

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 247**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2015 PCT/EP2015/050747**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107140**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2015 E 15700478 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 3094345**

54 Título: **Inmunoterapia basada en liposomas**

30 Prioridad:

17.01.2014 EP 14151629

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2018

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN
CIÈNCIES DE LA SALUT GERMANS TRIAS I
PUJOL (33.3%)**

**Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles
08916 Badalona, Barcelona, ES;**

**FUNDACIÓ INSTITUT CATALÀ DE NANOCIÈNCIA
I NANOTECNOLOGIA (33.3%) y
INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
AVANÇATS (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MASPOCH COMAMALA, DANIEL;
CANO SARABIA, ANTONIA MARÍA;
VIVES PI, MARTA;
PUJOL AUTONELL, IRMA y
VERDAGUER AUTONELL, JUAN**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 672 247 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

Inmunoterapia basada en liposomas

- 5 La presente invención se refiere al campo de la medicina. En particular, la presente invención proporciona liposomas que encapsulan autoantígenos para la prevención o el tratamiento de trastornos autoinmunitarios.

ANTECEDENTES DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 La autoinmunidad es el fallo de un organismo al reconocer sus propias partes constituyentes como propias, lo que conduce por lo tanto a una respuesta inmune contra sus propias células y tejidos. Cualquier enfermedad que resulte de una respuesta inmune aberrante se denomina enfermedad autoinmune. Ejemplos importantes incluyen diabetes de tipo 1 (T1D), lupus eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, dermatomiositis, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, anemia perniciosa, artritis reactiva, síndrome de Sjogren.

- 15 Se calcula que del 7 al 10 % de la población en países desarrollados de la población padece estas enfermedades, que son con frecuencia crónicas, debilitantes y potencialmente mortales. Los costes de los cuidados médicos asociados con la autoinmunidad continúan aumentando a medida que los trastornos autoinmunes aumentan en todo el mundo y no están disponibles tratamientos eficaces.

- 20 Los tratamientos para las enfermedades autoinmunes han sido tradicionalmente inmunosupresores, antiinflamatorios (esteroideos) o paliativos. Terapias no inmunológicas, tales como sustitución hormonal en la tiroiditis de Hashimoto o diabetes mellitus de tipo 1, tratan resultados de la respuesta autoagresiva, por tanto, estos tratamientos son paliativos. La modificación de la dieta limita la gravedad de la enfermedad celíaca. El tratamiento esteroideo o con NSAID limita los síntomas inflamatorios de muchas enfermedades.

- 25 Se ha realizado una investigación exhaustiva en el desarrollo de terapias inmunomoduladoras que reduzcan o eviten la respuesta inmune no deseada. Sin embargo, el conocimiento limitado de los detalles intrincados de las diferentes enfermedades autoinmunes ralentiza sustancialmente el progreso en este campo. Las estrategias actuales se basan en general en fármacos inmunosupresores de acción amplia que, para mantener la inmunosupresión, son en general tratamientos de larga duración. Adicionalmente, el uso de inmunosupresores de amplia acción se asocia con un riesgo de efectos secundarios graves, tales como tumores, infecciones, nefrotoxicidad y trastornos metabólicos.

- 30 A pesar de los esfuerzos realizados hasta la fecha, aún existe la necesidad de otras aproximaciones terapéuticas para tratar trastornos autoinmunes que sean eficaces y carezcan de efectos secundarios indeseados.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 35 Los inventores han desarrollado una nueva terapia específica de autoantígeno que es altamente eficaz en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. En particular, los inventores han descubierto que una enfermedad autoinmune puede tratarse eficazmente encapsulando el autoantígeno o los autoantígenos asociados con la enfermedad autoinmune que se pretende tratar en un liposoma con un tamaño específico y que comprende el lípido fosfatidilserina.

- 40 En un primer aspecto, la presente invención se refiere por lo tanto a un liposoma que encapsula un autoantígeno, en el que (i) el liposoma tiene un tamaño comprendido entre 500 y 15000 nm; y (ii) la membrana del liposoma comprende fosfatidilserina (PS) en una cantidad comprendida entre 10 y 40 % en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana.

- 45 Los presentes inventores han descubierto que las características particulares del liposoma de la invención, es decir un tamaño comprendido entre 500 y 15.000 nm y la presencia del 10 al 40 % de PS, permiten la presentación tolerogénica del autoantígeno encapsulado por células presentadoras de antígeno, restaurando de este modo la tolerancia al autoantígeno.

- 50 Sin desear quedar ligado a la teoría, los inventores plantean la hipótesis de que las características específicas de los presentes liposomas aseguran que sean engullidas eficazmente por las células dendríticas y que el autoantígeno encapsulado se procese y se presente a los linfocitos T CD4+ mediante moléculas del MHC de clase II (presentación exógena) y a linfocitos T CD8+ (presentación cruzada) en formas tolerogénicas, induciendo por lo tanto tolerancia al antígeno y deteniendo la cascada autoinmune. Dicho de otro modo, el liposoma de la presente invención que encapsula autoantígeno induce tolerancia al autoantígeno en lugar de autoinmunidad, lo que da como resultado el tratamiento eficaz del trastorno autoinmune.

El efecto tolerogénico del liposoma de la presente invención que encapsula autoantígeno y su sorprendente efecto en el tratamiento del trastorno autoinmune, particularmente, en el tratamiento de T1D y EM, se demuestran en los ejemplos posteriores.

5 Como se muestra en las FIG.s 2, 3 y 4, liposomas con PS que encapsulan péptidos de insulina liposomas con PS son capturados por células dendríticas, de modo que estas células dendríticas adquieren características tolerogénicas: expresión reducida de moléculas coestimulantes, producción inducida de PGE2 y proliferación reducida de linfocitos T en el contexto de diabetes. Los resultados indican que los liposomas, en cierto grado, promueven la tolerogenicidad de células dendríticas (DCs) similar a los cuerpos apoptóticos. Además, el efecto no se redujo después de un estímulo proinflamatorio, una característica importante a tener en cuenta porque demuestra que la terapia es eficaz una vez que la cascada autoinmune se ha iniciado y están presentes estímulos proestimulantes.

15 Todo lo anterior da como resultado un tratamiento eficaz de la enfermedad autoinmune, como se muestra en los ejemplos posteriores. Las FIG.s 5 y 6 demuestran que el tratamiento de ratones prediabéticos NOD se consigue con una única administración de los liposomas de la invención, mientras que la FIG. 8, A, muestra que los liposomas con PS cargados con péptidos de insulina pueden invertir la diabetes en ratones NOD cuando se administran después de la aparición de la enfermedad. Además, la FIG. 9 muestra que los liposomas con PS que contienen péptido de glucoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG) pueden evitar el desarrollo de la enfermedad encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) en ratones inmunizados C57BL/6. Por lo tanto, a diferencia de los tratamientos inmunomoduladores o antiinflamatorios conocidos para trastornos autoinmunes, la terapia basada en liposomas desarrollada por los inventores no se requiere de manera permanente. En su lugar, se consigue una restauración de la tolerancia de larga duración, que da como resultado la prevención o el tratamiento eficaz de la enfermedad autoinmune. Este efecto puede conseguirse después de una única administración o, alternativamente, en 2-4 administraciones de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de liposomas que encapsulan autoantígenos.

También puede observarse en las FIG.s 5, 6 y 8, B, que no se obtuvo ningún efecto en la incidencia de T1D cuando los ratones recibieron liposomas vacíos. Por lo tanto el tratamiento solamente es eficaz cuando los liposomas encapsulan un autoantígeno apropiado, lo cual demuestra la especificidad del antígeno de la nanoterapia.

Aunque es una terapia basada en la especificidad de antígeno, el liposoma de la presente invención que encapsula autoantígeno tiene la ventaja de no presentar efectos secundarios no deseados. Como se ha mencionado anteriormente, otros enfoques inmunomoduladores para el tratamiento de enfermedades autoinmunes implican inmunosupresores, lo que conduce con frecuencia a alta susceptibilidad a infecciones y en ocasiones también promueve el desarrollo de tumores, nefrotoxicidad o trastornos metabólicos.

Además de proporcionar una presentación tolerogénica, la encapsulación de los autoantígenos en los liposomas de la invención diseñados específicamente es un objetivo altamente deseable debido a la protección de la carga de la degradación y la reducción/ausencia de toxicidad. Esto se debe al hecho de que el autoantígeno está confinado en el liposoma hasta su captación por las células presentadoras de antígeno y, en consecuencia, puede no inducir una respuesta inmune adversa.

Un segundo aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica o veterinaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un liposoma que encapsula autoantígeno como se ha definido anteriormente junto con otros portadoreportadores o excipientes apropiados aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

La composición farmacéutica basada en liposomas de la invención tiene varias ventajas con respecto a estabilidad, uniformidad y facilidad de producción a gran escala.

En primer lugar, la producción de los presentes liposomas que encapsulan autoantígeno puede conseguirse usando reactivos y equipamiento comunes en la industria farmacéutica a bajo coste.

55 Los liposomas de la invención, debido a su tamaño, son altamente estables en solución y fáciles de obtener, a diferencia de liposomas más pequeños, que tienden a agregarse y su producción requiere procesos de extrusión repetidos a través de membranas caras con tamaños de poro pequeños.

Además, la uniformidad del producto puede garantizarse, al mismo tiempo que el aumento de escala para producción industrial grande es asequible.

Otra gran ventaja está en el hecho de que la presente composición farmacéutica basada en liposomas es una composición definida, que carece de contaminantes o productos secundarios indeseados. Los liposomas que

encapsulan autoantígenos no se degradan en productos secundarios tóxicos, tales como cuerpos necróticos, y no provocan rechazos como sucede con terapias basadas en células autólogas o heterólogas.

- 5 Gracias a su efecto tolerogénico, el liposoma de la presente invención que encapsula autoantígeno proporciona una prevención eficaz de trastornos autoinmunes (es decir que evita que se desencadene la autoinmunidad), así como un tratamiento eficaz de la enfermedad autoinmune tanto en un estadio preclínico (es decir un estadio en el que la autoinmunidad ya se ha desencadenado pero el daño tisular y los síntomas clínicos son bajos) como en un estadio clínico (es decir un estadio en el que el daño tisular es mayor y los síntomas clínicos son evidentes).
- 10 Por lo tanto, en un tercer aspecto la presente invención proporciona un liposoma que encapsula autoantígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención para uso como medicamento. Este aspecto puede formularse también como un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad que comprende administrar a un mamífero que necesite dicho tratamiento, incluyendo un ser humano, una cantidad terapéuticamente eficaz del liposoma de la presente invención que encapsula autoantígeno, junto con uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente
- 15 aceptables apropiados.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un liposoma que encapsula autoantígeno como se ha definido anteriormente para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmune. Este aspecto puede formularse como el uso de un liposoma que encapsula autoantígeno como se ha definido anteriormente para

20 la fabricación de un medicamento destinado a la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmune. Este aspecto también puede formularse como un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmune que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un liposoma que encapsula autoantígeno como se ha definido anteriormente, junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables, en un sujeto que lo necesite, incluyendo un ser humano.

25 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un liposoma que encapsula autoantígeno como se ha definido anteriormente para su uso en la restauración de autotolerancia en un paciente que padece una enfermedad autoinmune. Este aspecto puede formularse como el uso de un liposoma que encapsula autoantígeno como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado a la restauración de autotolerancia en un

30 paciente que padece una enfermedad autoinmune. Este aspecto también puede formularse como un método para la restauración de autotolerancia en un paciente que padece una enfermedad autoinmune que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un liposoma que encapsula autoantígeno como se ha definido anteriormente, junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables, en un sujeto que lo necesite, incluyendo un ser humano.

35 Finalmente, otros aspectos de la invención proporcionan un liposoma o una composición farmacéutica o veterinaria como se han definido anteriormente para suprimir una respuesta autoinmune; y un liposoma o una composición farmacéutica o veterinaria como se han definido anteriormente para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmune, en el que dicho liposoma o composición farmacéutica o veterinaria restaura la tolerancia al

40 autoantígeno encapsulado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión criogénica (microscopio cryo-TEM, JEOL-JEM 1400) de

45 liposoma con PS cargado con autoantígeno derivado de insulina. Barra= 0,2 μm .

FIG. 2. Análisis de citometría de flujo (FACS) de DCs de control (A), DCs cocultivadas durante 30 minutos con liposomas con PS marcados con Oregon green 488 DHPE (OG488 PS-lipo) a 4 °C (B) y a 37 °C (C). Las

50 coordenadas x representan OG488 PS-lipo; las coordenadas y representan DCs teñidas con CD11c -PECy7.

FIG. 3. Efectos de la captura de liposomas con PS en CD. Las coordenadas y representan (A) viabilidad de DCs (%) evaluada por tinción con anexina V y 7aad, (B) mediana de la intensidad de fluorescencia por la expresión en membrana de CD40 y CD86 y (C) cuantificación de la producción de prostaglandina E2 (PGE2) por ELISA en sobrenadantes de cultivo para DCs inmaduras y maduras. Los símbolos blancos representan DCs inmaduras, antes

55 (triángulos) y después de la captura de liposomas con PS (cuadrados) o liposomas con PS cargados con péptidos de insulina (círculos), 24 horas después del cultivo. Los símbolos negros representan la viabilidad de DCs maduras antes (triángulos) y después de la captura de liposomas con PS (cuadrados) o liposomas con PS cargados con péptidos de insulina (círculos), 24 horas después del estímulo proinflamatorio (lipopolisacárido, LPS). Los datos de ELISA se representan como pg/106 células.

60 FIG. 4. Capacidad alterada de las DCs para estimular la proliferación de linfocitos T autólogos después de la captura de liposomas con PS, incluso después de estímulos proinflamatorios. La coordenada y representa la proliferación autóloga de células T (c.p.m. durante 3 h de ensayo de timidina) después de la estimulación inducida por DCs

inmaduras, antes (triángulos blancos) y después de la captura de liposomas con PS (cuadrados blancos) o liposomas con PS cargados con péptidos de insulina (20 µg/ml) a una relación de 1:10 (círculos blancos) durante 7 días. Los símbolos negros representan la proliferación inducida por DCs maduras antes (triángulos negros) y después de la captura de liposomas con PS (cuadrados negros) o liposomas con PS cargados con péptidos de insulina (círculos negros), previamente activados con estímulos proinflamatorios LPS (100 ng/ml).

FIG. 5. Inmunoterapia usando péptidos de insulina encapsulados en liposomas con PS reduce la incidencia de T1D. (A) la coordenada y representa la incidencia acumulada (porcentaje) de diabetes en ratones NOD tratados con liposomas con PS cargados con péptidos de insulina (círculos, n= 12), liposomas con PS vacíos (cuadrados, n= 18) y en el grupo control que recibió solución salina (triángulos, n= 16). (B) la coordenada y representa el seguimiento del peso corporal (g) en ratones tratados con liposomas con PS cargados con péptidos de insulina (círculos, n= 12 – 6), liposomas con PS vacíos (cuadrados, n= 18 – 3) y grupo de control tratado con solución salina (triángulos, n=16 – 3). Las coordenadas x indican la edad de los ratones en semanas.

FIG. 6. La puntuación de insulinitis es menos grave en ratones inmunizados. Efecto de liposomas con PS en insulinitis en ratones NOD. Las coordenadas y representan (A) puntuación de insulinitis para diferentes grupos de ratones NOD y (B) porcentaje de islotes clasificados en cada una de las cinco categorías de infiltración en diferentes grupos de ratones NOD. Categorías de infiltración: 0, sin insulinitis; 1, periinsular; 2, insulinitis leve (<25 % del islote infiltrado); 3, 25-75 % del islote infiltrado; 4, infiltración total de islote. Los grupos de ratones NOD son: ratones de control tratados con solución salina (S), ratones tratados con liposomas con PS vacíos (PS) y ratones tratados con liposomas con PS que contienen autoantígenos (PSAB). Se analizaron páncreas de 4-6 ratones no diabéticos/grupo al final del periodo de estudio (30 semanas). Los resultados son las medias ± ETM. *Diferencias significativas (p<0,05) frente a grupos de control (ensayo de t para muestras no relacionadas).

FIG. 7. Seguimiento de liposomas con PS. Histograma de señal fluorescente (RFU, Unidades de Fluorescencia Relativas/ g de tejido) en varios órganos de ratones NOD a los que se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) liposomas con PS marcados con fluorescencia (Alexa Fluor 750) a las 24 horas. PAT, tejido adiposo perigonadal; K, riñón; S, bazo; P, páncreas; PLN, ganglios linfáticos pancreáticos; MLN, ganglios linfáticos mesentéricos; L, hígado; MDLN, ganglios linfáticos mediastinales; T, timo. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes. La coordenada y indica RFU/g de tejido.

FIG. 8. Niveles de glucemia en ratones diabéticos tratados con liposomas con PS cargados con péptidos de insulina (A) o liposomas vacíos (B) los días 1, 5 y 8 después de la aparición de la enfermedad (día 0). La coordenada y indica la glucemia en sangre (mg/dl). La zona gris indica intervalo glucémico de valor de diagnóstico. La coordenada x indica tiempo expresado en días desde el inicio de la enfermedad. Los círculos indican días sin administración de insulina.

FIG. 9. Puntuación clínica de EAE realizada diariamente para ratones inmunizados C57BL/6 tratados con liposomas que contienen el péptido MOG (círculos blancos) o liposomas vacíos (triángulos blancos). La coordenada y indica puntuación clínica media. La coordenada x indica el tiempo expresado en días después de la inmunización.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto la invención proporciona liposomas que encapsulan autoantígenos.

El término "liposoma" debe entenderse como una estructura de autoensamblaje que comprende una o más membranas comprendidas por bicapas lipídicas, cada una de las cuales comprende dos monocapas que contienen moléculas lipídicas anfipáticas orientadas de forma opuesta. Los lípidos anfipáticos comprenden una región cabeza de grupo polar (hidrófilo) unida covalentemente a una o dos cadenas de acilo no polares (hidrófobas). Los contactos energéticamente desfavorables entre las cadenas de acilo hidrófobas y el medio acuoso circundante inducen que las moléculas lipídicas anfipáticas se dispongan de modo que sus grupos de la cabeza polar se orienten hacia la superficie de la bicapa, mientras que las cadenas de acilo se reorientan hacia el interior de la bicapa. Se forma de este modo una estructura energéticamente estable en la que las cadenas de acilo se protegen eficazmente del contacto con el ambiente acuoso.

Los liposomas pueden tener una membrana con una bicapa (vesículas unilamelares pequeñas "SUV" y vesículas unilamelares grandes "LUV"), o membrana con múltiples bicapas (vesículas grandes multilamelares "MLV"). Los liposomas también pueden prepararse como vesículas multivesiculares "MVV", que son liposomas que incluyen, o encapsulan, múltiples cámaras acuosas no concéntricas. Por el contrario, las MLV tienen múltiples membranas de tipo "piel de cebolla" concéntricas, cada una de las cuales encapsulando un compartimento acuoso. Dada esta encapsulación de volumen acuoso dentro de una barrera protectora de moléculas lipídicas, los liposomas son capaces de secuestrar moléculas encapsuladas, por ejemplo, péptidos, lejos de los efectos degradantes de factores, por ejemplo, enzimas peptidasa, presentes en el ambiente externo.

El tamaño de los liposomas de la invención está comprendido entre 500 y 15.000 nm, un tamaño que refuerza su captación por células presentadoras de antígeno. Adicionalmente, los liposomas de la presente invención tienen preferentemente morfología MVV, como se muestra en la FIG. 1. Estos liposomas MVV grandes tienen una eficacia de carga significativamente mayor en comparación con MLV o SUV convencionales, y también favorecen que el agente activo encapsulado, en este caso el autoantígeno, se disuelva preferentemente en los compartimentos acuosos (en lugar de precipitarse o anclarse a las membranas). Todo esto tiene ventajas con respecto a la biodisponibilidad del autoantígeno dentro de la célula presentadora de antígeno, que da como resultado una actividad inmunomoduladora mayor.

10

En una realización el liposoma de la invención tiene un tamaño comprendido de 500 a 12000 nm. En otra realización, el tamaño del liposoma está comprendido de 500 a 10000 nm. En otra realización, el tamaño del liposoma está comprendido entre 600 y 8000 nm, más particularmente entre 700 y 7000 nm, o entre 800 y 5000 nm, o entre 900 y 3000 nm, o entre 900 y 2000 nm, o entre 900 y 1500 nm, o entre 1000 y 1400 nm. En una realización particular el liposoma tiene un tamaño comprendido entre 1000 y 1300 nm, por ejemplo 1000 nm, 1050 nm, 1100 nm, 1150 nm o 1200 nm.

15

En una realización el liposoma de la invención tiene morfología MVV y un tamaño comprendido entre 500 y 12000 nm. En otra realización, el liposoma de la invención tiene morfología MVV y tiene un tamaño comprendido entre 500 y 10000 nm. En otra realización, el liposoma de la invención tiene morfología MVV y tiene un tamaño comprendido entre 600 y 8000 nm, más particularmente entre 700 y 7000 nm, o entre 800 y 5000 nm, o entre 900 y 3000 nm, o entre 900 y 2000 nm, o entre 900 y 1500 nm, o entre 1000 y 1400 nm. En una realización particular el liposoma tiene morfología MVV y un tamaño comprendido entre 1000 y 1300 nm, por ejemplo 1000 nm, 1050 nm, 1100 nm, 1150 nm o 1200 nm.

20

25

La membrana del liposoma puede incluir, sin limitación, fosfolípidos tales como fosfatidilcolina ("PC"), fosfatidilserina ("PS"), fosfatidiletanolamina ("PE"), fosfatidilglicerol ("PG"), fosfatidilinositol ("PI") y ácido fosfatídico ("PA"). Otros lípidos que pueden constituir la membrana de la nanopartícula incluyen, pero no se limitan a, colesterol ("CHOL") y colesterol-PEG, y fosfatidilcolinas marcadas con fluorescencia. La membrana del liposoma puede contener moléculas adicionales de naturaleza no lipídica, tales como proteínas, carbohidratos, anticuerpos o cadenas de polietilenglicol (PEG). Los liposomas pueden incluir porciones particulares que se diseñan para dirigir el liposoma a un sitio específico o célula diana, o proteger el liposoma contra un ambiente hostil (por ejemplo el tracto gastrointestinal). La composición del liposoma es relevante para el suministro tolerogénico del autoantígeno. Así, como se ha mencionado anteriormente, la membrana del liposoma comprende PS en una cantidad comprendida entre 10 y 40 % en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana. La PS contenida en la membrana liposómica constituye una señal "cómeme" que conecta el reconocimiento de PS por células presentadoras de antígeno con las consecuencias en la inducción de tolerancia. Es destacable que el liposoma de la invención no requiera que se capturen eficazmente receptores o ligandos adicionales para que sean engullidas por DCs y conseguir un suministro tolerogénico del autoantígeno. Sin embargo, otros receptores y/o ligandos pueden ensamblarse en el liposoma para mejorar la captación y/o el procesamiento tolerogénico.

30

35

40

La expresión "porcentaje (%) en peso" se refiere al porcentaje de cada componente de la membrana liposómica en relación con el peso total de la composición liposómica de la membrana.

45

Por "composición liposómica de la membrana" se hace referencia a la totalidad de bicapas de membrana contenidas en el liposoma, por ejemplo, cuando es un liposoma MVV que comprende más de una bicapa de membrana (como se muestra en la FIG. 1). Se entiende lo mismo cuando se usa la expresión "membrana de liposoma" o "membrana liposómica", ambas refiriéndose a la totalidad de bicapas de membrana contenidas en el liposoma de la invención (y no solamente la membrana externa).

50

En una realización la membrana del liposoma comprende PS en una cantidad comprendida entre 15 y 37 % en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana. En realizaciones adicionales, la PS de membrana está comprendida entre 20 y 35 %, o entre 22 y 35 %, o entre 22 y 33 %, o entre 25 y 32 %, o entre 26 y 31 %, o entre 27 y 30 % en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana, por ejemplo 27 %, 28 %, 29 % o 30 %. Preferentemente, la PS de membrana está en un 30 % en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana.

55

El liposoma de acuerdo con la presente invención puede comprender, además de PS, concentraciones variables de otros lípidos. En algunas realizaciones, la membrana liposómica también comprende PC. En algunas realizaciones, la membrana liposómica también comprende CHOL. En realizaciones particulares la membrana liposómica también comprende PC y CHOL.

60

En una realización la membrana de liposomas comprende PC en una cantidad comprendida entre el 10 y el 40 % en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana . En otra realización la membrana de liposoma comprende PC en una cantidad comprendida entre el 12 y el 40 % en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana . En realizaciones adicionales, la PS de membrana está comprendida entre el 15 y el 5 37 %, o entre el 20 y el 35 %, o entre el 22 y el 33 %, o entre el 25 y el 32 %, o entre el 26 y el 31 %, o entre el 27 y el 30% en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana , por ejemplo 27 %, 28 %, 29 % o 30 %.

La cantidad de CHOL puede estar comprendida entre el 13 y el 53 % en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana . En una realización, la membrana del liposoma comprende CHOL en una cantidad comprendida entre el 20 y el 50 % en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana . En realizaciones adicionales, CHOL de membrana está comprendido preferentemente entre el 27 y el 46 %, o entre el 30 y el 44 %, o entre el 33 y el 42 %, o entre el 36 y el 40 % en peso con respecto a la composición liposómica total de membrana , por ejemplo 36 %, 37 %, 38 %, 39 % o 40 %.

La proporción de los diferentes lípidos contenidos en la membrana del liposoma debe equilibrarse para obtener un liposoma con propiedades físicas y químicas apropiadas con respecto a estabilidad, permeabilidad y morfología. En general, la membrana liposómica puede comprender PS, PC y CHOL en una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre el 0,6:0,6:0,7 y 1,5:1,5:1,8. El término "relación" se entiende en el sentido habitual como la magnitud de cantidades relativas entre sí. Específicamente, la relación de dos cantidades indica cuántas veces la primera cantidad (X) está contenida en la segunda cantidad (Y), y se expresa como X:Y. La expresión "relación molar" se usa cuando la magnitud referida es la molaridad. Como alternativa, la relación puede expresarse como "relación en peso" cuando la magnitud referida es peso. Aquí, se proporcionan intervalos de relaciones molares para los tres lípidos particulares (PS, PC y CHOL). En una realización, la membrana comprende una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,7:0,7:0,8 y -1,4:1,4:1,6. En otra realización, la membrana comprende una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,8:0,8:0,9 y 1,2:1,2:1,5. En otra realización, la membrana comprende una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,9:0,9:1 y 1,1:1,1:1,4. En una realización preferida, la membrana comprende una relación molar PS:PC:CHOL que es aproximadamente 1:1:1,33.

Como se ha mencionado anteriormente, el liposoma de la invención encapsula un autoantígeno. El término "autoantígeno" se refiere a una proteína o complejo de proteínas normal que es reconocido por el sistema inmune de pacientes que padecen una enfermedad autoinmune específica. Estos antígenos no deberían, en condiciones normales, ser la diana del sistema inmunitario, pero, debido principalmente a factores genéticos y ambientales, la tolerancia inmunológica normal se ha perdido en estos pacientes para dicho antígeno. En ciertas realizaciones, el liposoma encapsula autoantígenos adicionales asociados con la misma enfermedad autoinmune. Por ejemplo, el liposoma puede encapsular dos, tres, cuatro o cinco autoantígenos, preferentemente asociados con T1D.

En algunas realizaciones, la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 50:1 y 2:1. En otra realización, la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 30:1 y 3:1. En otra realización más, la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 20:1 y 3:1. En otra realización más, la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 15:1 y 3:1. En otra realización más, la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 12:1 y 3:1. En otra realización, la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos se selecciona del grupo que consiste en: 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1 y 4:1.

En una realización, el liposoma tiene un tamaño comprendido entre 500 y 10000 nm, la membrana del liposoma comprende del 20 al 35 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,7:0,7:0,8 y 1,4:1,4:1,6, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 50:1 y 3:1.

En una realización, el liposoma tiene un tamaño comprendido entre 700 y 7000 nm, la membrana del liposoma comprende del 22 al 33 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,8:0,8:0,9 y 1,2:1,2:1,5, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 20:1 y 3:1.

En otra realización, el liposoma tiene un tamaño comprendido entre 800 y 5000 nm, la membrana del liposoma comprende del 25 al 32 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CH que está comprendida entre 0,9:0,9:1 y

1,1:1,1:1,4, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 15:1 y 3:1.

- En otra realización, el liposoma tiene un tamaño comprendido entre 900 y 3000 nm, la membrana del liposoma comprende el 30 % en peso de PS, 30 % en peso de PS y 40 % en peso de CH, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 12:1 y 3:1, preferentemente, la relación en peso se selecciona del grupo que consiste en: 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1 y 4:1.
- 10 En otra realización, el liposoma tiene morfología MVV y un tamaño comprendido entre 800 y 5000 nm, la membrana del liposoma comprende del 25 al 32 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CH que está comprendida entre 0,9:0,9:1 y 1,1:1,1:1,4, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 15:1 y 3:1. En otra realización, el liposoma tiene morfología MVV y un tamaño comprendido entre 900 y 3000 nm, la membrana del liposoma
- 15 comprende el 30 % en peso de PS, el 30 % en peso de PS y el 40 % en peso de CH, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 12:1 y 3:1, preferentemente, la relación en peso se selecciona del grupo que consiste en: 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1 y 4:1. En una realización preferida el liposoma tiene morfología MVV, 1000 nm, la membrana del liposoma comprende el 30 % en peso de PS, el 30 % en peso de PS y el 40 % en peso
- 20 de CH, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 12:1 y 3:1, preferentemente, la relación en peso se selecciona del grupo que consiste en: 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1 y 4:1.

- El autoantígeno o los autoantígenos encapsulados están asociados con una enfermedad autoinmune específica. En ciertas realizaciones, el autoantígeno o los autoantígenos están asociados con una enfermedad autoinmune seleccionada del grupo que consiste en T1D, lupus eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, dermatomiositis, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, anemia perniciosa, artritis reactiva, anemia hemolítica autoinmune, neutropenia autoinmune, enfermedad de Graves, psoriasis, artritis psoriásica y síndrome de Sjogren. En una realización particular el liposoma encapsula un autoantígeno asociado con
- 30 T1D. Autoantígenos no limitantes que se sabe que están asociados con T1D son la insulina, la proinsulina, la proteína tirosina fosfatasa (IA2, también conocida como antígeno de células de islotes 512), el glutamato descarboxilasa (GAD), la cromogranina y la proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa de islotes (IGRP) (Roep BO, Peakman M. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, vol. 2(4):a007781. oi: 10.1101/cshperspect.a007781.). Así, en una realización el liposoma de la invención encapsula un autoantígeno
- 35 seleccionado del grupo que consiste en insulina, proinsulina, IA2, GAD, cromogranina e IGRP.

- Además, en el sentido de la presente invención, no es necesario que el autoantígeno que se encapsula en el liposoma sea la proteína antigénica completa. De hecho, se han aislado y reportado regiones específicas de las proteínas relevantes como particularmente antigénicas. Por lo tanto, en ciertas realizaciones el liposoma encapsula
- 40 un autoantígeno que es un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico asociado con T1D, por ejemplo, péptidos antigénicos derivados de insulina, proinsulina, IA2, GAD, cromogranina e IGRP. Por ejemplo, los péptidos definidos por SEQ ID NO: 1 (21 aa, GIVDQCCTSICSLYQLENYCN) derivado de la cadena A de insulina y SEQ ID NO: 2 (30 aa, FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYPMS) derivado de la cadena B de insulina, se han desvelado como particularmente autoantígenos en T1D. Por lo tanto, en una realización el liposoma encapsula un autoantígeno
- 45 asociado con T1D y deriva de insulina, preferentemente seleccionada de los péptidos con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En una realización particular el liposoma encapsula los péptidos con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

- Otras proteínas o péptidos autoantigénicos que se asocian con enfermedades autoinmunes y pueden encapsularse en los liposomas de la invención son, por ejemplo, péptidos de mielina para esclerosis múltiple, tales como péptidos
- 50 derivados de glucoproteína de mielina de oligodendrocito (MOG), péptidos del receptor de acetilcolina para miastenia grave, transglutaminasa para enfermedad celíaca, tiroglobulina para tiroiditis autoinmune (Lernmark A. J. Clin Invest, 2001, vol. 108, p. 1091-1096). En una realización particular el liposoma de la invención encapsula un autoantígeno que es un péptido antigénico asociado con EM, por ejemplo, péptidos antigénicos derivados de MOG, tales como el péptido definido por SEQ ID NO: 3.

- 55 Los péptidos autoantigénicos contenidos en los liposomas de la invención, ventajosamente, son de un tamaño que permite la presentación directa de dichos antígenos por las moléculas de superficie del complejo mayor de histocompatibilidad. Por "presentación directa" se entiende que no se requiere procesamiento mayor de estos péptidos por parte de la célula presentadora de antígeno antes de presentación en superficie. En algunas
- 60 realizaciones el tamaño de los péptidos autoantigénicos en los liposomas de la invención está comprendido entre 5 y 100 aminoácidos, particularmente entre 5 y 70 aminoácidos, o entre 8 y 50 aminoácidos, o entre 8 y 35 aminoácidos, o entre 8 y 30 aminoácidos. Dichos autoantígenos proporcionan ventajas con respecto a biodisponibilidad, eficacia

de la terapia basada en liposomas y facilidad de procesamiento (encapsulación de dichos péptidos pequeños es más fácil y más barata en comparación con proteínas completas o péptidos mayores).

5 En una realización, el liposoma tiene morfología MVV y un tamaño comprendido entre 700 y 7000 nm, la membrana del liposoma comprende del 22 al 33 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,8:0,8:0,9 y 1,2:1,2:1,5, el liposoma encapsula al menos un autoantígeno que está asociado con T1D, preferentemente un autoantígeno que es un péptido derivado de insulina, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 20:1 y 3:1.

10

En una realización, el liposoma tiene morfología MVV y un tamaño comprendido entre 700 y 7000 nm, la membrana del liposoma comprende del 22 al 33 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,8:0,8:0,9 y 1,2:1,2:1,5, el al menos un autoantígeno es un péptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 20:1 y 3:1.

15

En una realización, el liposoma tiene morfología MVV y un tamaño comprendido entre 800 y 5000 nm, la membrana del liposoma comprende del 25 al 32 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,9:0,9:1 y 1,1:1,1:1,4, el al menos un autoantígeno es un péptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 15:1 y 3:1.

20

En una realización, el liposoma tiene morfología MVV y un tamaño comprendido entre 800 y 5000 nm, la membrana del liposoma comprende del 25 al 32 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,9:0,9:1 y 1,1:1,1:1,4, el al menos un autoantígeno es el péptido con SEQ ID NO: 1, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 15:1 y 3:1.

25

En una realización, el liposoma tiene morfología MVV y un tamaño comprendido entre 800 y 5000 nm, la membrana del liposoma comprende del 25 al 32 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,9:0,9:1 y 1,1:1,1:1,4, el al menos un autoantígeno es el péptido con SEQ ID NO: 2, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 15:1 y 3:1.

30

En una realización, el liposoma tiene morfología MVV y un tamaño comprendido entre 700 y 7000 nm, la membrana del liposoma comprende del 22 al 33 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,8:0,8:0,9 y 1,2:1,2:1,5, el liposoma encapsula al menos un autoantígeno que está asociado con MS, preferentemente un autoantígeno que es un péptido derivado de MOG, tal como el péptido definido por SEQ ID NO: 3, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 20:1 y 3:1.

35

Pueden usarse diversas metodologías bien conocidas por los expertos en la materia para preparar liposomas que encapsulen uno o más péptidos. Por ejemplo, los liposomas de la invención pueden formarse inmovilizando directamente el autoantígeno durante la formación del liposoma por el método de hidratación de película lipídica.

45

En una realización, los liposomas de la invención se preparan por un procedimiento que comprende: (a) preparar una mezcla lipídica en un disolvente apropiado, por ejemplo, cloroformo, (b) retirar el disolvente, por ejemplo, mediante evaporación al vacío, (c) hidratar la mezcla lipídica con un tampón apropiado, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato, que contiene al menos un autoantígeno, (d) opcionalmente retirar el péptido no encapsulado, por ejemplo mediante centrifugación y (e) purificar u homogeneizar los liposomas resultantes, que contienen autoantígenos, por tamaño. Preferentemente, puede usarse la extrusión para homogeneizar liposomas por tamaño, es decir para producir liposomas que tengan un tamaño medio predeterminado haciendo pasar los liposomas, bajo presión, a través de poros de filtro de un tamaño definido, seleccionado. También puede usarse filtración de flujo tangencial para purificar y regularizar el tamaño de los liposomas, es decir, para producir una población de liposomas que tengan menos impurezas, menor heterogeneidad de tamaño y una distribución más homogénea y uniforme de tamaño. Cuando el liposoma encapsula más de un autoantígeno, la etapa de hidratación (c) se realiza en presencia de un tampón que contiene una mezcla de dichos autoantígenos en la proporción deseada. Dicha proporción tiene en cuenta la eficacia de encapsulación particular para cada autoantígeno.

50

En otra realización, la invención se refiere a un liposoma encapsula autoantígeno obtenido por el procedimiento descrito anteriormente.

60

Se pueden usar también otros procedimientos conocidos en el estado de la técnica para obtener los liposomas de la invención que encapsulan autoantígeno. Por ejemplo, algunas realizaciones contemplan obtener en primer lugar los liposomas y después encapsular el autoantígeno. Existen métodos bien conocidos en el estado de la técnica para encapsular un compuesto dentro de un liposoma (véase Maurer N. et al., *Expert Opin Biol Ther*, 2001, vol. 1(6), p. 923-47; Waterhouse D. N. et al., *Methods Enzymol.*, 2005; vol. 391, p. 40-57; Urbán P. et al., *Nanosc. Res. Lett.*, 2011, vol. 6, p. 620).

Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica o veterinaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del liposoma como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, junto con otros excipientes o portadores apropiados aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

Preferentemente, las composiciones de la invención comprenden liposomas de una distribución de tamaño de partículas estrecha, es decir, con baja heterogeneidad de tamaño. En una realización particular, la composición farmacéutica o veterinaria de la invención comprende liposomas que tienen un tamaño comprendido entre 700 y 7000 nm, en los que la membrana del liposoma comprende del 22 al 33 % en peso de PS y una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,8:0,8:0,9 y 1,2:1,2:1,5, y la relación en peso entre la cantidad total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 20:1 y 3:1.

Preferentemente, los liposomas comprendidos en la composición de la invención encapsulan al menos un autoantígeno que está asociado con T1D. Más preferentemente, el autoantígeno es un péptido derivado de insulina. Aún más preferentemente, el autoantígeno es un péptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

En una realización los liposomas comprendidos en la composición de la invención encapsulan al menos un autoantígeno que está asociado con MS. Preferentemente, el autoantígeno es un péptido derivado de MOG. Aún más preferentemente, el autoantígeno es un péptido con SEQ ID NO: 3.

La presente invención también contempla composiciones en las que los liposomas encapsulan más de un autoantígeno y composiciones que comprenden diferentes liposomas, cada uno encapsulando un autoantígeno diferente. Preferentemente todos los autoantígenos encapsulados en liposomas en las composiciones de la invención están relacionados con la misma enfermedad autoinmune, preferentemente T1D o EM. En una realización particular, la composición comprende liposomas que encapsulan los péptidos con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En otra realización la composición comprende liposomas que encapsulan el péptido con SEQ ID NO: 1 y liposomas que encapsulan el péptido con SEQ ID NO: 2. En otra realización, la composición comprende liposomas que encapsulan el péptido con SEQ ID NO: 1 y liposomas que encapsulan el péptido con SEQ ID NO: 2 a una relación en peso del liposoma con SEQ ID NO: 1 con respecto al liposoma con SEQ ID NO: 2 comprendida entre 10:1 y 1:10, particularmente entre 5:1 y 1:5, más particularmente entre 2:1 y 1:2, y preferentemente 1:1.

En la presente invención, la expresión “excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables” se refiere a materiales, composiciones o portadores farmacéuticamente aceptables. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica. También debe ser adecuado para su uso en contacto con el tejido u órgano de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones proporcionados con una relación de beneficio/ riesgo razonable. De forma similar, la expresión “aceptable desde el punto de vista veterinario” significa adecuado para su uso en contacto con un animal no humano.

La formulación de las composiciones de la invención depende en gran medida de la vía de administración. En una realización de la invención, el liposoma que encapsula autoantígeno se administra a un paciente por vía oral. Las composiciones orales incluyen comprimidos, polvos, cápsulas, sobrecitos, así como jarabes líquidos, suspensiones y elixires, todos pudiendo formularse por métodos bien conocidos en la técnica. El liposoma que encapsula autoantígeno también puede administrarse a un paciente por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal (i.p.), subcutánea, intramuscular o intradérmica. También se conocen bien en el estado de la técnica composiciones adecuadas para estas vías de administración e incluyen soluciones para inyección, soluciones para perfusión, polvo para reconstitución de inyecciones líquidas y jeringas precargadas. En el sentido de la presente invención también puede ser adecuado formular el liposoma que encapsula autoantígenos para administración intranasal o inhalada, administración rectal o para administración tópica en forma de, por ejemplo, una crema, un gel, una pomada o un parche dérmico. Se conocen en el estado de la técnica métodos para la preparación de estas formulaciones. Además, el liposoma que encapsula autoantígenos puede formularse como una forma de dosificación de liberación controlada. Se conocen en el estado de la técnica formas de dosificación de liberación controlada y son particularmente deseables para el tratamiento de enfermedades crónicas o para la administración de agentes activos que pueden ser tóxicos a altas dosis o que muestran un patrón de vida medio bajo cuando se administran al paciente.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para evitar el desarrollo de, o aliviar en algún grado, uno o más de los síntomas de la enfermedad que se aborda. La dosis particular del compuesto administrado de acuerdo con la presente invención vendrá determinado por supuesto por las circunstancias particulares en torno al caso, incluyendo el compuesto administrado, la eficacia de encapsulación, la vía de administración y consideraciones similares.

La afección autoinmune particular que se trata desempeña un papel importante en la dosis particular a administrar del compuesto. En una realización, la enfermedad autoinmune para prevenir o tratar se selecciona del grupo que consiste en T1D, lupus eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, dermatomiositis, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, anemia perniciosa, artritis reactiva, anemia hemolítica autoinmune, neutropenia autoinmune, enfermedad de Graves, psoriasis, artritis psoriásica y síndrome de Sjogren. En una realización preferida la afección autoinmune es T1D.

Además, también podría ser necesario tener en cuenta el estadio clínico de la afección autoinmune que se trate para determinar una dosis apropiada del liposoma que encapsula autoantígenos para administrar. Como ya se ha mencionado, los liposomas de la invención son útiles tanto para la prevención como para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. Por "prevención" se entiende prevenir la respuesta inmune anómala a un autoantígeno, por lo que los acontecimientos patógenos que subyacen a la respuesta inmune anómala no se desencadenan. Por "tratamiento" se entiende ocuparse de los acontecimientos patógenos en curso que subyacen a la respuesta inmune anómala y posteriormente aliviar cualquier síntoma clínico que esté presente. Esto incluye el tratamiento de la afección autoinmune en pacientes que, a pesar de tener una respuesta autoinmune y algún daño tisular, no muestran síntomas clínicos o muestran solamente pocos síntomas clínicos de la enfermedad autoinmune. Este estadio se denomina con frecuencia estadio "preclínico" y es típico de la mayoría de enfermedades autoinmunes, por ejemplo en T1D, en la que se denomina prediabetes. En prediabetes, las células B pancreáticas están dañadas en algún grado pero solamente se cumplen algunos de los criterios de diagnóstico para la diabetes. La enfermedad en este estadio puede tratarse eficazmente con inmunoterapia basada en los liposomas de la invención, como apoyan los resultados obtenidos en los experimentos descritos posteriormente. Tradicionalmente, los estadios avanzados de enfermedad autoinmune en los que el daño tisular es alto y los síntomas clínicos son evidentes, también pueden tratarse eficazmente administrando una cantidad eficaz del liposoma de la presente invención que encapsula autoantígeno.

Una realización de la invención se dirige a la prevención de la enfermedad autoinmune mientras que otra realización se dirige al tratamiento de la enfermedad. Otra realización particular se dirige al tratamiento de una enfermedad autoinmune durante el estadio preclínico.

En una realización preferida la invención proporciona un liposoma o una composición farmacéutica o veterinaria como se ha definido anteriormente para uso en la prevención de T1D. En otra realización preferida, el liposoma o la composición farmacéutica o veterinaria como se ha definido anteriormente es para uso en el tratamiento de T1D. En otra realización preferida más, el liposoma o la composición farmacéutica o veterinaria como se ha definido anteriormente es para uso en el tratamiento de T1D en un sujeto prediabético.

En una realización la invención proporciona un liposoma o una composición farmacéutica o veterinaria como se ha definido anteriormente para uso en la prevención de MS. En otra realización, el liposoma o la composición farmacéutica o veterinaria como se ha definido anteriormente es para uso en el tratamiento de EM.

En total, la dosis a administrar de liposoma que encapsula autoantígenos se determina a la vista de varias circunstancias. Solamente como un ejemplo ilustrativo, cuando se usan liposomas MVV de acuerdo con la invención que contienen PS, PC y CHOL a una relación molar lipídica 1:1:1,33 (PS:PC:CHOL) que encapsulan autoantígeno asociado con TD1 con SEQ ID NO: 1 a una relación en peso de lípido con respecto a antígeno 11,6:1 (cantidad de lípido total frente a cantidad de autoantígeno total), la cantidad terapéuticamente eficaz para tratar a un sujeto humano que padece T1D en el estadio prediabético puede ser de 0,05 a 50 mg de liposomas que encapsulan autoantígeno / kg de peso corporal, preferentemente de 0,5 a 5 mg de liposomas que encapsulan autoantígeno / kg de peso corporal. Cuando se encapsula SEQ ID NO: 2 en liposomas como se han definido anteriormente a una relación en peso de lípido con respecto a antígeno 3,8:1, la cantidad terapéuticamente eficaz para tratar a un sujeto humano que padece T1D en el estadio prediabético puede ser de 0,05 a 50 mg de liposomas que encapsulan autoantígeno / kg de peso corporal, preferentemente de 0,5 to 5 mg de liposomas que encapsulan autoantígeno / kg de peso corporal. Cuando se usa una composición que comprende ambos tipos de liposoma como se han definido anteriormente, preferentemente, a una relación en peso 1:1 de un liposoma con SEQ ID NO: 1 con respecto a liposoma con SEQ ID NO: 2, la cantidad terapéuticamente eficaz para tratar a un sujeto humano que padece T1D en el estadio prediabético también puede ser de 0,05 a 50 mg de liposomas que encapsulan autoantígeno / kg de peso corporal, preferentemente de 0,5 a 5 mg de liposomas que encapsulan autoantígeno / kg de peso corporal.

Además, el experto médico determinará cuántas dosis de medicamentos se administran al paciente para prevenir o tratar la enfermedad autoinmune. A este respecto, los inventores han descubierto que una sola una dosis de los liposomas de la invención que encapsulan autoantígenos puede tratar eficazmente T1D en ratones prediabéticos. Sin embargo, el experto médico puede decidir que son necesarias más dosis para tratar estadios avanzados de la enfermedad. En una realización, el liposoma o la composición farmacéutica o veterinaria como se ha definido anteriormente es para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmune, preferentemente T1D, administrando de una a cinco dosis de dicho liposoma o dicha composición farmacéutica al paciente. En una realización particular la prevención o el tratamiento se consigue administrando una, dos, tres o cuatro dosis. En otra realización, el liposoma o la composición farmacéutica o veterinaria como se ha definido anteriormente es para uso en el tratamiento de T1D administrando una, dos, tres, cuatro o cinco dosis de dicho liposoma o dicha composición farmacéutica a un paciente. En una realización preferida, el paciente es un paciente prediabético.

Ya que el efecto preventivo o terapéutico se consigue mediante la presentación tolerogénica del autoantígeno encapsulado y posterior supresión de la respuesta autoinmune, los aspectos finales de la invención se refieren a un liposoma o una composición farmacéutica o veterinaria como se ha definido anteriormente para restauración de la autotolerancia y para la supresión de una respuesta autoinmune. En otras realizaciones particulares de estos aspectos de la invención, la restauración de la autotolerancia y supresión de la respuesta autoinmune son en el contexto de T1D, más particularmente en el contexto de prediabetes.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "consiste en". Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Los signos numéricos relativos a los dibujos y colocados entre paréntesis en una reivindicación, son solamente para intentar aumentar la comprensión de la reivindicación, y no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la protección de la reivindicación. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

30 EJEMPLOS

Materiales y métodos:

Preparación de liposomas

Se obtuvieron fosfatidilserina (PS) y fosfatidilcolina (PC) de Lipoid, Steinhausen, Suiza. Se obtuvo colesterol (CHOL) de Sigma Aldrich, San Luis, Estados Unidos. Se obtuvo colorante fluorescente conjugado con lípidos Oregon Green 488 DHPE de Invitrogen, California, Estados Unidos. Se obtuvo Alexa Fluor 750 de Invitrogen en su forma de succinimidil éster y se conjugó con el lípido DOPE proporcionado por Avanti Polar Lipids (Alabaster, Estados Unidos). Los péptidos con SEQ ID NO: 1 (GIVDQCCTSICSLYQLENYCN) y SEQ ID NO: 2 (FVKQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPMS), que derivan de la cadena A de insulina y la cadena B de insulina, respectivamente, se obtuvieron de Genosphere Biotechnologies (París, Francia) y eran >95 % puros y con ácido tricloroacético (TCA) retirado. El péptido con SEQ ID NO: 3 (YRSPFSRVVHLYRNGK) derivado de glucoproteína de mielina de oligodendrocito (MOG) se obtuvo del Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona, IRBB, Barcelona, España.

Los liposomas se prepararon usando el método de hidratación de película fina a partir de una mezcla de lípidos de PS, PC y CHOL a una relación molar de 1:1:1,33 respectivamente (Harel-Adar T, 2011). La cantidad de lípido total fue de 30 mM. Se disolvieron los lípidos y los colorantes fluorescentes conjugados con lípidos en cloroformo y el disolvente se retiró por evaporación al vacío y con nitrógeno. Los lípidos se hidrataron con el tampón apropiado (PBS, solución de péptido de 0,5 mg/ml con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 en PBS por separado), y los liposomas obtenidos de este modo se homogeneizaron hasta 1 µm por medio de una extrusora (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canadá). El péptido no encapsulado se retiró de la formulación de liposomas por centrifugación. Se midieron las distribuciones de tamaños de partículas y la estabilidad expresada como potencial zeta (ζ) de liposomas mediante dispersión de luz dinámica (DLS) usando Malvern Zetasizer, (Malvern Instruments, Reino Unido) en muestras no diluidas. Se examinó la morfología y la lamellaridad de los liposomas usando microscopía electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM) en un microscopio JEOL-JEM 1400,

Ratones

Se obtuvieron ratones NOD de tipo silvestre de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, Estados Unidos) y se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos. Solamente se usaron hembras de 8 semanas de edad.

Los ratones se obtuvieron de Harlan Laboratories (Italia) y se alojaron en condiciones convencionales. Solamente se usaron hembras de 8-10 semanas de edad. Para la inducción de EAE, ratones hembra C57BL/6 (Harlan) a la edad de ocho semanas recibieron inyecciones subcutáneas en ambos flancos de 50 µg de péptido MOG en PBS, emulsionado en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA) que contenía 4 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis H37RA (Difco, Detroit, MI, Estados Unidos), con ketamina (50 mg/kg de peso corporal) y xilazina (5 mg/kg de peso corporal). Además, se inyectaron 250 ng de toxina de Pertussis (Sigma Chemical) por vía intravenosa el día 0 y el día 2.

Este estudio se llevó a cabo en estricta concordancia con las recomendaciones en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Generalitat de Catalunya, gobierno catalán. El protocolo fue aprobado por el comité de Ética de Experimentos Animales del Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol (número de licencia: DAAM 5157).

Experimentos de generación y captación de célula dendrítica (DC)

Se generaron DCs a partir de progenitores de médula ósea de ratones NOD en medio de cultivo que contenía GM-CSF (1000 U/ml; Prospec, Rehovot, Israel) como se ha indicado previamente (Marin-Gallen, Clinical and Experimental Immunology 2010). La pureza de las DCs se evaluó por tinción con CD11c-PECy7 (BD Pharmingen) como se ha descrito (Pujol-Autinell I, et al. PLOS ONE 2013). La viabilidad se determinó por tinción con anexina y 7aad como se ha publicado previamente (Pujol-Autonell I et al. PLOS ONE, 2013), y las células se contaron por citometría de flujo (Perfect Count Microspheres, Cytognos, Salamanca, España). Se realizó la captura de liposomas cocultivando DCs con micropartículas liposómicas (vacías o cargadas con péptidos de insulina) durante 2 horas. Se empleó solución de reserva de micropartículas liposómicas (30 mM) diluida a 100-1.000 µM para estos experimentos. Las DCs de control se cultivaron en condiciones basales para obtener DC inmaduras (iDCs) o se estimularon con LPS (100 ng/ml; Sigma) durante 24 horas para obtener DCs maduras (mDCs). La captación in vitro de liposomas con PS por DCs se determinó con liposomas con PS marcados con fluorescencia (Oregon green 488 DHPE, Invitrogen). Después de lavar exhaustivamente en PBS para retirar los liposomas unidos a la membrana celular, se determinó la captura de liposomas por citometría de flujo (FACSCanto II, BD Biosciences).

Características tolerogénicas en DCs después de la captura de liposomas

Se determinó la expresión de moléculas de membrana coestimulantes CD40 y CD86 en DCs mediante análisis de citometría de flujo (FACSCanto II). Las DCs se tiñeron con anticuerpos monoclonales para CD11c/PE-Cy7, CD40/APC, CD86/PE de ratón (BD Pharmingen). Se usó tinción de control de isotipo como control. Se analizaron los datos usando software CellQuest (BD Biosciences). Basándose en resultados previos del papel de PGE2 en la inducción de tolerancia por células apoptóticas (Pujol-Autonell PLOS ONE 8:e63296, 2013), se evaluó mediante ELISA la producción de PGE2 después de la captura de liposomas con PS por DCs en sobrenadantes de diferentes cultivos (PGE2 EIA Kit-Monoclonal; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI). Límite de detección: 80 % B/B0: 15 pg/ml. Sensibilidad: 50 % B/B0: 50 pg/ml. Los resultados se expresaron como un índice (pg PGE2/106 células).

Ensayos de proliferación de células T

Se cargaron DCs con liposomas 1 mM (vacíos o cargados con péptidos de insulina) durante 2 horas con 20 µg/ml de insulina (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos) y después se usaron para determinar la proliferación de células T. Se obtuvieron células T después de alteración mecánica de bazo de NOD y se purificaron por selección negativa usando anticuerpos para CD19-PE, CD16/32-PE, CD11c-PECy7 (BD Pharmingen), CD11b-PE (ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Alemania), y Ly-6G(Gr-1)-eFluor660 (eBioscience, CA, Estados Unidos) y clasificación (FACS Aria II, BD Biosciences), como se ha descrito (Pujol-Autonell, PLOS ONE 2013). Las DCs (10.000 células) solas o pulsadas con liposomas con PS vacíos o liposomas que encapsulan autoantígeno se cultivaron con 105 linfocitos T (relación 1:10). Después de 6 días, las células se pulsaron con 1 µCi de (3H)-timidina (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos) durante 16 h adicionales. Las células se recogieron (Harvester 96, Tomtec Inc., Hamden, CT, Estados Unidos) y se analizaron usando un contador de centelleo (1450 Microbeta, TriluxWallac, Turku, Finlandia). La proliferación de células T se expresó como c.p.m x 10³ células.

Inmunoterapia de diabetes de tipo 1 (prevención y tratamiento)

Se dio a ratones NOD prediabéticos (8 semanas de edad) una única dosis intraperitoneal de 3 mg de liposomas con PS (vacíos o que encapsulaban péptido con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 a una relación 1:1) en 200 µl de solución salina. También se incluyó un grupo de control de simulación que recibió solamente solución salina. Se usó un total de 12-18 animales por grupo. Los ratones se controlaron diariamente por glucosa en orina usando tiras Glucocard (Menarini, Barcelona, España), y semanalmente con respecto a peso corporal durante un periodo de 30 semanas. Se confirmó diabetes en animales con glucosuria cuando el nivel de glucosa en sangre fue >300 mg/dl.

Se trataron i.p. ratones NOD diabéticos (>25 semanas de edad) con 3 dosis de 3,5 mg de liposomas con PS (vacíos o que encapsulaban péptido con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 a una relación 1:1) en 200 µl de solución salina los días 1, 5 y 8 después de la aparición de la enfermedad. Los ratones se controlaron diariamente por glucosa en orina usando tiras Glucocard (Menarini, Barcelona, España), durante un periodo de 30 semanas. Se confirmó diabetes en 5 los animales con glucosuria y se determinó la aparición de enfermedad cuando los niveles de glucosa en sangre sucesivos eran mayores de 200 mg/dl o cuando una medida fue mayor de 300 mg/dl. Los niveles de glucosa en sangre se supervisaron semanalmente (AccuCheck, Roche Diagnostics, Indianápolis, IN). Se administró insulina inyectada por vía subcutánea (s.c.) diariamente (1U, Insulatard Flex-Pen, Novo-Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) desde el momento de aparición de la enfermedad, a no ser que se consiguiera normoglucemia. La glucemia se 10 supervisó 3 veces por semana (AccuCheck, Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) después de ayunar durante 2 horas.

Puntuación de insulinitis

15 El grado de infiltración de islotes por leucocitos, insulinitis, se determinó al final del estudio. Brevemente, se congelaron instantáneamente páncreas de todos los ratones para cada grupo en un baño de acetona fría/isopentano. Se obtuvieron criosecciones de 5 µm a 5 niveles no solapantes. Las secciones se tiñeron con hematoxilina/eosina, se codificaron y fueron analizadas por 2 observadores independientes con ocultación de las condiciones experimentales. Cada observador evaluó un mínimo de 40 islotes por animal. La insulinitis se puntuó 20 como se ha descrito previamente (Alba A, J Immunol 2004; 173:6667-75): 0, sin insulinitis; 1, periinsular; 2, insulinitis leve (<25 % del islote infiltrado); 3, 25-75 % del islote infiltrado; 4, infiltración de islote total.

Inmunoterapia de EAE

25 Se usan con frecuencia ratones inmunizados C57BL/6 como modelo de enfermedad EAE, que está estrechamente relacionada con MS y con frecuencia sirve para ensayar terapias y tratamientos contra MS. Para evitar el desarrollo de EAE, se trataron i.p. ratones C57BL/6 inmunizados con 2 dosis de 1,75 mg de liposomas con PS cargados con MOG40-55 en 100 µl de solución salina los días 5 y 9 después de la inmunización. Como control, los ratones se 30 trataron con liposomas vacíos (liposomas con PS) o PBS (simulación).

30 Todos los animales se pesaron y se examinaron diariamente con respecto a bienestar y estado clínico de ratones tratados así como señales neurológicas. Se realizó puntuación clínica de EAE según los siguientes criterios (Espejo C, et al., Exp Neurol 2001): 0, asintomático; 0,5, pérdida de la mitad distante del tono de la cola; 1, pérdida completa de tono de la cola; 1,5, debilidad de las extremidades posteriores; 2, parálisis de las extremidades posteriores; 2,5, 35 paraplejía de las extremidades posteriores; 3, debilidad de las extremidades anteriores; 4, cuadriparesia; 4,5, cuadriparesia grave; 5, tetraplejía; y 6, muerte, como se describe en otra parte [Espejo 2001, mencionado anteriormente]. Se realizaron análisis de seguimiento clínico, en modo ciego, por dos observadores diferentes.

Seguimiento de liposomas después de administración i.p.

40 Para experimentos de bioimágenes, se inyectaron i.p. liposomas con PS marcados con fluorescencia (Alexa Fluor 750) en ratones NOD prediabéticos y se observaron durante 3 días. Se capturaron imágenes de los ratones con anestesia (Pearl Imager, Li-Cor) en el momento de la administración y 6, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Se cuantificó la señal de fluorescencia. Al final del experimento se obtuvieron varios órganos, se pesaron y se 45 capturaron sus imágenes para determinar la distribución de fluorescencia.

Análisis estadístico

Se realizó estadística usando el software Prism 5,0 (GraphPad software Inc., San Diego, CA). Para datos 50 emparejados, se realizó un ensayo de Wilcoxon no paramétrico. De otro modo, se usó un ensayo de Mann Whitney. Se consideró significativo un p-valor < 0,05.

Resultados

55 Liposomas que presentan PS y que encapsulan péptidos de insulina son capturados por DCs

Se prepararon liposomas con PS con PS:PC:CHOL a una relación molar 1:1:1,33, para presentar la "señal de muerte" de PS en su superficie. Los liposomas vacíos presentan un tamaño de partícula medio de 1,014 µm que es un tamaño óptimo para una captación eficaz por células dendríticas (Ulrich AS, Bioscience Reports 22: 129-150, 60 2002) con un índice de polidispersión (Pdl) de 0,321. Adicionalmente, las mediciones potenciales zeta revelaron una carga de superficie neta de -30,66 mV en liposomas con PS. Por otro lado, cuando los liposomas con PS encapsularon péptidos con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 de insulina 2 de ratón, los liposomas muestran un diámetro medio de 1,062 µm (Pdl=0,324) y 0,954 µm (Pdl=0,309) para péptidos con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2

respectivamente (FIG.. 1). Con respecto al potencial zeta, ambos liposomas encapsulados presentan una carga de superficie negativa de -29,5 mV. El % de encapsulación fue de $44,63 \pm 23,68$ % para el péptido con SEQ ID NO: 1 y $88,48 \pm 3,97$ % para el péptido con SEQ ID NO: 2 (media \pm DT). Los liposomas con PS que encapsulaban péptidos con SEQ ID NO: 3 tenían un diámetro medio de 942,2 nm y potencial zeta de -33,66 mV. La eficacia de encapsulación para SEQ ID NO: 3 fue de $89,34 \pm 4,69$ %. Por análisis de cryo-TEM, se observó que la mayoría de los liposomas (vacíos o encapsulando péptido) son vesículas multivesiculares (MVV). Después del cocultivo, las DCs engulleron los liposomas con PS (FIG.. 2).

Las DCs tienen expresión reducida de moléculas coestimulantes y producen PGE2 después de la captura de los liposomas con PS que encapsulan péptidos de insulina

La viabilidad de DCs después de cocultivo fue siempre similar a las DCs de control incluso después de un estímulo proinflamatorio (FIG. 3A) independientemente de la dosis (intervalo 100-2.000 mM, datos no mostrados).

La expresión de dos moléculas coestimulantes, CD40 y CD86, se evaluó en la superficie de DCs. (FIG. 3B). Se observó que la expresión de CD40 y CD86 en la membrana celular no aumenta después de la captura del liposoma, permaneciendo a niveles bajos. Después de la exposición a LPS, las DCs aumentan significativamente la expresión de CD40 y CD86 y las DCs cargadas con liposomas con PS aumentan significativamente CD86 ($p < 0,001$) pero no CD40. Por el contrario, los liposomas con PSAB no aumentan significativamente la expresión de CD40 ni CD86 en membrana.

Basándose en resultados previos (Pujol-Autonell, PLOS ONE 2013), se examinó la producción de PGE2 inducida por liposomas en DCs. La concentración de PGE2 se aumentó significativamente en el sobrenadante de DCs cocultivadas con liposomas (vacíos o cargados con péptidos de insulina) en comparación con iDCs ($p < 0,05$) (FIG. 3C).

La alteración de DCs para estimular la proliferación de células T autólogas después de la captura de liposomas con PS que encapsulan péptidos de insulina

Las DCs generadas a partir de progenitores de médula ósea de ratones NOD fueron > 80 % puras, basándose en la tinción con respecto al marcador de DC CD11c, y la viabilidad fue siempre > 90 %. La pureza y viabilidad de células T fueron siempre por encima del 90 % y 95 % respectivamente (datos no mostrados). Se observó que la captura de liposomas con PS- o PSAB por iDC no aumenta la proliferación de linfocitos T autólogos en comparación con iDC sola (FIG. 4). Después del estímulo por LPS, la proliferación de células T inducida por mDC fue mayor que la proliferación inducida por iDC ($p < 0,05$). Por el contrario, la proliferación de células T inducida por DC cargadas con liposoma con PS o PSAB no aumenta, incluso después del efecto de estos estímulos proinflamatorios. Los resultados indican que la proliferación de células T inducida por DC- liposomas con PS no aumenta, ni siquiera incluso después del efecto de estos estímulos proinflamatorios.

Los liposomas con PS que encapsulan péptidos de insulina tratan eficazmente T1D en ratones prediabéticos NOD

Para evaluar la eficacia de liposomas en la prevención de T1D, se trataron ratones NOD con una única dosis de inmunoterapia durante el periodo prediabético (8 semanas de edad). Como se esperaba, los animales del grupo de control simulado desarrollaron diabetes a partir de las 13 semanas de edad y con una incidencia final del 81,3 % ($n=16$) (FIG. 5A). El tratamiento con liposomas con PS vacíos dio como resultado una incidencia de enfermedad del 83,3 % ($n=18$) comenzando la enfermedad a las 15 semanas de edad. El tratamiento con liposomas con PS que encapsulan péptidos de insulina autoantigénicos dio como resultado una mejora de la enfermedad, con una incidencia del 50 % ($n=12$) comenzando también a las 15 semanas de edad. No se encontraron diferencias significativas en el peso corporal (FIG. 5B) de ratones que recibieron la inmunoterapia en comparación con un grupo simulado o grupo tratado con liposomas vacíos.

La insulinitis se reduce en ratones tratados con liposomas con PS que encapsulan péptidos de insulina

La insulinitis se puntuó para 3-6 animales no diabéticos de cada grupo al final del periodo de seguimiento (30 semanas) para determinar cualquier efecto del tratamiento en infiltración de leucocitos en islotes (FIG. 6A). Como se esperaba, los animales del grupo simulado mostraron altas puntuaciones de insulinitis ($2,34 \pm 0,18$). Los ratones tratados con liposomas con PS vacíos mostraron un grado de insulinitis similar ($2,12 \pm 0,46$). La inmunoterapia con liposomas con PS que encapsulan péptidos de insulina presentó una reducción biológica, aunque no significativa, de la puntuación de insulinitis ($1,69 \pm 0,58$) en comparación con el grupo simulado. Además, el análisis del porcentaje de islotes clasificados en cada una de las cinco categorías de infiltración mostró que en ratones tratados con inmunoterapia el 47 % de los islotes permanecieron sin insulinitis o con periinsulinitis mientras que en el grupo simulado y el grupo de liposomas con PS, el 26 % y el 34 % de los islotes no se destruyeron respectivamente (FIG. 6B).

Los liposomas con PS cargados con péptidos de insulina pueden revertir la diabetes en ratones NOD cuando se administran después de la aparición de la enfermedad

5 Los liposomas con PS cargados con péptidos de insulina invirtieron la diabetes en ratones NOD cuando se administraron después de la aparición de la enfermedad (FIG. 8 A). Estos ratones sobrevivieron sin administración exógena de insulina alcanzando niveles normales de glucemia. Por el contrario, los ratones tratados con liposomas con PS vacíos no alcanzan normoglicemia (FIG. 8 B) a pesar de la administración continua de insulina.

Los liposomas con PS que encapsulan péptido MOG mejoran EAE

10 Se prepararon liposomas con PS que contenían péptido MOG (autoantígeno específico en MS). Estos liposomas, cuando se inyectaron i.p. en ratones inmunizados C57BL/6, evitaron el desarrollo de la enfermedad (FIG. 9). El tratamiento con liposomas cargados con péptido MOG indujo un aumento de células T reguladoras clásicas, una población de células implicada en el mantenimiento de tolerancia periférica, en el bazo de ratones inmunizados
15 (resultados no mostrados). Tanto los liposomas con PS como la encapsulación de péptido fueron críticos para el efecto terapéutico, ya que los liposomas vacíos no tuvieron ningún efecto. Por lo tanto, los liposomas con PS que encapsulan péptido MOG pueden mejorar EAE, posibilitando un primer ataque menos severo y una rápida recuperación del agravamiento. En consecuencia, los liposomas con PS que encapsulan péptidos MOG pueden ser útiles para el tratamiento de EM.

20 Seguimiento de liposomas después de la administración i.p.

Se detectó señal fluorescente de liposomas en diferentes órganos del sistema inmunitario. Como se esperaba, los liposomas se localizaron en los ganglios linfáticos pancreáticos, el bazo, el páncreas y los ganglios linfáticos
25 mediastinales o paratímicos (FIG. 7).

REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

30 Marin-Gallen S, Clemente-Casares X, Planas R, Pujol-Autonell I, Carrascal J, et al. "Dendritic cells pulsed with antigen-specific apoptotic bodies prevent experimental type 1 diabetes". *Clin Exp Immunol* 2010, vol. 160, p. 207-214.

Alba A, Puertas MC, Carrillo J et al. "IFN beta accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance a beta cells in nondiabetes-prone mice". *J Immunol* 2004, vol. 173, p. 6667-75.

35 Pujol-Autonell I, Planas R, Ampudia R, Marín-Gallén S, Sanchez A, Carrascal J, , Marin A, Puig-Domingo M, Pujol-Borrell R, Verdaguer J, Vives-Pi M. "Efferocytosis promotes suppressive effects in dendritic cells through prostaglandin E2 production in the context of autoimmunity". *PLOS ONE* 8:e63296, 2013.

40 Ulrich AS. "Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles". *Bioscience Reports* 2002, vol. 22, p. 129-150,

Maurer N. et al., "Developments in liposomal drug delivery Systems", *Expert Opin Biol Ther*, 2001, vol. 1(6), p. 923-47.

45 Waterhouse D. N. et al., "Preparation, characterization, and biological analysis of liposomal formulations of vincristine", *Methods Enzymol.*, 2005; vol. 391, p. 40-57.

Urbán P. et al., "Study of the efficacy of antimalarial drugs delivered inside targeted immunoliposomal nanovectors",
50 *Nanoscale Research Letters*, 2011, vol. 6, p. 620

Roep BO, Peakman M. "Antigen Targets of Type 1 Diabetes Autoimmunity". *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, vol. 2(4):a007781. oi: 10,1101/cshperspect.a007781. Review. PMID:22474615.

55 Lernmark A. "Series introduction: Autoimmune diseases: are markers ready for prediction?". *J. Clin Invest*, 2001, vol. 108, p. 1091-1096.

Espejo C, et al. "Treatment with anti-interferon-gamma monoclonal antibodies modifies experimental autoimmune encephalomyelitis in interferon-gamma receptor knockout mice". *Exp Neurol* 2001, vol. 172, p. 460-468

60

LISTADO DE SECUENCIAS

5 [0107]

<110> Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol Fundació Privada Institut Catala de Nanotecnologia Institució Catalana de Recerca i Estudis Avangats

10 <120> Liposome-based immunotherapy

<130> P2898EP00

<150> EP14151629.4

15 <151> 2014-01-17

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

20

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> peptide derived from insulin A chain

<400> 1

30

Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2

<211> 30

35 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide derived from insulin B chain

40

<400> 2

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Met Ser
20 25 30

45 <210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

50 <220>

<223> peptide derived from myelin oligodendrocyte glycoprotein

<400> 3

ES 2 672 247 T3

Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr Arg Asn Gly Lys
1 5 10 15

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma que encapsula un autoantígeno, en el que
 (i) el liposoma tiene un tamaño comprendido entre 500 y 15000 nm; y
 5 (ii) la membrana del liposoma comprende fosfatidilserina (PS) en una cantidad comprendida entre el 10 y 40 % en peso con respecto a la composición total de membrana liposómica.
2. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 1, que es una vesícula multivesicular (MVV).
- 10 3. El liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el porcentaje en peso de PS está comprendido entre el 22 y el 33 % con respecto a la composición total de membrana liposómica.
4. El liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la membrana del liposoma comprende además fosfatidilcolina (PC) y colesterol (CHOL).
- 15 5. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la membrana del liposoma comprende PS, PC y CHOL en una relación molar PS:PC:CHOL que está comprendida entre 0,6:0,6:0,7 y 1,5:1,5:1,8.
6. El liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la relación en peso entre la cantidad
 20 total de lípido que forma la membrana del liposoma frente a la cantidad total de autoantígeno o autoantígenos está comprendida entre 20:1 y 3:1.
7. El liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el autoantígeno tiene un tamaño comprendido entre 5 y 50 aminoácidos.
- 25 8. El liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el autoantígeno es un péptido asociado con una enfermedad autoinmune seleccionado del grupo que consiste en diabetes de tipo 1 (T1D), lupus eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, dermatomiositis, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, anemia perniciosa, artritis reactiva, anemia hemolítica
 30 autoinmune, neutropenia autoinmune, enfermedad de Graves, psoriasis, artritis psoriásica y síndrome de Sjogren.
9. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el autoantígeno está asociado con T1D y se selecciona del grupo que consiste en los péptidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- 35 10. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el autoantígeno está asociado MS y comprende SEQ ID NO: 3.
11. El liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que encapsula autoantígenos adicionales, en el que todos los autoantígenos encapsulados están asociados a la misma enfermedad autoinmune.
- 40 12. Una composición farmacéutica o veterinaria que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del liposoma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, junto con otros excipientes o portadores apropiados aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.
- 45 13. Un liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición farmacéutica o veterinaria de acuerdo con la reivindicación 12, para uso como un medicamento.
14. Un liposoma como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición farmacéutica o veterinaria de acuerdo con la reivindicación 12, para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad
 50 autoinmune.
15. El liposoma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición farmacéutica o veterinaria de acuerdo con la reivindicación 12, para uso en la restauración de la autotolerancia en un paciente que padece una enfermedad autoinmune.
- 55 16. El liposoma o la composición farmacéutica o veterinaria para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-15, en el que la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en T1D, lupus eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, dermatomiositis, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, anemia perniciosa, artritis reactiva, anemia hemolítica autoinmune,
 60 neutropenia autoinmune, enfermedad de Graves, psoriasis, artritis psoriásica y síndrome de Sjogren.
17. El liposoma o la composición farmacéutica o veterinaria para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la enfermedad autoinmune es diabetes de tipo 1 o MS.

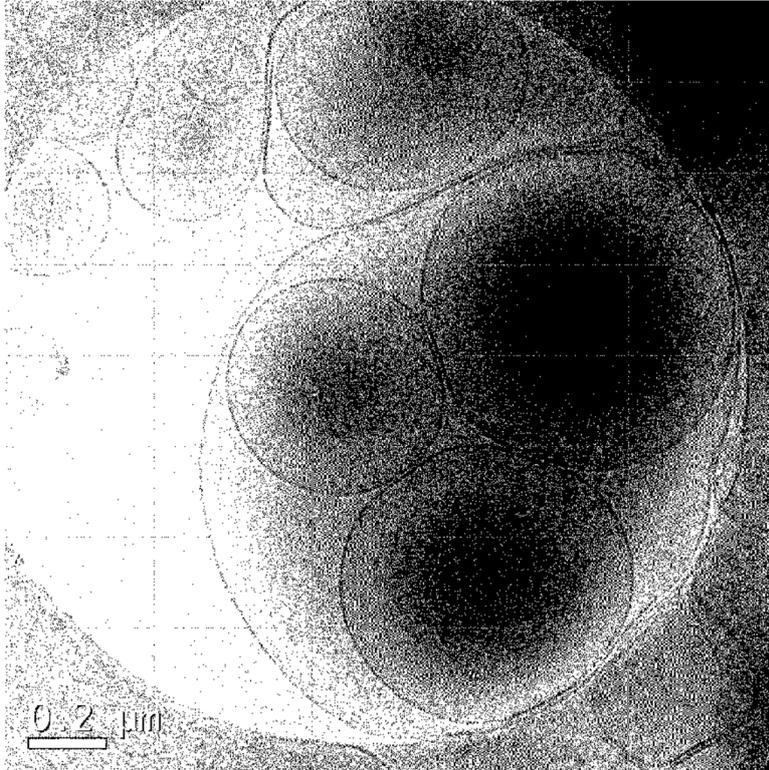


FIG.1

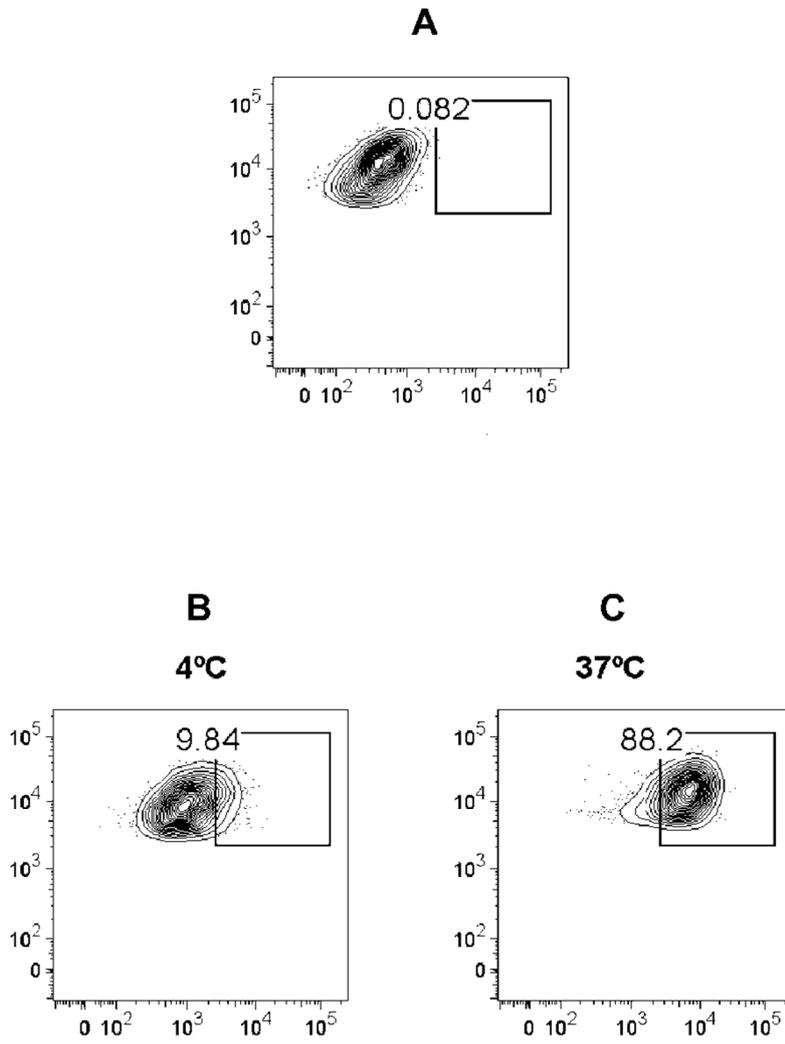


FIG. 2

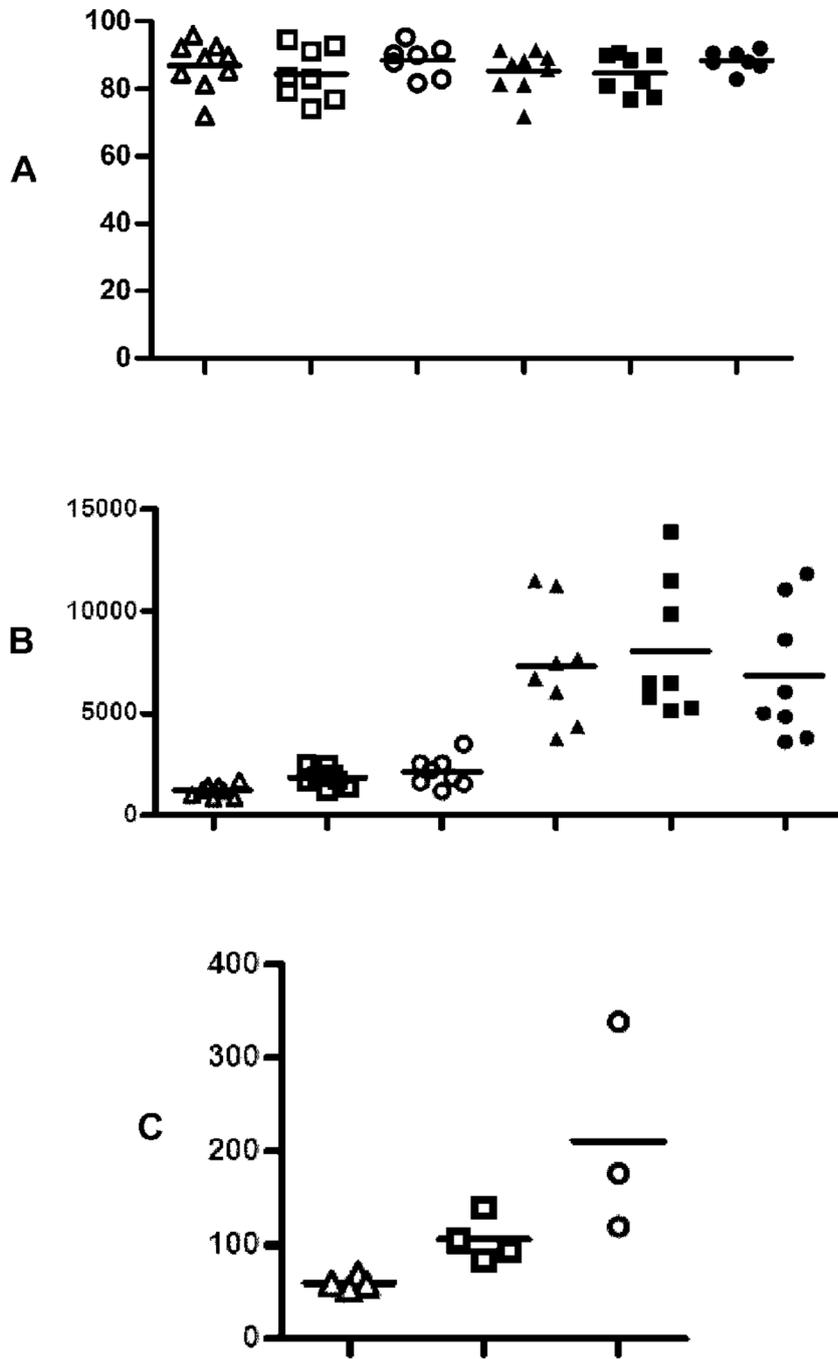


FIG. 3

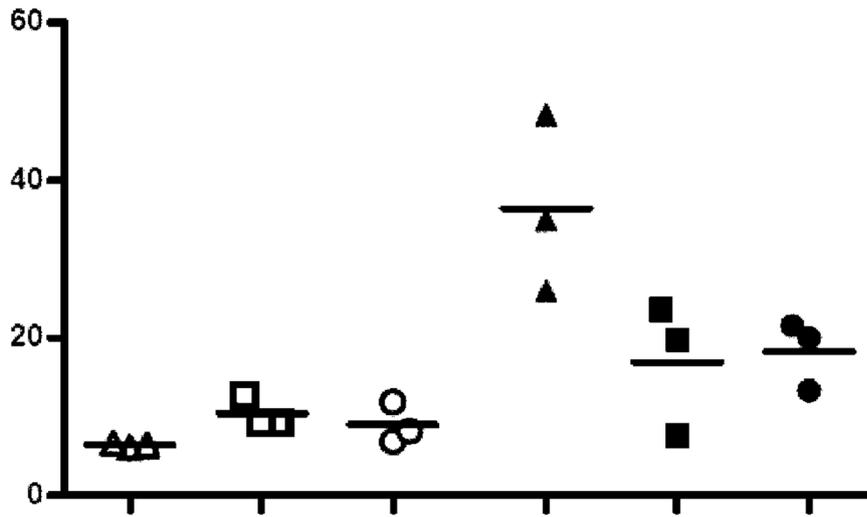


FIG. 4

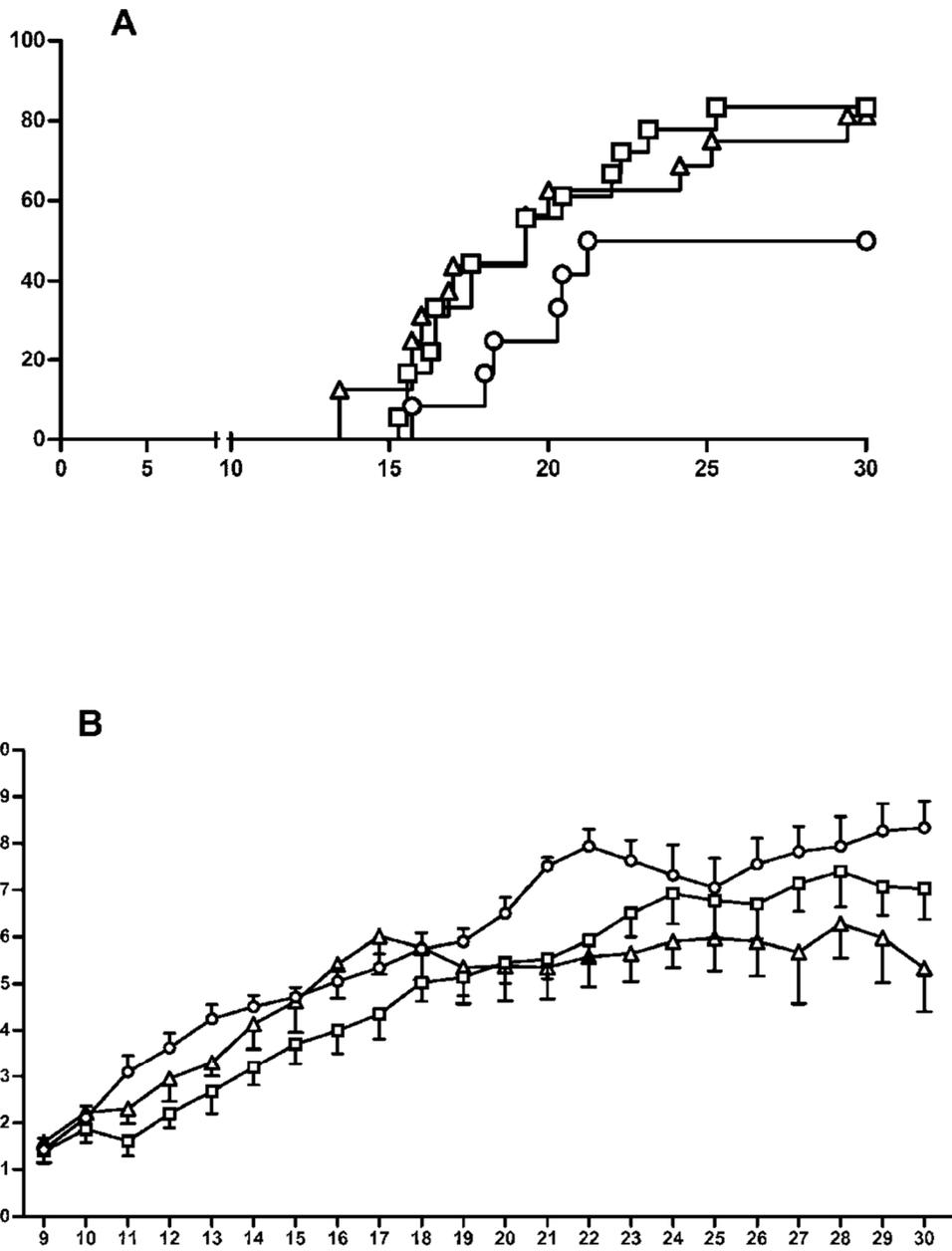


FIG. 5

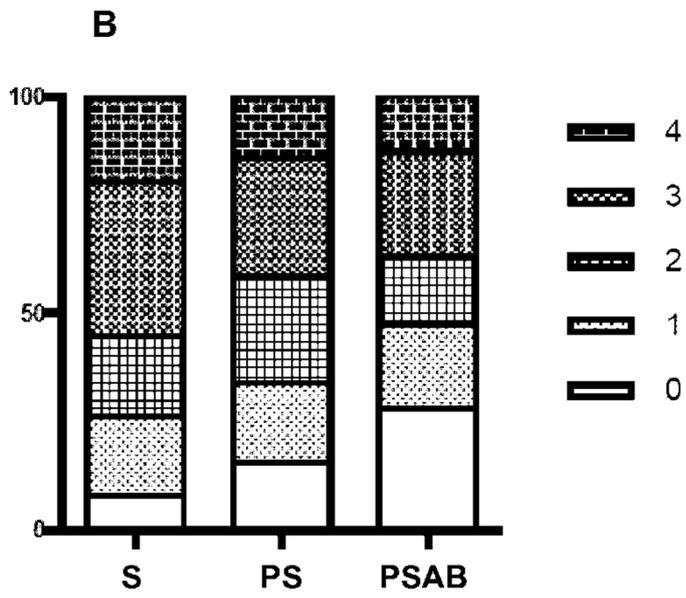
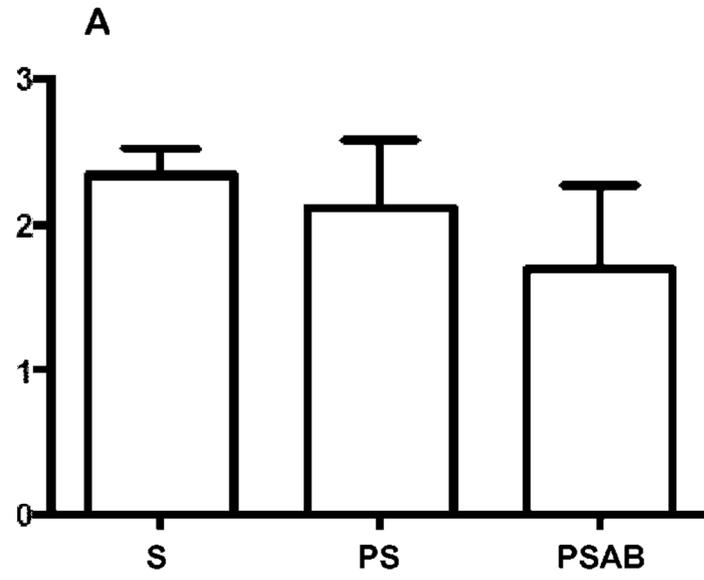


FIG. 6

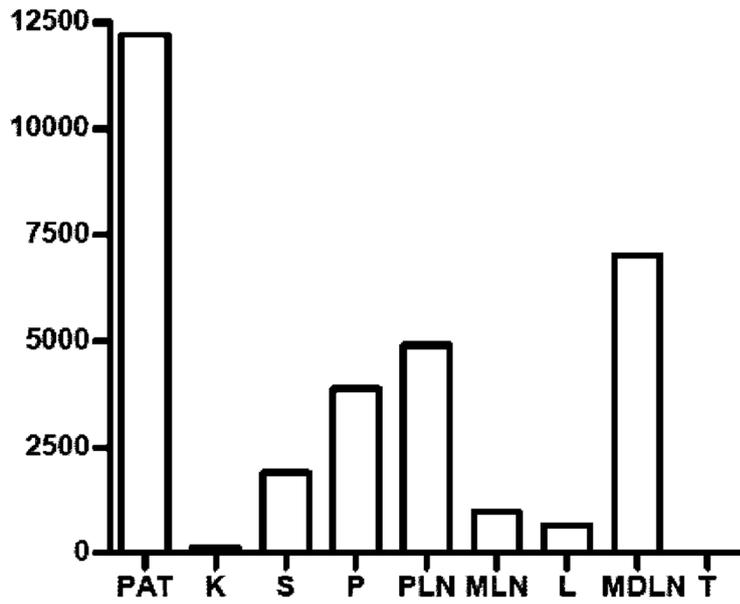


FIG. 7

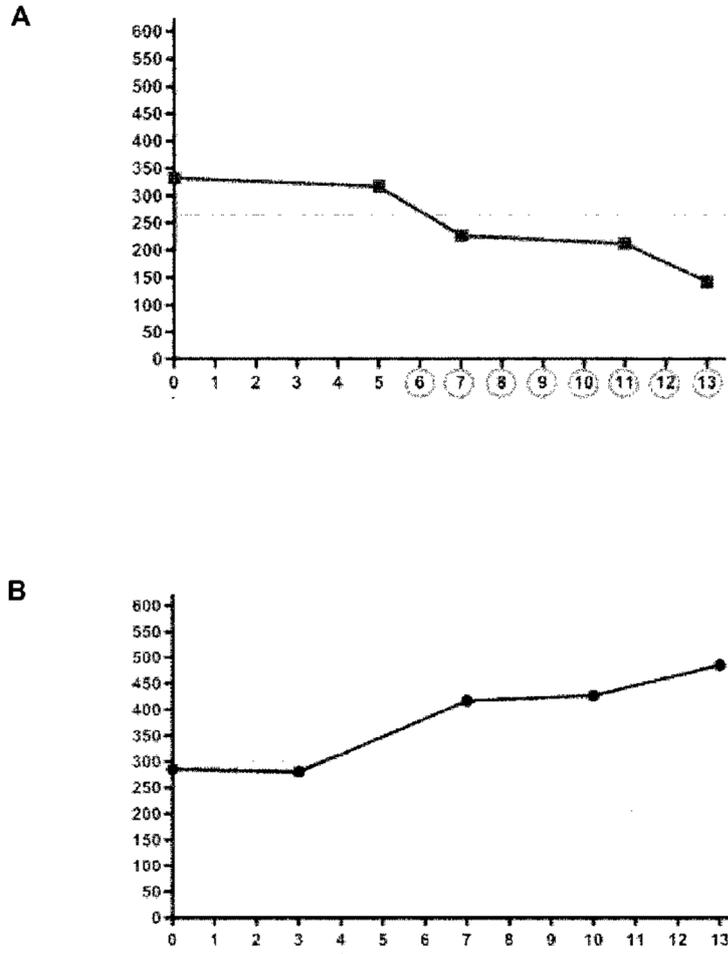


FIG. 8

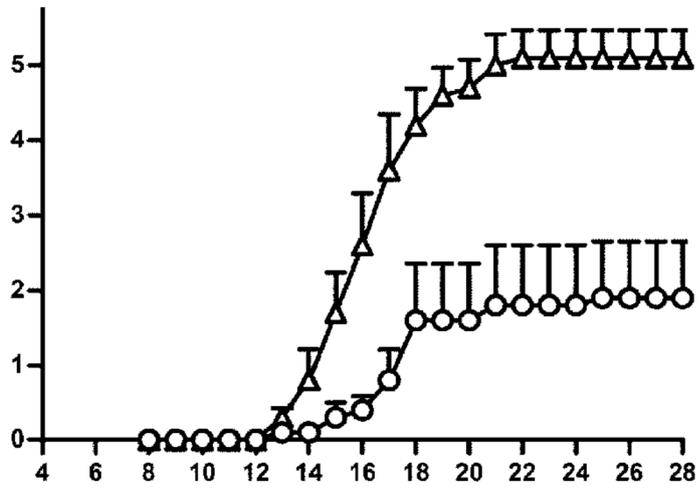


FIG. 9