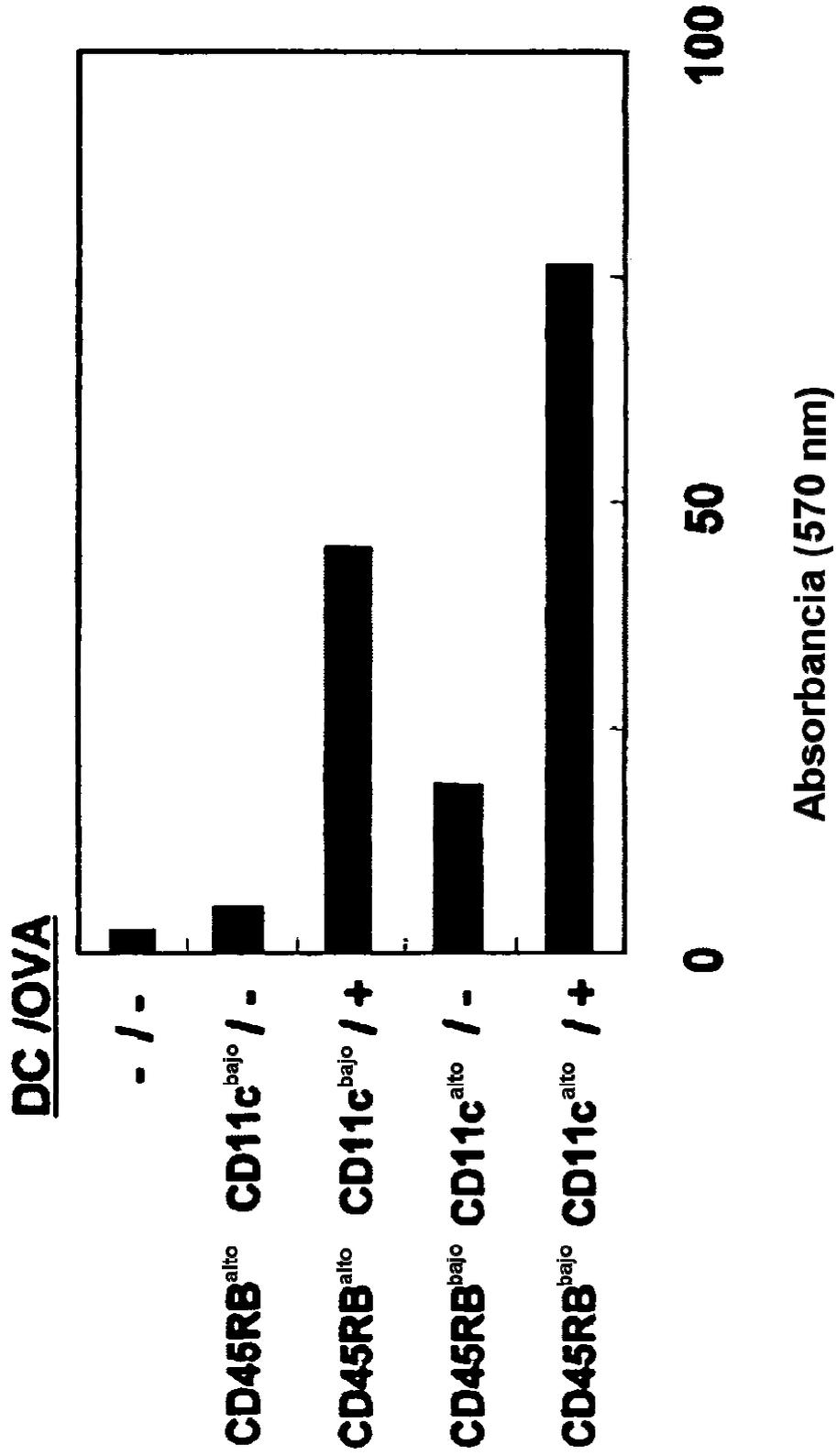


FIG. 15

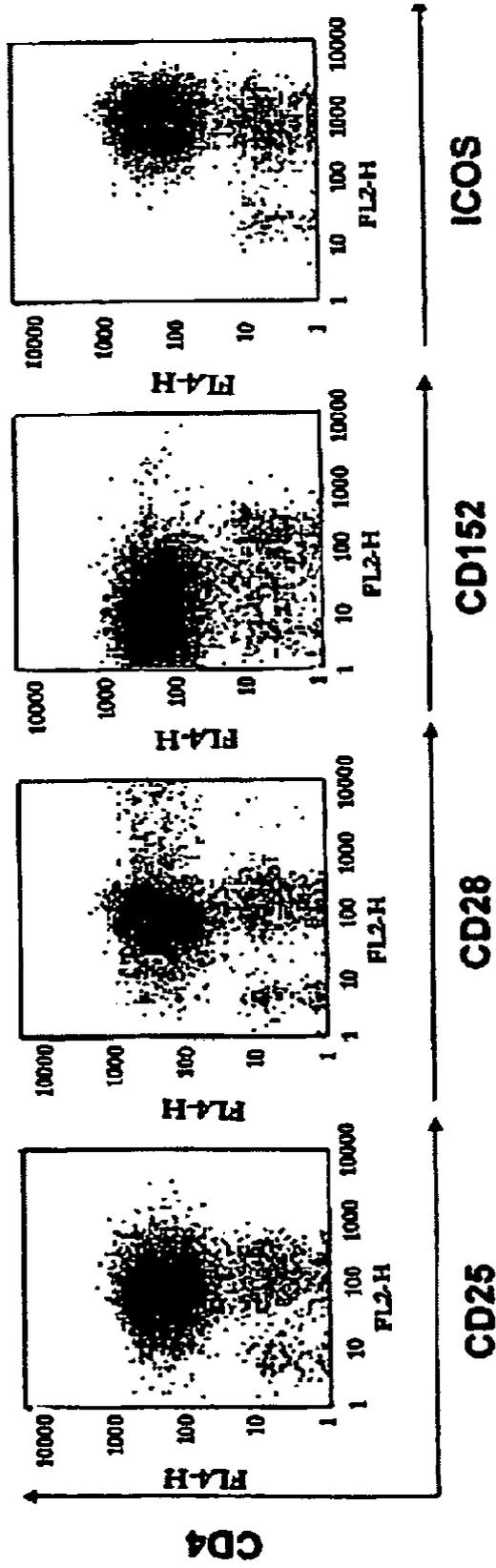


FIG. 16

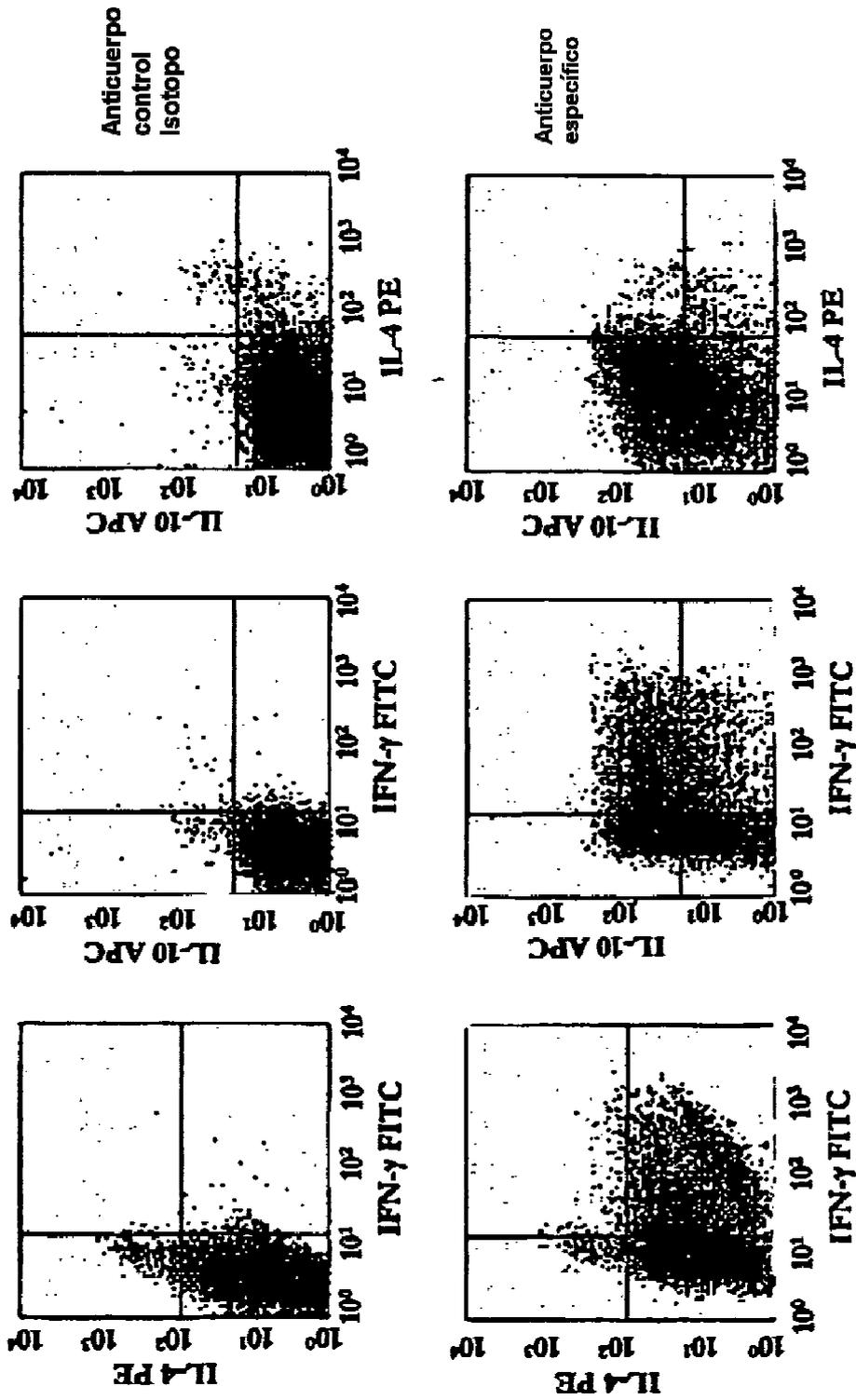


FIG. 17

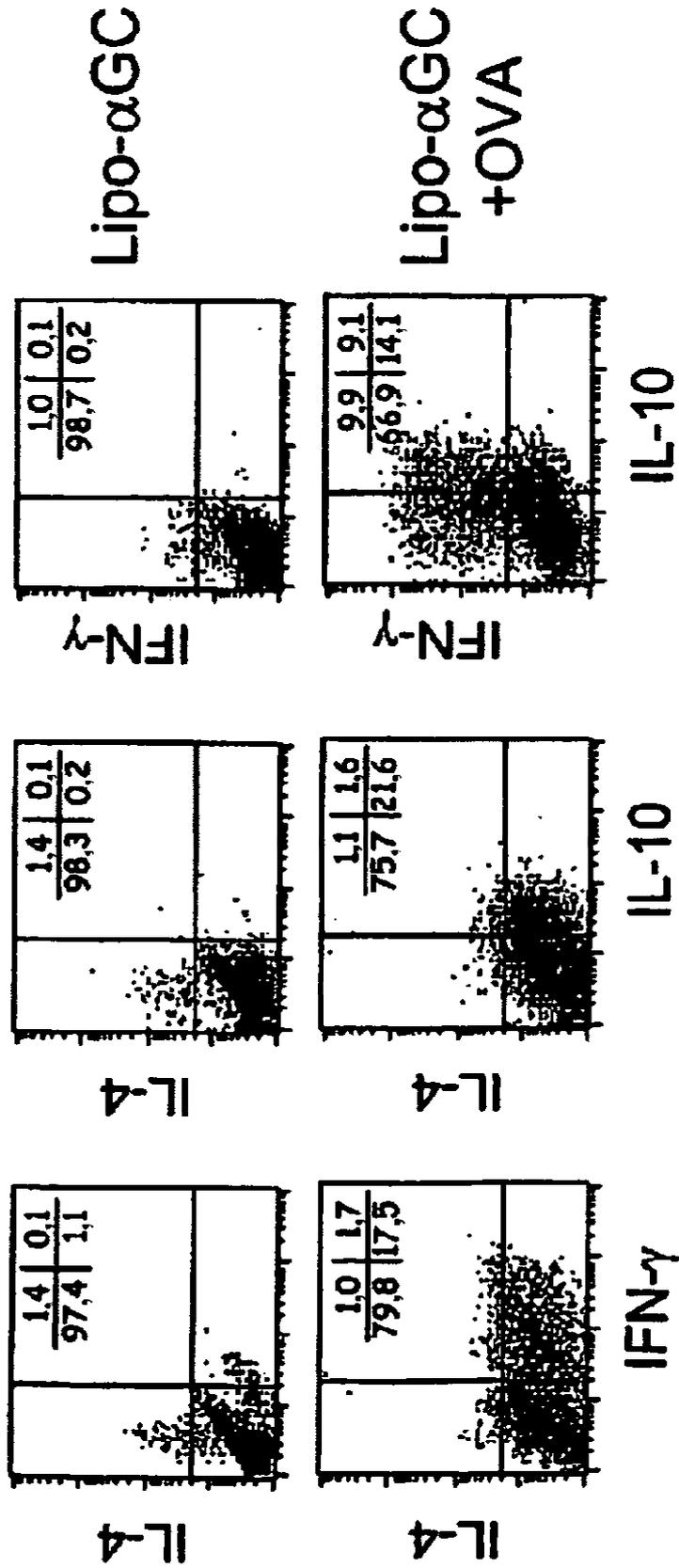


FIG. 18

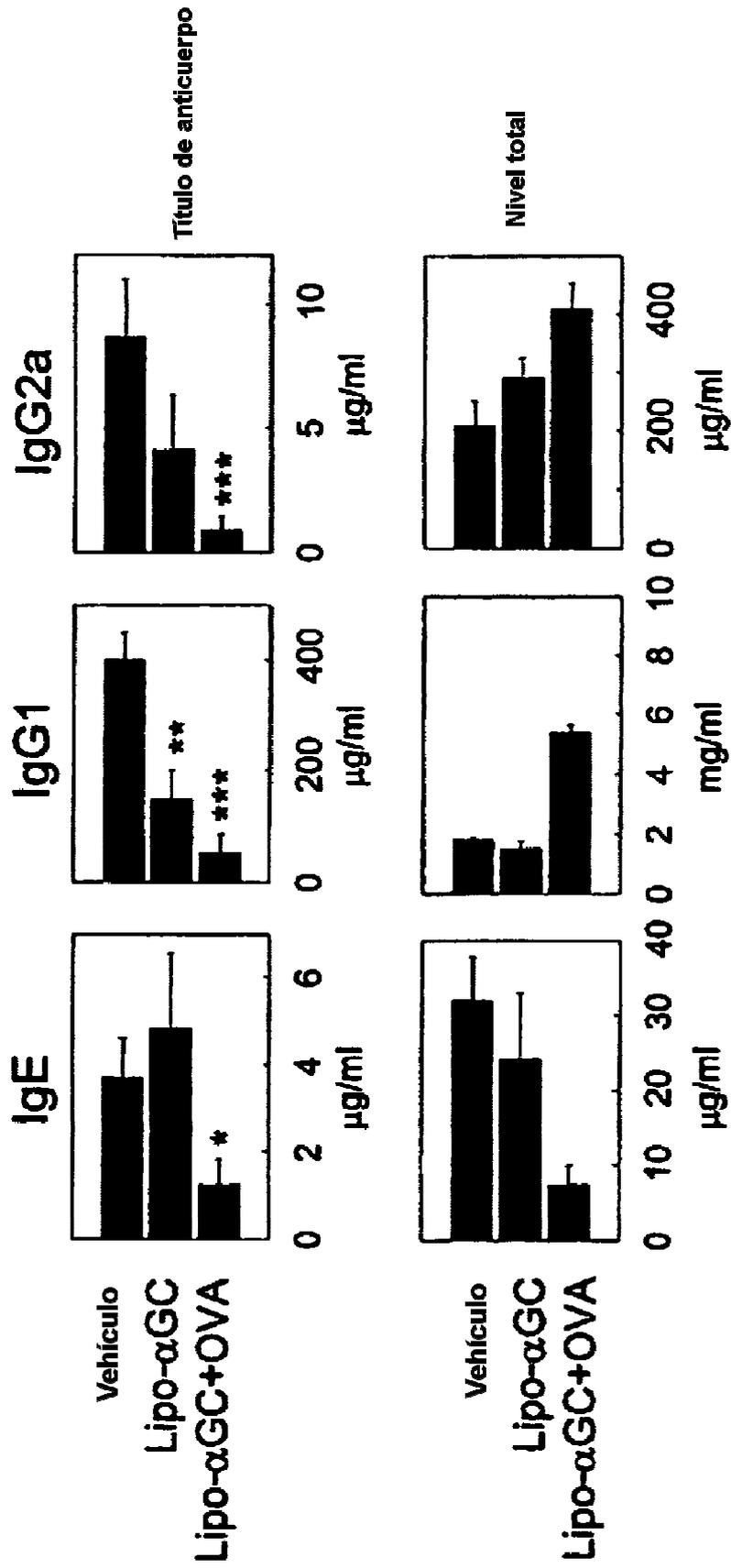


FIG. 19