

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 201**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/566** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 31/7048** (2006.01)  
**C08G 83/00** (2006.01)  
**A61K 47/59** (2007.01)  
**A61K 47/62** (2007.01)  
**A61K 47/64** (2007.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027457**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14168724**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14782337 (1)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 2972363**

54 Título: **Nanoportadores de fármacos de potenciación inmunitaria**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361788666 P**

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

**29.07.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)  
1951 NW 7th Avenue, Suite 110  
Miami, FL 33136, US**

72 Inventor/es:

**DAFTARIAN, PIROUZ M.;  
PEREZ, VICTOR y  
AGER, ARBA LEROY**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 776 201 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

Nanoportadores de fármacos de potenciación inmunitaria

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional con n.º de serie. 61/788.666, presentada el 15 de marzo de 2013.

**Lista de secuencias**

La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia en ASCII, creada el 13 de marzo de 2014, se nombra como 7230-170WO\_SL.txt y tiene un tamaño de 11.717 bytes.

10 **Campo de la invención**

La invención, tal como se define mediante las reivindicaciones, se refiere en general a los campos de la química, las enfermedades infecciosas y la inmunología. Más particularmente, se dan a conocer en el presente documento composiciones, kits, plataformas y métodos para administrar fármacos y otros agentes terapéuticos a células presentadoras de antígeno en un sujeto.

15 **Antecedentes**

20 La inesperada toxicidad inducida por fármacos es un obstáculo importante para los programas de desarrollo de fármacos. El desarrollo de terapias selectivas/dirigidas (administración dirigida de fármacos) es imprescindible, especialmente cuando se trata de fármacos que presentan una amplia gama de toxicidades. La leishmaniosis se ha convertido en un problema de salud mundial en 88 países que tienen un estado endémico con cerca de 500 millones de personas en riesgo. La mayoría de las infecciones se producen en Afganistán, Irak, Yemen, Arabia Saudí, Perú y Brasil. Desafortunadamente, las estrategias de tratamiento tradicionales no han logrado curar las infecciones debido a la resistencia a los fármacos y a fármacos ineficaces. La escasa captación de fármacos por los fagocitos mononucleares, el reservorio de parásitos, y la toxicidad asociada de los fármacos contra *Leishmania* ha afectado negativamente a su utilidad.

25 En el documento WO 2010/135394 A1 se describen composiciones para la presentación de antígenos *in vitro*, evaluación de eficacia de vacunas y evaluación de la inmunotoxicidad de productos biológicos y fármacos. Las composiciones implican el uso combinado de péptidos de direccionamiento a MHC, de unión a DR universales con dendrímeros poliméricos altamente ramificados cargados. En el documento WO 2010/115046 A2 y Lo-Man *et al.* ("A fully synthetic therapeutic vaccine candidate targeting carcinoma-associated Tn carbohydrate antigen induces tumor-specific antibodies in non-human primates", Cancer Research 2004, vol. 64, páginas 4987-4994) se han dado a conocer composiciones para la administración de vacunas y/o la generación de anticuerpos, comprendiendo dichas composiciones un dendrímero conjugado a al menos un resto de direccionamiento a CMH II y con al menos un antígeno.

**Sumario**

35 La presente invención se refiere al contenido tal como se define en las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

40 Las células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés), incluidos los macrófagos y las células dendríticas, son fundamentales en la preparación de respuestas inmunitarias protectoras contra el cáncer y muchos parásitos, bacterias y virus. También dictan las inmunoterapias tolerogénicas para trastornos autoinmunitarios, incluida la diabetes. Por tanto, la administración selectiva de fármacos a las APC ha sido objeto de mucho interés; en particular, cuando el patógeno puede infectar tales células y dar lugar a un brote de enfermedades tan mortíferas y difíciles de tratar en seres humanos, incluida la tuberculosis, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las infecciones por *Rickettsia* y la leishmaniosis. Un sistema de administración terapéutica de direccionamiento a APC tendrá importantes aplicaciones farmacéuticas. Los presentes inventores han creado una nanopartícula de péptido-dendrímero (PDD, por sus siglas en inglés) que se dirige a las moléculas de CMH de clase II (expresadas en macrófagos, células dendríticas y otras APC) de seres humanos y ratones de manera indiscriminada. La plataforma está adaptada para complejarse con cargas útiles como formulaciones farmacológicas incluyendo liposomas (por ejemplo, anfotericina B atrapada en liposomas), productos bioterapéuticos (por ejemplo, albúmina) o moléculas pequeñas (ARNbc), para acompañar a la carga útil sobre APC y transportarla a estas células. La plataforma tiene efectos inmunopotenciadores intrínsecos a través de su resto de migración dirigida y un determinante de Th CD4+ promiscuo que se une a las moléculas de CMH de clase II murinas, de ratas, monos y seres humanos expresadas en sus APC.

La anfotericina B es un agente eficaz contra la leishmaniosis, pero induce una nefrotoxicidad significativa. La complejación de la anfotericina B con liposomas (AmBisome<sup>®</sup>, también denominado en el presente documento "AmB") reduce la nefrotoxicidad y mejora la eficacia de AmB en el tratamiento de la leishmaniosis en seres humanos. Sin embargo, se requieren regímenes de dosificación complicados para minimizar los efectos secundarios. Se describen en el presente documento composiciones, kits, métodos y plataformas basados en nanopartículas para administrar agentes contra patógenos a las APC (incluidas APC profesionales (PAPC, por sus siglas en inglés)) *in vivo* que dan como resultado una respuesta inmunitaria robusta y específica a un patógeno, por ejemplo, *Leishmania major*. La composición, los kits, las plataformas y los métodos implican el uso combinado de péptidos de direccionamiento a CMH e inmunogénicos (por ejemplo, PADRE, HA) con dendrímeros (por ejemplo, dendrímeros poliméricos altamente ramificados cargados positivamente tales como PAMAM (poliamidoamina) y otros dendrímeros) como vehículos para la administración dirigida de agentes contra patógenos (por ejemplo, AmB) a las PAPC a través de moléculas de CMH de clase II expresadas en la superficie de tales células de tal manera que el agente contra patógenos se internaliza por las PAPC. Las composiciones y los nanoportadores típicos descritos en el presente documento incluyen un dendrímero polimérico cargado (por ejemplo, cargado positivamente) conjugado a un péptido de direccionamiento a CMH e inmunogénico, tal como un péptido de células T auxiliares universal (por ejemplo, un epítipo tal como el péptido de PADRE o HA de virus influenza), y al menos un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco tal como un fármaco contra patógenos, un fármaco contra patógenos acoplado a un liposoma, molécula pequeña, etc.). El péptido de células T auxiliares universal se conjuga a (por ejemplo, se une de manera covalente a) la superficie exterior del dendrímero de tal manera que el péptido de células T auxiliares universal se une específicamente a las PAPC, y el al menos un fármaco se encapsula mediante el dendrímero o se conjuga a (por ejemplo, se une de manera covalente a) el exterior del dendrímero. Una composición o un nanoportador de este tipo puede inducir una respuesta inmunitaria contra un patógeno (por ejemplo, un patógeno intracelular tal como *Leishmania*) cuando se administra a un sujeto.

Un sistema de nanoportador típico descrito en el presente documento tiene grupos amina cargados positivamente que forman complejos estables con la AmB cargada negativamente y acompaña a la AmB directamente a las células fagocíticas, *in vivo*. En una realización, los dendrímeros poliméricos altamente ramificados cargados (por ejemplo, cargados positivamente) conjugados a un péptido de células T auxiliares (por ejemplo, un epítipo tal como el péptido de PADRE o HA de virus influenza) proporcionan un tratamiento de un patógeno intracelular con mayor eficacia debido a una dosis reducida de agente contra patógenos (por ejemplo, AmB) en comparación con la(s) dosis usada(s) convencionalmente. La composición, los kits, las plataformas y los métodos descritos en el presente documento proporcionan una administración específica y eficiente de agentes contra patógenos (por ejemplo, fármacos tales como AmB) a las PAPC *in vivo* que da como resultado una reducción del crecimiento o la eliminación del patógeno que implica una respuesta inmunitaria robusta y específica frente al patógeno. Los nanoportadores descritos en el presente documento se dirigen a los fagocitos, transportan su cargamento hasta estas células, activan células T auxiliares CD4 y actúan como adyuvante para potenciar las respuestas inmunitarias.

Por consiguiente, se describe en el presente documento una composición que incluye al menos un dendrímero al que se ha conjugado al mismo al menos un resto de direccionamiento a CMH II (por ejemplo, un péptido de direccionamiento tal como un péptido de células T auxiliares universal) y al menos un fármaco u otro agente terapéutico, en la que el al menos un resto de direccionamiento a CMH II se conjuga a la superficie exterior del al menos un dendrímero de tal manera que el al menos un resto de direccionamiento a CMH II se une específicamente a las APC, y el al menos un fármaco se encapsula mediante el al menos un dendrímero o se conjuga a (por ejemplo, se une de manera covalente a) su superficie exterior. El resto de direccionamiento a CMH II, por ejemplo, péptido de direccionamiento, puede unirse de manera covalente al al menos un dendrímero. El al menos un fármaco puede incluir un liposoma. En esta realización, el liposoma puede unirse de manera no covalente al al menos un dendrímero. El al menos un fármaco es un agente contra patógenos, es decir, el al menos un fármaco es cualquier forma de formulación liposomal unilaminar de anfotericina B. En una realización, el agente contra patógenos es AmBisome<sup>®</sup> y está en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg (por ejemplo, para tratar una infección por *Leishmania* en un sujeto tal como un mamífero, la concentración de AmBisome<sup>®</sup> por dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg). La composición puede incluir además un portador farmacéuticamente aceptable. El al menos un resto de direccionamiento a CMH II puede ser un epítipo de células T auxiliares Pan-DR (PADRE), y el al menos un dendrímero puede ser un dendrímero de PAMAM. El agente contra patógenos es eficaz para reducir el crecimiento de o destruir un patógeno tal como, por ejemplo, *Leishmania*, paludismo, tuberculosis y virus de inmunodeficiencia humana (VIH). El al menos un fármaco puede encapsularse en un liposoma con una carga neta opuesta a la del al menos un dendrímero (por ejemplo, la carga del al menos un dendrímero es negativa y la carga neta del al menos un fármaco y el liposoma es positiva, o la carga del al menos un dendrímero es positiva y la carga neta del al menos un fármaco y el liposoma es negativa).

También se describe en el presente documento un método de administración de un fármaco u otro agente terapéutico específicamente a APC profesionales en un sujeto (por ejemplo, ser humano) que corre el riesgo de contraer o tener una infección por un patógeno intracelular (por ejemplo, *Leishmania*, paludismo, tuberculosis y VIH). El método incluye: administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición tal como se describe en el presente documento para inducir la activación mediada por CMH de clase II de células T auxiliares en el sujeto, e inhibir el crecimiento de o eliminar el patógeno intracelular, en el que administrar la composición al sujeto da como resultado la producción de anticuerpos monoclonales contra el patógeno intracelular. El al menos un fármaco es un agente

5 contra patógenos, es decir, cualquier forma de formulación liposomal unilaminar de anfotericina B. El agente contra patógenos puede ser AmBisome® y estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. La composición puede incluir además un portador farmacéuticamente aceptable. El al menos un resto de direccionamiento a CMH II (por ejemplo, un péptido de direccionamiento tal como un péptido de células T auxiliares universal) puede ser PADRE, y el al menos un dendrímero puede ser un dendrímero de PAMAM. En el método, la administración de la composición no da como resultado reacciones adversas locales en el sujeto, sino que da como resultado la internalización del fármaco u otro agente terapéutico por las APC profesionales. En algunas realizaciones, el fármaco es AmBisome® y al menos una pluralidad de las APC profesionales están infectadas con *Leishmania*, en el que la activación mediada por CMH de clase II de células T auxiliares es específica para *Leishmania*. La administración de la composición induce una producción aumentada de IFN- $\gamma$  en los esplenocitos del sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene al menos una lesión, y la administración de la composición da como resultado una reducción del tamaño de la al menos una lesión.

15 Además se describe en el presente documento un kit para tratar o prevenir la infección por un patógeno intracelular en un sujeto. El kit incluye: una composición tal como se describe en el presente documento; al menos un tampón; instrucciones de uso; y envase. La composición puede liofilizarse, y el al menos un tampón puede ser, por ejemplo, solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato u OptiMem. El al menos un fármaco u otro agente terapéutico puede ser un agente contra patógenos, por ejemplo, cualquier forma de formulación liposomal unilaminar de anfotericina B.

20 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

25 Tal como se usa en el presente documento, un “ácido nucleico” o una “molécula de ácido nucleico” significa una cadena de dos o más nucleótidos tales como ARN (ácido ribonucleico) y ADN (ácido desoxirribonucleico), y nucleótidos modificados químicamente. Una molécula de ácido nucleico “purificada” es aquella que está separada sustancialmente de otras secuencias de ácido nucleico en una célula o un organismo en el que el ácido nucleico se produce de manera natural (por ejemplo, libre al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 100% de contaminantes). Los términos incluyen, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico recombinante incorporada en un vector, un plásmido, un virus o un genoma de un procarionta o eucariota. Los ejemplos de ácidos nucleicos purificados incluyen ADNc, fragmentos de ácidos nucleicos genómicos, ácidos nucleicos producidos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ácidos nucleicos formados por el tratamiento con enzimas de restricción de ácidos nucleicos genómicos, ácidos nucleicos recombinantes y moléculas de ácido nucleico sintetizadas químicamente. Una molécula de ácido nucleico “recombinante” está una compuesta por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados si no, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante la manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos mediante técnicas de ingeniería genética.

35 Cuando se hace referencia a un residuo de aminoácido en un péptido, oligopéptido o una proteína, los términos “residuo de aminoácido”, “aminoácido” y “residuo” se usan de manera intercambiable y, tal como se usan en el presente documento, significan un aminoácido o mimético de aminoácido unido de manera covalente a al menos otro aminoácido o mimético de aminoácido a través de un enlace amida o mimético de enlace amida.

40 Tal como se usan en el presente documento, “proteína” y “polipéptido” se usan como sinónimos para significar cualquier cadena de aminoácidos con enlaces peptídicos, independientemente de la longitud o la modificación postraduccional, por ejemplo, glicosilación o fosforilación.

45 Cuando se hace referencia a una molécula de ácido nucleico, un polipéptido o patógeno infeccioso, el término “nativo” se refiere a un ácido nucleico, polipéptido o patógeno infeccioso que se produce de manera natural (por ejemplo, uno de tipo silvestre (WT, *wild-type*)).

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “antígeno” o “inmunógeno” significa una molécula que se reconoce específicamente por y se une a un anticuerpo.

55 Cuando se hace referencia a un epítipo (por ejemplo, epítipo de células T auxiliares), por actividad biológica quiere decirse la capacidad de unirse a una molécula de CMH apropiada y, en el caso de péptidos útiles para estimular respuestas de CTL, inducir una respuesta de células T auxiliares y una respuesta de CTL contra un antígeno o mimético de antígeno diana.

Los términos “unión específica” y “se une de manera específica” se refieren a la unión que se produce entre especies emparejadas como enzima/sustrato, receptor/agonista, anticuerpo/antígeno, etc., y que puede estar mediada por interacciones covalentes o no covalentes o una combinación de interacciones covalentes y no covalentes. Cuando la interacción de las dos especies produce un complejo unido de manera no covalente, la unión que se produce es normalmente electrostática, enlaces de hidrógeno o el resultado de interacciones lipófilas. Por consiguiente, se produce “unión específica” entre una especie emparejada cuando hay una interacción entre las dos que produce un complejo unido que tiene las características de una interacción anticuerpo/antígeno o enzima/sustrato. En particular, la unión específica se caracteriza por la unión de un miembro de un par a una especie particular y a ninguna otra especie dentro de la familia de compuestos a la que pertenece el miembro

correspondiente del miembro de unión.

5 Tal como se usan en el presente documento, los términos “epítipo Pan-DR”, “epítipo de células T auxiliares Pan DR”, “epítipo de unión Pan-HLA-DR”, “PADRE” y “péptidos de PADRE” significan un péptido de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 20 residuos que puede unirse a al menos aproximadamente 7 de los 12 alelos DR más comunes (DR1, 2w2b, 2w2a, 3, 4w4, 4w14, 5, 7, 52a, 52b, 52c y 53) con alta afinidad. “Alta afinidad” se define en el presente documento como la unión con una  $Cl_{50}\%$  de menos de 200 nM. Por ejemplo, la unión de alta afinidad incluye la unión con una  $Cl_{50}\%$  de menos de 3100 nM. Para la unión a CMH de clase II, un umbral de afinidad de unión de 1.000 nM es típico, y una afinidad de unión de menos de 100 nM se considera generalmente unión de alta afinidad. La construcción y el uso de péptidos de PADRE se describen con detalle en la patente estadounidense n.º 5.736.142 que se incorpora como referencia al presente documento.

10 Un “péptido de células T auxiliares” tal como se usa en el presente documento se refiere a un péptido reconocido por el receptor de células T de las células T auxiliares. Por ejemplo, los péptidos de PADRE descritos en el presente documento son péptidos de células T auxiliares.

15 Tal como se usan en el presente documento, los términos “CMH de clase II” y “CMH II” significan complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. En seres humanos, el CMH de clase II también se llama “HLA-DR”.

Por los términos “péptido de direccionamiento a CMH II” y “péptido de direccionamiento a CMH de clase II” quiere decirse cualquier péptido que se une a una molécula de CMH de clase II o dominio de la misma.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “dendrímico” significa una macromolécula o un polímero sustancialmente esférico o sustancialmente lineal cargada (por ejemplo, cargado positivamente, cargado negativamente) que oscila entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 50 nm de tamaño que puede acoplarse a un resto que puede unirse a CMH II, por ejemplo, un péptido de direccionamiento a CMH II tal como un péptido de células T auxiliares universal, CLIP, etc. Un ejemplo de un dendrímico es una macromolécula polimérica altamente ramificada cargada con forma aproximadamente esférica. Tal dendrímico puede ser, por ejemplo, un dendrímico de PAMAM polimérico altamente ramificado y cargado positivamente. En una realización específica, un dendrímico es una macromolécula altamente ramificada que se extiende desde un núcleo central y que contiene una serie de capas, distintas a nivel estructural y sintético, que se denominan habitualmente ‘generaciones’.

25 Cuando se hace referencia a un dendrímico, por la expresión “altamente ramificado” quiere decirse un polímero con arquitectura ramificada con un alto número de grupos funcionales.

30 Por los términos “dendrímico de PAMAM” y “dendrímico de poliamidoamina” quiere decirse un tipo de dendrímico en el que están ubicadas aminas terciarias en puntos de ramificación y las conexiones entre las capas estructurales se realizan mediante grupos funcionales de amida. Los dendrímicos de PAMAM presentan muchas cargas positivas en sus superficies. PAMAM con muchos grupos de superficie diferentes, por ejemplo, amidoetanol, midoiletanolamina, amino, ácido succinámico, hexilamida, etc., están disponibles comercialmente.

35 Por el término “dendrímico derivatizado” quiere decirse un dendrímico que tiene uno o más grupos funcionales conjugados a su superficie. Un “PDD” es un dendrímico derivatizado con péptido.

Un “dendrímico derivatizado con PADRE” o “PADRE-dendrímico” es un nanoconstructo (por ejemplo, nanoportador, nanovehículo) en el que uno o más péptidos de PADRE se unen de manera covalente a los grupos funcionales en la superficie de un dendrímico (por ejemplo, un dendrímico de PAMAM).

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “célula presentadora de antígeno profesional” significa células que presentan antígenos foráneos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en sus superficies e incluye células dendríticas, macrófagos, monocitos y células B.

45 Por el término “conjugado” quiere decirse cuando una molécula o un agente se acopla o adhiere física o químicamente a otra molécula o agente. Los ejemplos de conjugación incluyen unión covalente (por ejemplo, fármaco unido de manera covalente u otra molécula pequeña) y complejación electrostática. Los términos “complejado”, “complejado con” y “conjugado” se usan de manera intercambiable en el presente documento.

50 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “identidad de secuencia” significa el porcentaje de subunidades idénticas en las posiciones correspondientes en dos secuencias (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico, secuencias de aminoácidos) cuando las dos secuencias se alinean para maximizar la coincidencia de subunidades, es decir, teniendo en cuenta huecos e inserciones. La identidad de secuencia puede medirse usando un software de análisis de secuencias (por ejemplo, el paquete de software de análisis de secuencias de Accelrys CGC, San Diego, CA).

Las expresiones “aislado” o “biológicamente puro” se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que lo acompañan normalmente tal como se encuentra en su estado nativo.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “nanopartícula”, “nanovehículo” y “nanoportador”

significan una partícula microscópica cuyo tamaño se mide en nanómetros. Por ejemplo, una nanopartícula, un nanovehículo o nanoportador es un conjugado PADRE-dendrímico (por ejemplo, PDD) o una partícula que combina varios conjugados PADRE-dendrímico con un diámetro total en el intervalo de aproximadamente 2-500 nm.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “carga neta” significa la suma de las cargas eléctricas de las partículas o los compuestos (por ejemplo, fármacos, liposomas o dendrímeros) en un pH fisiológico.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “agente terapéutico” pretende abarcar cualquier molécula, entidad química, composición, fármaco o agente biológico que pueda prevenir o reducir el crecimiento de un patógeno, o que pueda bloquear la capacidad de un patógeno para provocar enfermedad. Un ejemplo de un agente terapéutico es un fármaco (por ejemplo, cualquier tipo de formulación de anfotericina B), que incluye un fármaco conjugado a o encapsulado por un vehículo tal como un liposoma. Un ejemplo de tal fármaco es la anfotericina B liposomal, por ejemplo, AmBisome®. El término “agente terapéutico” incluye moléculas pequeñas, reactivos antisentido, ácidos nucleicos, reactivos de ARNip, anticuerpos, enzimas, polipéptidos, péptidos, moléculas orgánicas o inorgánicas, compuestos naturales o sintéticos y similares.

15 El término “anticuerpo” pretende incluir anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (AcM), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) contra anticuerpos que pueden marcarse en forma soluble o unida, así como fragmentos, regiones o derivados de los mismos, proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como pero sin limitarse a, técnicas de escisión enzimática, síntesis peptídica o recombinantes.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “adyuvante” significa cualquier material o sustancia que potencia la respuesta inmunitaria humoral y/o celular.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “presentado” o “expuesto en la superficie” se consideran sinónimos y se refieren a antígenos u otras moléculas que están presentes (por ejemplo, accesibles para el reconocimiento de sitio inmunitario) en la superficie externa de una estructura tal como una nanopartícula o un nanoportador (por ejemplo, PADRE-dendrímico, HA-dendrímico, etc.).

25 La expresión “forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*” tal como se usa en el presente documento significa una forma de la sustancia que va a administrarse en la que cualquier efecto tóxico se ve compensado por los efectos terapéuticos. Las sustancias pueden administrarse a cualquier sujeto, por ejemplo, seres humanos.

30 Por la expresión “respuesta inmunitaria” quiere decirse la inducción de respuestas mediadas por células inmunitarias y/o anticuerpos específicas contra un antígeno, antígenos, patógeno, agente patógeno, etc. Una respuesta inmunitaria tiene muchas facetas, algunas de las cuales las presentan las células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y células plasmáticas). Las células del sistema inmunitario pueden participar en la respuesta inmunitaria a través de la interacción con un antígeno o patógeno u otras células del sistema inmunitario, la liberación de citocinas y la reactividad con esas citocinas. Las respuestas inmunitarias se dividen generalmente en dos categorías principales: humorales y mediadas por células. La componente humoral de la respuesta inmunitaria incluye la producción de anticuerpos específicos para un antígeno o patógeno. La componente mediada por células incluye la generación de hipersensibilidad de tipo retardado y células efectoras citotóxicas contra el antígeno o patógeno. Una respuesta inmunitaria puede incluir, por ejemplo, la activación de una respuesta de células T auxiliares CD4.

40 Por las expresiones “cantidad terapéuticamente eficaz” y “dosificación eficaz” quiere decirse una cantidad suficiente para producir un resultado terapéuticamente (por ejemplo, clínicamente) deseable; la naturaleza exacta del resultado variará dependiendo de la naturaleza del trastorno que esté tratándose. Por ejemplo, cuando el trastorno que ha de tratarse es una infección por patógenos, el resultado puede ser la eliminación del patógeno, una reducción del crecimiento del patógeno, una reducción del tamaño o la eliminación de una lesión asociada con el patógeno, etc.

45 Las composiciones y los nanoportadores descritos en el presente documento pueden administrarse desde una o más veces al día hasta una o más veces a la semana. El experto en la técnica apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación y los momentos necesarios para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo pero sin limitarse a, la gravedad de la enfermedad o el trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones y los nanoportadores descritos en el presente documento puede incluir un tratamiento

50 único o una serie de tratamientos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico descrito en el presente documento, o identificado mediante un método descrito en el presente documento, a un paciente, o la aplicación o administración del agente terapéutico a un tejido o una línea celular aislados de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición a una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, paliar, alterar, remediar, mejorar, mitigar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición a la enfermedad.

55

Los términos “paciente” “sujeto” e “individuo” se usan de manera intercambiable en el presente documento, y

significan un animal que va a tratarse, incluidos vertebrados e invertebrados. Normalmente, un sujeto es un ser humano. En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento encuentran uso en animales de experimentación, en aplicaciones veterinarias (por ejemplo, equinos, bovinos, ovinos, caninos, felinos, aves, etc.), y en el desarrollo de modelos animales para enfermedades, incluyendo pero sin limitarse a, roedores, incluidos ratones, ratas y hámsteres, así como primates no humanos.

Aunque pueden usarse composiciones, kits, plataformas y métodos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente invención, se describen a continuación composiciones, kits, plataformas y métodos adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Las realizaciones particulares comentadas a continuación son sólo ilustrativas y no pretenden ser limitativas.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema que demuestra la síntesis del PADRE-dendrímico. Se unen entre sí mediante una reacción de acoplamiento de amida. En promedio, según la espectrometría de masas, se unen aproximadamente dos péptidos de migración dirigida a CMH de clase II por dendrímico. Una vez que se produce la nanopartícula, puede complejarse con un agente terapéutico tal como un producto bioterapéutico, un fármaco (por ejemplo, anfotericina B liposomal o AmBisome®), molécula pequeña, etc. Después de que se produzca este complejo y se inyecte, el marcador de migración dirigida a APC se encontrará con el receptor de CMH de clase II y se unen al mismo.

La figura 2 es un esquema que ilustra una nanopartícula para fármacos de migración dirigida a fagocitos mononucleares. Los macrófagos expresan CMH de clase II y son el reservorios para parásitos de *Leishmania*. Esta figura representa una plataforma de nanoportador que porta fármacos que se dirige a las células que expresan CMH de clase II. Los macrófagos, monocitos y DC son el reservorio de parásitos de *Leishmania* y expresan CMH de clase II, una molécula a la que se dirigen los nanoportadores de PDD tal como se describe en el presente documento. Los dendrímeros peptídicos son una plataforma para la migración dirigida de células AmB que expresan CMH de clase II (PAPC). Los péptidos con alta afinidad se unen específicamente a los macrófagos y se unen de manera covalente al dendrímico; la plataforma está cargada positivamente y forma un complejo fuerte con AmB cargado negativamente dirigiéndolo a fagocitos/células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) CMH de clase II\*. Un péptido de migración dirigida es un epítipo de células T auxiliares universal que se une al flanco del CMH de clase II expresado en todas las APC.

La figura 3 es una sección de TEM que muestra partículas de PDD que producen un complejo y cubren AmB. AmB se mezcló con PDD a una razón en peso de 1:10. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para la formación. Se colocó una gota de la muestra en una rejilla de cobre de 200 de malla recubierta con carbono y nitrocelulosa y se dejó secar al aire. Las rejillas se examinaron luego con varios aumentos de hasta 245.000X en un TEM Philips CM-10. Se tomaron imágenes de cada preparación usando una cámara digital Gatan.

La figura 4 muestra la administración dirigida de fármacos *in vitro* e *in vivo* a macrófagos, monocitos y bazo. A. Los macrófagos peritoneales se recogieron 12 horas tras las inyecciones i.p. y se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia. Cinco días antes del experimento, los ratones habían recibido inyecciones i.p. de tioglicolato estéril tal como se describe en los materiales y métodos del ejemplo 1. B. Después de 90 minutos de cocultivo de monocitos purificados humanos con o bien PDD/ARNip-FITC o bien ARNip-FITC, las células se examinaron mediante FACS. El panel C muestra la prueba de direccionamiento al bazo *in vivo*. Imágenes de IVIS de bazos extirpados de ratones una hora tras inyecciones s.c. de AL4 solo o complejo PDD/AL4, la imagen se tomó 1 hora tras las inyecciones tal como se representa. Las inyecciones se realizaron en el flanco opuesto del sitio anatómico del bazo.

La figura 5 muestra evidencia de que la plataforma de nanoportador que se dirige a las células que expresan CMH de clase II tal como se describe en el presente documento, se dirige específicamente y transporta el cargamento a las DC en los ganglios linfáticos de drenaje en el huésped e *in vitro*. 5A. Un plásmido de ADN que albergaba GFP se mezcló con el PDD en una razón en peso de 1:7. Después de incubación durante 20 min a temperatura ambiente, se inyectó complejo plásmido de GFP/PDD en el flanco izquierdo de ratones C57BL por vía subcutánea. Cinco días después de la inyección, los ganglios linfáticos de drenaje y control se recogieron/enmallaron y se sometieron a ensayo/analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de GFP en DC tal como se describe en los materiales y métodos del ejemplo 1. 5B. Microscopía confocal que indica la presencia de carga útil en el interior de las células. Albúmina-FITC se mezcló con PDD o con un dendrímico de control acoplado a péptidos al azar en una razón en peso de 1:10. Después de incubación durante 20 min a temperatura ambiente, se obtuvieron imágenes confocales a intervalos de 50 nm. Los cortes de 0,5 micrómetros a través de los macrófagos determinaron que PDD/Alb-FITC a 10:1, se transportaron a la célula. Se muestran las secciones z31 y z39.

La figura 6 es una tinción de Giemsa de macrófagos peritoneales enriquecidos en ratones. Las poblaciones enriquecidas en macrófagos se prepararon mediante inyección i.p. de tioglicolato tal como se describe en los materiales y métodos del ejemplo 1. Células enriquecidas en macrófagos murinos purificadas aisladas de la cavidad peritoneal y su tratamiento con PDD/AmBisome®. Tinción con Giemsa de peritoneales enriquecidos de ratones antes del tratamiento con AmB (panel inferior izquierdo) o después (panel inferior derecho). Las poblaciones enriquecidas

en macrófagos se prepararon tal como se describe en los materiales y métodos del ejemplo 1. El panel superior muestra los macrófagos peritoneales tras una incubación de 30 minutos con PDD/AmB; los macrófagos se tiñeron tras una citocentrifugación.

- 5 La figura 7 muestra que PDD mejora la captación de AmB por los macrófagos. A. La administración de AmB en macrófagos después de 10 ó 120 min. Coincubación *in vitro* con o sin PDD. Administración *in vitro* de AmB en macrófagos tras o bien 10 min o bien 120 min *in vitro* de coincubación *in vitro* con PDD/AL4 o un dendrímero de control, G5/AL4. B. La administración *in vitro* de AmB se evaluó 2 horas después de la inyección i.p. de AmB con o sin PDD mediante tinción por citometría de flujo de macrófagos aislados de la cavidad peritoneal. C. Aumento de la captación de AmB mediada por PDD, *in vitro* e *in vivo*.
- 10 La figura 8 es un gráfico que muestra la línea base de la eficacia de las dosis de AmB sobre leishmaniosis cutánea en ratones BALB/c. Los ratones (en grupos de 10) recibieron un millón de parásitos de *L. major*. Los tratamientos compararon diferentes dosis de AmB durante 10 días por vía i.p. cuando los tamaños de lesión estaban entre 20 y 70 mm<sup>2</sup> administraciones.
- 15 La figura 9 es un gráfico que muestra la efectividad desde el día 7 tras la terapia. La complejación de AmB con PDD da como resultado un efecto acelerado de AmB a 1/5 de la dosis. Se muestra la rápida acción/cinética de AmB/PDD. Los tratamientos se iniciaron en el día 53 tras la infección. Los tamaños de lesión se muestran el día 7 tras el tratamiento.
- 20 La figura 10 es un gráfico que muestra los tamaños de lesión en los días 0, 12 y 21 tras la terapia. Los ratones BALB/c con lesiones cutáneas de leishmaniosis o bien no se trataron (ninguno) o bien se trataron durante 10 días con AmB (6,25 mg/kg/día), AmB (37,5 mg/kg/día) o AmB/DRHA (AmB en complejo: 6,25 mg/kg/día). Los ratones en un número de 5 por grupo recibieron diferentes tratamientos y se muestran el promedio  $\pm$  D.E. de las áreas de lesión (mm<sup>2</sup>).
- 25 La figura 11 muestra los efectos inmunopotenciadores intrínsecos de PDD1 y PDD. A y B: se muestran ganglios linfáticos de drenaje y bazos de ratones C57BL y BALB/c que recibieron inyecciones i.p. de PDD1/AmB o péptido reordenado (al azar)-dendrímero complejo con AmB sola. Se muestra un aumento de tamaño transitorio de los ganglios linfáticos de drenaje y bazos de ratones que reciben PPD/AmB. C: Los ratones en grupos de cinco o bien no recibieron inyecciones o bien recibieron inyecciones de PDD1/AmB o AmB tal como se describe. Se aislaron esplenocitos de ratones que no se trataron, o se trataron con AmB con o sin PDD1. Los esplenocitos se cocultivaron con plásmidos que albergaban antígenos de *L. major* complejados con PDD1. Se midió IFN $\gamma$  en el sobrenadante
- 30 después de 48 horas. El panel D muestra la expresión aumentada de CMH de clase II, un signo de activación de respuestas inmunitarias, en ratones que recibieron PDD/AmB y no en aquellos que recibieron el dendrímero de control más AmB.
- La figura 12 muestra resultados de un análisis por RMN de los dos lotes de PDD en comparación con el dendrímero solo que muestran la sistematicidad en el proceso/productos de conjugación.
- 35 La figura 13 muestra los resultados de un análisis que compara PDD, AmB y PDD/AMB, lo que sugiere que este último puede ser una mezcla de PDD y AmB.
- La figura 14 es una tabla que enumera fármacos basados en liposomas en el mercado.
- La figura 15 es una tabla que enumera fármacos basados en liposomas en ensayos clínicos.
- 40 La figura 16 es una serie de imágenes y un gráfico que muestra caracterizaciones de complejación PDD/LAmB. La figura 16A muestra la imagen de TEM de un complejo PDD/LAmB. Múltiples partículas de PDD se complejan con un LAmB. La figura 16B muestra los diámetros promedio de PDD, LAmB o complejos PDD/LAmB usando DLS.
- 45 La figura 17 es una imagen y un par de gráficos que muestran el direccionamiento a APC y el efecto *in vivo* de PDD/LAmB sobre toxicidad de LAmB. 17A resume los resultados de un análisis por citometría de flujo de macrófagos peritoneales residentes aislados tras inyecciones interaperitoneales de LAmB-Rh, PDD/LAmB-Rh o controles. El direccionamiento *in vivo* de macrófagos evaluado mediante análisis por citometría de flujo mostró que el porcentaje de macrófagos positivos para Rh suministrados por PDD/LAmB-Rh es significativamente ( $p < 0,001$ ) mayor (%30  $\pm$  5%) que el suministrado por LAmB-Rh o por ScrDR/LAmB (%7  $\pm$  3,7%). 17B muestra la imagen confocal de los macrófagos peritoneales (Z-6 de una serie de 20 imágenes de fluorescencia donde Z era 1  $\mu$ m) demostrando que el LAmB-Rh se capta por los macrófagos. 17C muestra la toxicidad *in vitro* de L-AmB y PDD/L-AmB en células HepG2. Se añadió L-AmB con y sin PDD a 1 microgramo por ml de células HepG2 en el cultivo y se realizó el ensayo MTT tal como se comenta en los materiales y métodos. Se muestran los porcentajes promedio de células muertas de 3 experimentos independientes. La toxicidad de las células L-AmB en las células HepG2 estuvo revertida por PDD ( $p < 0,007$ ).
- 50 La figura 18 es un par de gráficos que muestran que PDD reduce la dosis eficaz de LAmB y acelera su eficacia. 18A muestra los efectos de diferentes dosis y formulación de LAmB sobre leishmaniosis cutánea tal como se evalúa mediante el área de lesión. Ratones que portaban lesiones cutáneas por *L. major* de tamaño similar recibieron LAmB

a dosis completa o LAmB a una dosis baja (6,25 mg/K/día) o bien sola, encapsulada en una nanopartícula de control (ScrDR) o bien en PDD1. Los efectos terapéuticos de la dosis baja de PDD1/LAmB (6,25 mg/k/día durante 10 días) se aceleran (\*) en comparación con la dosis completa (37,5 mg/k/día durante 10 días) línea de puntos). Figura 18B, se obtuvieron datos similares usando LAmB injertada con PDD2 que muestra un efecto significativamente más

5 rápido sobre la reducción de áreas de lesión. 18B muestra la carga cuantitativa de parásitos en el bazo 12 días después de los tratamientos. Se realizó QPCR con el ADN obtenido a partir de cantidades conocidas de las muestras de bazo de ratones que se han tratados con LAmB (dosis completa), PDD/LAmB (dosis baja) o el grupo tratado con PBS. Los datos se muestran como el porcentaje de inhibición de la carga parasitaria en bazos de ratones.

10 La figura 19 es un par de fotografías y un par de gráficos que muestran los efectos inmunopotenciadores de PDD en el huésped infectado. 19A y 19B muestran la linfadenopatía transitoria (aumento de tamaño de los ganglios linfáticos de drenaje y el bazo) de ratones infectados que recibieron PDD/LAmB frente a controles. 19C muestra la expresión aumentada de CMH de clase II en las células de los ganglios linfáticos de drenaje de ratones infectados tratados con PDD/LAmB en comparación con los tratamientos de control. 19D. Los ratones con lesiones por *L. major* recibieron

15 tratamientos i.p. de PDD/LAmB (dosis baja), ScrDR/LAmB (dosis baja) o L-AmB (dosis completa) durante 10 días. Los esplenocitos de ratones individuales se aislaron y se colocaron a  $1 \times 10^6$  células/pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Los esplenocitos de los animales tratados se estimularon o bien con a) HA-dendrímero (40  $\mu$ g) complejo con un conjunto de plásmidos (4  $\mu$ g) que codifican para antígenos de *L. major*, o bien con b) HADR (40  $\mu$ g) complejo con pVAX vacío (4  $\mu$ g), que sirvió como fondo y se dedujo de los datos de "a". Se realizaron mediciones de IFNg en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos después de una incubación durante 48 horas a

20 37°C en aire con el 5% de CO<sub>2</sub>, tal como se describe en los métodos. La terapia con dosis bajas de LAmB potencia significativamente el IFNg inducido por células T específicas de antígeno en comparación con la dosis completa de LAmB, en el huésped infectado ( $p < 0,001$ ).

La figura 20 es una micrografía y un par de gráficos que muestran el marcaje fluorescente de LAmB y el direccionamiento *in vivo*. La figura 20A muestra LAmB encapsulada en rodamina B (LAmB-Rh). Tal como se describe en la sección de materiales y métodos, para marcar con fluorescencia L-AmB, se encapsuló rodamina B en

25 L-AmB.

La figura 21 es un gráfico que muestra que los resultados de PDD2 reducen la dosis eficaz y aceleran la cinética de los efectos terapéuticos de los tratamientos. Esta es una configuración de experimento similar a la descrita para la figura 16 con la excepción de que se usó un segundo PDD (PDD2). Tal como se observó para PDD1/LAmB, LAmB injertada con PDD2 redujo la dosis eficaz de LAmB y dio como resultado un efecto significativamente más rápido sobre la reducción de las áreas de lesión. PDD2 se compone de un péptido auxiliar de HA (como el ligando de APC) acoplado a un dendrímero de PAMAM.

30

### Descripción detallada

35 En el presente documento se describen composiciones, kits, plataformas y métodos basados en nanopartículas o nanoportadores para la administración eficaz de un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco) *in vivo* a PAPC o células positivas para CMH de clase II, incluidas las células infectadas con un patógeno intracelular (por ejemplo, *Leishmania*, paludismo, *Mycobacterium tuberculosis*, VIH, etc.). En el presente documento se describe una plataforma de administración dirigida que ofrece administración dirigida de fármacos a los fagocitos, reduciendo la

40 toxicidad, la dosis, potenciando la eficacia de los fármacos así como la rapidez de acción. En una composición típica, un dendrímero polimérico altamente ramificado cargado (por ejemplo, cargado positivamente) se conjuga a 1) un resto de direccionamiento a CMH (por ejemplo, un péptido de direccionamiento e inmunogénico tal como un péptido de células T auxiliares (por ejemplo, un epítipo tal como el péptido de PADRE o HA de virus influenza, etc.)) para inducir una respuesta inmunitaria frente a un patógeno particular en un sujeto y 2) con al menos un agente

45 contra patógenos para la administración del agente contra patógenos (por ejemplo, fármaco) en PAPC en el sujeto. En otra composición, el agente contra patógenos se conjuga al péptido de direccionamiento a CMH e inmunogénico en lugar de con el dendrímero polimérico altamente ramificado cargado. En general, el fármaco, otro agente terapéutico y/o cargamento se encapsula en liposomas con una carga neta opuesta a la del dendrímero. Por ejemplo, la carga del dendrímero puede ser negativa y la carga del fármaco liposomal, otro agente terapéutico y/o

50 cargamento puede ser positiva. En otro ejemplo, la carga del dendrímero puede ser positiva y la carga del fármaco liposomal, otro agente terapéutico y/o cargamento puede ser negativa. Los fármacos, otros agentes terapéuticos y/o cargamentos pueden ser aquellos que tienen cargas opuestas a un PDD y, por tanto, se complejan con el PDD, o pueden ser aquellos encapsulados en liposomas que tienen una carga opuesta a un PDD y, por tanto, se complejan con el PDD. En algunas realizaciones, el agente contra patógenos puede encapsularse por el dendrímero polimérico

55 altamente ramificado cargado. El dendrímero forma un complejo (conjugación) con un agente terapéutico basado en la carga opuesta del dendrímero (por ejemplo, positiva) y la del agente terapéutico (por ejemplo, negativa) o la conjugación puede ser un enlace químico covalente. Por ejemplo, las moléculas pequeñas y los fármacos (que pueden ser moléculas pequeñas) pueden unirse de manera covalente al dendrímero. La administración dirigida de un fármaco a las PAPC tal como se describe en el presente documento ofrece una solución a los desafíos asociados

60 con las estrategias actuales para tratar la infección por un patógeno intracelular tal como *Leishmania*, dando como resultado respuestas inmunitarias mucho más robustas e impidiendo la toxicidad al reducir la dosis del agente contra patógenos (por ejemplo, Amb). Un sistema de nanoportador típico tal como se describe en el presente documento

- tiene grupos amina cargados positivamente que forman complejos estables con la AmB cargada negativamente y acompaña al AmB directamente a las PAPC (por ejemplo, células fagocíticas) *in vivo*. Por ejemplo, en los experimentos descritos en el presente documento, la anfotericina B, que tiene una carga neutra y no forma un complejo con un PDD cargado positivamente, se encapsuló en un liposoma cargado negativamente, que luego se complejó con PDD cargado positivamente. Por tanto, los fármacos, otros agentes terapéuticos y/o cargamentos pueden estar cargados negativamente o puede hacerse que estén cargados negativamente al menos parcialmente, o pueden injertarse en liposomas (u otros portadores) cargados negativamente para formar complejos con PDD. Sin embargo, también abarca la invención los dendrímeros cargados negativamente complejados con fármacos u otros agentes terapéuticos cargados positivamente (o portadores cargados positivamente).
- Las realizaciones preferidas descritas a continuación ilustran adaptaciones de estas composiciones, kits, plataformas y métodos. No obstante, a partir de la descripción de estas realizaciones, pueden implementarse y/o ponerse en práctica otros aspectos de la invención basándose en la descripción proporcionada a continuación.

#### Métodos biológicos

- Se describen en el presente documento métodos que implican técnicas de biología molecular convencionales. Tales técnicas se conocen generalmente en la técnica y se describen con detalle en tratados metodológicos tales como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; y *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas). Las técnicas de inmunología se conocen generalmente en la técnica y se describen con detalle en tratados metodológicos tales como *Advances in Immunology*, volumen 93, ed. Frederick W. Alt, Academic Press, Burlington, MA, 2007; *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, eds. Gary C. Howard y Matthew R. Kaser, CRC Press, Boca Raton, FL, 2006; *Medical Immunology*, 6ª ed., editado por Gabriel Virella, Informa Healthcare Press, Londres, Inglaterra, 2007; y Harlow and Lane *ANTIBODIES: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988. También se describen la construcción y el uso de dendrímeros de PAMAM, por ejemplo, en Arashkia *et al.*, *Virus Genes* 40 (1): 44-52, 2010; Velders *et al.*, *J Immunol.* 166:5366-5373, 2001; y S. Chauhan, N. K. Jain, P. V. Diwan. (2009) Pre-clinical and behavioural toxicity profile of PAMAM dendrimers in mice. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* (fecha de publicación en línea: 3 de diciembre, 2009).

#### Plataforma para el direccionamiento de fármacos a PAPC

- Los dendrímeros son un candidato ideal para la administración de fármacos/ácidos multinucleicos, puesto que proporcionan un control estructural sobre el tamaño y la forma (espacio de cargamento), son biocompatibles (no tóxicos y no inmunogénicos), tienen propiedades de andamiaje precisas, tienen una funcionalidad modificable en superficie bien definida para grupos de direccionamiento específicos, tienen la capacidad de adhesión celular y endocitosis y administración en el citoplasma o núcleo, tienen una biodegradación aceptable (la capacidad de degradarse de manera segura dentro del organismo) y están asociados con una síntesis fácil y reproducible de manera sistemática (grado clínico). Se describen en el presente documento composiciones y plataformas novedosas basadas en dendrímeros que cuando se complejan con un agente terapéutico, tal como un fármaco de interés, dirigen el agente terapéutico (por ejemplo, Fármaco) principalmente a células fagocíticas a través de moléculas de CMH de clase II expresadas en la superficie de tales células. Estas composiciones y plataformas incluyen, por ejemplo, el uso combinado de un dendrímero de PAMAM catiónico (por ejemplo, dendrímero derivatizado con péptido de PAMAM G5 o cualquier polímero), y uno o más péptidos de direccionamiento a CMH de clase II (por ejemplo, PADRE o cualquier epítipo de células T auxiliares universal). Esto es importante para la administración de fármacos en macrófagos, monocitos y células dendríticas y cuando los fármacos son contra parásitos/patógenos intracelulares obligatorios, tales como *Leishmania*, paludismo, VIH o *Mycobacterium tuberculosis*. Un fármaco (agente terapéutico) puede complejarse con el dendrímero-PADRE mediante incubación a temperatura ambiente o puede acoplarse mediante conjugación directa de fármaco(s) a la plataforma, por ejemplo, dendrímero-PADRE. Alternativamente, el fármaco también puede acoplarse al PADRE u otros epítopos de células T auxiliares universales. En algunas realizaciones, el fármaco se encapsula mediante el dendrímero-PADRE.

- Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, entre otros, fármacos, toxinas, ARNi, ARNip, microARN, anticuerpos, polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos, citocinas, enzimas, hormonas, factores de coagulación, productos inmunoterapéuticos, incluidas vacunas (anticuerpos monoclonales humanizados) o cualquier combinación de tales agentes. Los ejemplos de fármacos incluyen AmBisome<sup>®</sup>, anfotericina B, Taxol<sup>®</sup> (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb), melfalán, prednisona, talidomida (MPT), Velcade<sup>®</sup> (bortezomib) (Millenium Pharmaceuticals), lenalidomida, dexametasona, fármacos que se dirigen a patógenos intracelulares incluyendo clofazimina, amoxicilina más ácido clavulónico, estreptomina o capreomicina, nevirapina, zidovudina, lamivudina, ritonavir y lopinavir. Como es el caso con AmB, un fármaco u otro agente terapéutico puede formar complejos con un liposoma u otro tipo de vesícula. Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse con adyuvantes tales como (pero sin limitarse a) poli I:C que está cargado negativamente y forma un complejo con una plataforma de nanopartículas tal como se describe en el presente documento.

- En una realización típica de administración de un agente contra patógenos a las PAPC, se usa un fármaco comercializado aprobado envuelto en liposomas. Por ejemplo, AmBisome<sup>®</sup> es una anfotericina B liposomal en la que

la anfotericina B está envuelta en un liposoma de monocapa de DSPG de 60-70 nm de diámetro y muestra una mayor DL<sub>50</sub> y un mejor perfil de seguridad que la anfotericina B convencional. AmB contiene fosfatidilcolina de soja hidrogenada, vitamina E, colesterol y diestearoilfosfatidilglicerol. La carga negativa neta de la superficie externa de AmB aumenta la afinidad por las células fúngicas y de mamíferos. El liposoma es útil para prevenir la liberación del fármaco y limitar la interacción fuera de la diana de la anfotericina B. El colesterol en la plataforma aumenta la estabilidad del fármaco. Los métodos de preparación y uso de liposomas y otros nanoportadores se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Nanoparticles for Drug Delivery Applications: Imaging, Targeting, and Delivery* (Nanostructure Science and Technology), Sonke Svenson & Robert K. Prud'homme, editores, Springer, edición de 2012; Beija *et al.*, *Trends Biotechnol.* 4 de junio de 2012; Parveen *et al.*, *Nanomedicine.* Feb.;8(2):147-66, 2012; y Puri *et al.*, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 26(6):523-80, 2009.

Las células dendríticas y los macrófagos son las principales PAPC que son fundamentales en la preparación de respuestas inmunitarias protectoras contra el cáncer y los muchos parásitos, bacterias y virus. También dictan las terapias tolerogénicas para trastornos autoinmunitarios, incluida la diabetes. Las células B también tienen la capacidad de presentar antígenos y un patógeno típico que infecta las células B humanas es el VEB. Los ejemplos de patógenos que pueden tratarse usando las composiciones, los métodos, kits y las plataformas descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, organismos patógenos parasitarios, bacterianos, fúngicos o virales. Los ejemplos incluyen:

Especies de <i>Leishmania</i> (por ejemplo, <i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i> syn. <i>L. chagas</i> ),
Especies de <i>Streptococcus</i> ,
especies de <i>Candida</i> ,
especies de <i>Brucella</i> ,
especies de <i>Salmonella</i> ,
especies de <i>Shigella</i> ,
especies de <i>Pseudomonas</i> ,
especies de <i>Bordetella</i> ,
Especies de <i>Clostridium</i> ,
virus de Norwalk,
<i>Bacillus anthracis</i> ,
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ,
virus de inmunodeficiencia humana (VIH)
especies de <i>Chlamydia</i> ,
virus del papiloma humano,
virus influenza,
especies de paramixovirus
herpesvirus,
citomegalovirus,
virus de la varicela-zóster,
virus de Epstein Barr,
virus de la hepatitis,
especies de <i>Plasmodium</i> (por ejemplo, <i>Plasmodium(p) falciparum</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. vivax</i> y <i>P. knowlesi</i> ),

En una realización, el resto que puede unirse a CMH de clase II es un epítipo Pan-DR, por ejemplo, PADRE. PADRE es un péptido diseñado artificialmente que se une a la mayoría de las moléculas de CMH de clase II murinas y humanas, y conjugando péptidos de PADRE a dendrímeros (por ejemplo, un dendrímero derivatizado con PADRE) hace que el complejo resultante o conjugado sea un ligando para PAPC que expresan altos niveles de CMH de clase II. PADRE es un epítipo de células T auxiliares no natural, sintético [AKchxAVAAWTLKAAA (chxA = ciclohexilalanina) (SEQ ID NO: 1)]. Cuando se fusiona a la superficie del dendrímero, PADRE se unirá y activará principalmente células que tienen CMH de clase II, incluidas todas las PAPC. Pueden unirse varios epítipos PADRE (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.) a cada dendrímero. La unión se realiza con espaciadores adecuados para preservar las

propiedades de unión del péptido que dan lugar a sus propiedades inmunogénicas. Puede usarse una molécula de unión o espaciadora para conjugar un agente terapéutico a los conjugados de dendrímeros descritos en el presente documento. Los espaciadores pueden ser cualquier combinación de aminoácidos, incluyendo AAA, KK, GS, GSGGGGS (SEQ ID NO: 2), RS o AAY. Tal como se usan en el presente documento, los términos “grupo de unión” o “espaciador” significan los grupos químicos que se interponen entre el dendrímero y la(s) molécula(s) expuesta(s) en la superficie, tales como el ligando CMH de clase II, el epítipo de células T auxiliares CD4+ y el agente terapéutico (por ejemplo, fármaco contra patógenos) que se conjuga o se une al dendrímero (por ejemplo, PADRE-dendrímero) y la(s) molécula(s) expuesta(s) en la superficie. Preferiblemente, los grupos de unión se conjugan a la molécula de superficie en un extremo y en su otro extremo con la nanopartícula (por ejemplo, PADRE-dendrímero). La unión puede realizarse con agentes o bien homo o bien heterobifuncionales, es decir, SPDP, DSS, SIAB. Los métodos para la unión se describen en el documento PCT/DK00/00531 (WO 01/22995) concedido a deJongh, *et al.*. También pueden usarse grupos de unión escindibles en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, las moléculas de fármaco pueden acoplarse al dendrímero dirigido (PDD) usando un espaciador escindible sensible al pH (por ejemplo, GFLG (SEQ ID NO: 3)) que libera el fármaco en el interior de las células. GFLG (SEQ ID NO: 3) es un espaciador de tetrapéptido, que se compone de glicil-fenil-alanil-leucil-glicina (SEQ ID NO: 3).

En otra realización, el resto que puede unirse a CMH de clase II es HA de virus influenza. En una realización, el resto es un epítipo de células T auxiliares o cualquier otro epítipo que activa o contribuye a la activación de células T auxiliares CD4+. La activación del epítipo de células T auxiliares de las células T auxiliares CD4+ es necesaria para la expansión y la estimulación de las células T CD8, así como para la producción de anticuerpos por parte de las células B, que son esenciales para la inducción de respuestas inmunitarias protectoras contra agentes infecciosos.

Las composiciones, los métodos, las plataformas y los kits descritos en el presente documento tienen aplicaciones tanto profilácticas como de tratamiento, es decir, pueden usarse como agentes profilácticos para prevenir la aparición de una enfermedad o un estado en un sujeto, así como para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad o un estado. Una composición o plataforma de administración dirigida tal como se describe en el presente documento puede usarse para reducir el crecimiento de o eliminar cualquier patógeno infeccioso, así como para preparar una respuesta inmunitaria contra cualquier patógeno infeccioso.

La plataforma basada en dendrímero descrita en el presente documento proporciona varias ventajas. La plataforma se dirige a las PAPC a través de su ligando de CMH de clase II, se une y penetra en la membrana celular por su membrana externa altamente cargada positivamente, es segura y fácil de ampliar a escala para la producción de alto volumen, y actúa como adyuvante fuerte debido a la naturaleza de las modificaciones en la molécula. En una realización típica, el al menos un dendrímero es un dendrímero de PAMAM G5 que es una macromolécula polimérica altamente ramificada y un excipiente ideal por su solubilidad potenciada. La inclusión de un agonista de células T auxiliares universal, por ejemplo, PADRE, que se une al flanco de las moléculas de CMH de clase II, da como resultado un complejo de dendrímero opsonizante para PAPC, así como células T auxiliares. Esta alteración cambia un dendrímero inerte y débil a un inmunomodulador robusto.

En algunas realizaciones, se usa una partícula polimérica, por ejemplo, una partícula polimérica biodegradable en lugar de un dendrímero. La partícula polimérica puede estar cargada (por ejemplo, cargada positivamente, cargada negativamente) o no tener carga y el péptido de direccionamiento a CMH (por ejemplo, péptido de células T auxiliares universal, CLIP, etc.) y el al menos un agente terapéutico pueden conjugarse a la partícula polimérica.

#### Síntesis de dendrímeros conjugados a agentes terapéuticos (fármacos)

En el presente documento se describen dendrímeros a los que se ha conjugado a los mismos al menos un péptido de células T auxiliares universal (por ejemplo, un epítipo tal como el péptido de PADRE o HA de virus influenza) y un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco contra patógenos), en los que el al menos un péptido de células T auxiliares universal se conjuga a la superficie exterior del dendrímero de tal manera que el al menos un péptido de células T auxiliares se une específicamente a las PAPC, y el agente terapéutico se encapsula mediante el dendrímero o se conjuga a la superficie exterior del dendrímero. Los dendrímeros pueden prepararse y conjugarse a un péptido de células T auxiliares (por ejemplo, un epítipo tal como el péptido de PADRE o HA de virus influenza) y unirse a o complejarse con un agente terapéutico usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, véase la figura 1 para un esquema que demuestra la síntesis del PADRE-dendrímero. Los métodos para producir y usar dendrímeros se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Zhang J-T *et al.* *Macromol Biosci.* 2004, 4, 575-578y las patentes estadounidenses n.ºs 4.216.171 y 5.795.582. Véase también: D.A. Tomalia, A.M. Naylor y W.A. Goddard III, “Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter”, *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 29 (1990), 138-175. En los experimentos descritos en el presente documento, se usaron dendrímeros de PAMAM. Sin embargo, puede usarse cualquier dendrímero polimérico altamente ramificado y cargado positivamente. Los ejemplos de dendrímeros poliméricos altamente ramificados y cargados positivamente adicionales incluyen dendrímeros de poli(propilenimina) (PPI) o, más generalmente, cualquier otro dendrímero con grupos de amina primaria en sus superficies. Dependiendo del tipo de agente terapéutico, más de uno (por ejemplo, una pluralidad) de dendrímeros poliméricos altamente ramificados y cargados positivamente pueden conjugarse a un único agente terapéutico. Por ejemplo, pueden unirse

múltiples PDD a un AmBisome®, puesto que AmBisome® es de 100 nm y un PDD tal como se describe en el presente documento es de aproximadamente 8 nm.

En una realización, los dendrímeros se conjugan a al menos un péptido de PADRE (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.) y un fármaco para tratar una infección por un patógeno intracelular. Los PADRE-dendrímeros (dendrímeros derivatizados con PADRE) descritos en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método adecuado. Los métodos de fabricación y uso de PADRE se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.736.142. Los péptidos de PADRE pueden prepararse según los métodos descritos en la patente estadounidense n.º 5.736.142, por ejemplo, o pueden adquirirse (por ejemplo, de Anaspec, Inc., Fremont, CA). Debido a su tamaño relativamente corto, los péptidos de PADRE pueden sintetizarse en disolución o sobre un soporte sólido según técnicas convencionales. Diversos sintetizadores automáticos están disponibles comercialmente y pueden usarse según protocolos conocidos. Alternativamente, puede emplearse tecnología de ADN recombinante en la que una secuencia de nucleótidos que codifica para un epítipo de células T auxiliares se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta en una célula huésped apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión. Estos procedimientos se conocen generalmente en la técnica, tal como se describe generalmente en Sambrook *et al.*, (citado anteriormente), que se incorpora como referencia al presente documento. Los péptidos de PADRE tal como se describen en el presente documento pueden incluir modificaciones a los residuos N y C-terminales. Tal como entenderá bien el experto, los extremos N y C-terminales pueden modificarse para alterar las propiedades físicas o químicas del péptido, tal como por ejemplo, para afectar a la unión, estabilidad, biodisponibilidad, facilidad de unión, y similares. Los péptidos de PADRE descritos en el presente documento pueden modificarse de varias formas cualesquiera para proporcionar los atributos deseados, por ejemplo, características farmacológicas mejoradas, mientras se retiene sustancialmente toda la actividad biológica del péptido no modificado.

En los experimentos descritos en el presente documento, se formó el conjugado PADRE-dendrímero mediante simple acoplamiento de amida entre el extremo terminal -COOH del péptido de PADRE y uno de los grupos de amina del dendrímero. El péptido de PADRE (Ac-D-Ala-Lys-Cha-Val-Ala-Ala-Trp-Thr-Leu-Lys-Ala-Ala-Ala-D-Ala-Ahx-Cys-OH (SEQ ID NO: 4)) (Ac = acetilado; D-Ala = D-alanina; Cha = ciclohexilalanina; Ahx = ácido aminohexanoico) se adquirió de Twentyfirst Century Biochemicals, Inc. (Marlboro, MA) en su forma acetilada para proteger el extremo terminal de amina e impedir su reacción. El péptido adquirido tenía una pureza mínima del 95%. La reacción de acoplamiento de amida se llevó a cabo en condiciones convencionales en disolución de DMF o en MBS. Hay variantes de PADRE, y todas esas variantes están abarcadas por las composiciones y los métodos descritos en el presente documento.

Para controlar el número de epítopos PADRE unidos a la superficie de cada dendrímero, se usó una razón de exposición péptido/dendrímero de 2:1 en la reacción, buscando la unión de sólo unos pocos péptidos por dendrímero para mantener la mayoría de los grupos de amina libres para desarrollar grandes cargas positivas en el dendrímero. En una realización típica, una pluralidad de conjugados PADRE-dendrímero tal como se describen en el presente documento será una distribución de dendrímeros que contienen 0, 1, 2, 3, etc., PADRE (u otro péptido) unidos a los mismos. Se espera que las poblaciones relativas sigan la distribución de Poisson. Las variantes del péptido de PADRE que incluyen aKXVAAWTLKAAa (SEQ ID NO: 5) se unen con afinidad alta o intermedia ( $CI_{50} < 1.000$  nM) a 15 de las 16 moléculas de HLA-DR más prevalentes ((Kawashima *et al.*, Human Immunology 59:1-14 (1998); Alexander *et al.*, Immunity 1:751-761 (1994)). Sin embargo, también pueden usarse otros péptidos que también pueden unirse a CMH de clase II y activar las células T auxiliares CD4 en la mayoría de los seres humanos, para etiquetar el dendrímero.

Los ejemplos de péptidos de direccionamiento a APC incluyen, pero no se limitan a: péptido 830-843 del toxoide tetánico (TT); el epítipo "universal" descrito en Panina-Bordignon *et al.*, (Eur. J. Immunology 19:2237-2242 (1989)); y los siguientes péptidos que reaccionan con CMH de clase II de la mayoría de los HLA humanos, y muchos de ratones: aKFVAAWTLKAAa (SEQ ID NO: 6),

aKYVAAWTLKAAa (SEQ ID NO: 7), aKFVAAAYTLKAAa (SEQ ID NO: 8),  
 aKXVAAAYTLKAAa (SEQ ID NO: 9), aKYVAAAYTLKAAa (SEQ ID NO: 10),  
 aKFVAAHTLKAAa (SEQ ID NO: 11), aKXVAAHTLKAAa (SEQ ID NO: 12),  
 aKYVAAHTLKAAa (SEQ ID NO: 13), aKFVAANTLKAAa (SEQ ID NO: 14),  
 aKXVAANTLKAAa (SEQ ID NO: 15), aKYVAANTLKAAa (SEQ ID NO: 16),  
 AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 17), AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 18),  
 AKYVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 19), AKFVAAAYTLKAAA (SEQ ID NO: 20),  
 AKXVAAAYTLKAAA (SEQ ID NO: 21), AKYVAAAYTLKAAA (SEQ ID NO: 22),  
 AKFVAAHTLKAAA (SEQ ID NO: 23), AKXVAAHTLKAAA (SEQ ID NO: 24),  
 AKYVAAHTLKAAA (SEQ ID NO: 25), AKFVAANTLKAAA (SEQ ID NO: 26),  
 AKXVAANTLKAAA (SEQ ID NO: 27), AKYVAANTLKAAA (SEQ ID NO: 28),  
 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 29), SSVFENVVNSSIGLIM (SEQ ID NO: 30),  
 SKMRMATPLLMQ (SEQ ID NO: 31) y QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 32),

(a = D-alanina, X = ciclohexilalanina). Tales péptidos se unen a las moléculas de CMH de clase II presentes en las células T de más del 95% de todos los seres humanos.

5 El producto se purificó mediante diálisis frente a agua pura durante al menos 24 h y luego se secó a vacío. El producto recogido, un aceite transparente, se caracterizó mediante <sup>1</sup>H-RMN, UV-Vis y espectroscopía de masas MALDI-TOF. Los espectros de RMN del conjugado PADRE-dendrímico muestran picos grandes correspondientes a los protones del dendrímico y un pequeño conjunto de picos para los protones del péptido. El espectro de masas MALDI-TOF del conjugado PADRE-dendrímico muestra un pico a una razón m/z de aprox. 3.000 unidades más que el pico observado para el dendrímico por sí solo. El exceso de masa corresponde a aproximadamente 2 epítomos peptídicos. El espectro de UV-Vis del conjugado muestra una captación clara en el intervalo de longitud de onda en el que absorbe el triptófano.

15 Los dendrímeros que se conjugan a péptidos de direccionamiento a CMH (por ejemplo, epítomos de células T auxiliares) distintos de PADRE se preparan normalmente mediante un método similar al descrito anteriormente para dendrímeros derivatizados con PADRE. Por ejemplo, el extremo terminal de ácido del péptido puede unirse de manera covalente a uno de los grupos de amina en la superficie del dendrímico mediante una serie de métodos de síntesis bien conocidos, tales como la amidación usando carbodiimidas como reactivos de activación. Como otro ejemplo, la unión de estos péptidos a dendrímeros terminados en amino se realiza usando dos rutas de síntesis. El extremo amino-terminal del epítomo peptídico se protege mediante acetilación. La primera ruta usa el ácido carboxílico del residuo de cisteína terminal para lograr la unión mediante la química de amidación convencional. La segunda ruta aprovecha el tiol de cisteína (si está presente en el péptido, si no puede añadirse) para hacerlo reaccionar con los grupos alqueno añadidos a la superficie del dendrímico mediante tratamiento previo con maleimida. Ambas rutas permiten la funcionalización de dendrímeros con epítomos. Hasta varios epítomos peptídicos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, etc.) por dendrímico potenciarán la propiedad de direccionamiento de los agentes de administración de fármacos. Sin embargo, es importante dejar un gran número de grupos de amina sin reaccionar para que el dendrímico adquiera una gran carga positiva mediante protonación a valores de pH fisiológicos. Los dendrímeros tal como se describen en el presente documento pueden conjugarse a cualquier epítomo de células T auxiliares (por ejemplo, epítomo de células T auxiliares Pan DRT y HA de virus influenza).

30 Generalmente, los dendrímeros de 5ª generación (G5) se usan en las composiciones, los kits, las plataformas y los métodos descritos en el presente documento. Sin embargo, pueden usarse dendrímeros de otra generación (véase la tabla 1).

Tabla 1 Dendrímicos de PAMAM

Generación	Peso molecular	Diámetro (nm)	Grupos de superficie
0	517	1,5	4
1ª	1.430	2,2	8
2ª	3.256	2,9	16

3 <sup>a</sup>	6.909	3,6	32
4 <sup>a</sup>	14.215	4,5	64
5 <sup>a</sup>	28.826	5,4	128
6 <sup>a</sup>	58.0548	6,7	256

#### Métodos de administración de un agente terapéutico a PAPC e inducción de una respuesta inmunitaria

Se describen en el presente documento métodos de administración de un agente terapéutico para tratar o prevenir una infección por un patógeno específicamente a PAPC en un sujeto (por ejemplo, ser humano) y de inducción de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, activación de células T auxiliares CD4, producción de anticuerpos monoclonales) contra el patógeno. Un método típico incluye las etapas de: administrar al sujeto una composición que incluye al menos un dendrímero (por ejemplo, un dendrímero polimérico altamente ramificado cargado) al que se ha conjugado al mismo al menos un resto que puede unirse a moléculas de CMH de clase II (por ejemplo, péptido de células T auxiliares universal) y al menos un agente terapéutico, en el que el al menos un resto que puede unirse a moléculas de CMH de clase II y el al menos un agente terapéutico se conjugan a la superficie exterior del dendrímero de tal manera que el al menos un resto que puede unirse a moléculas de CMH de clase II se une específicamente a las PAPC. La composición puede inducir una respuesta inmunitaria cuando se administra a un sujeto, y se administra en una cantidad eficaz para inducir la activación mediada por CMH de clase II de células T auxiliares, inducir la producción de anticuerpos monoclonales contra el patógeno e inhibir el crecimiento de o eliminar el patógeno en el sujeto. Generalmente, el al menos un dendrímero es un dendrímero G5 (un dendrímero de PAMAM). El al menos un resto que puede unirse a moléculas de CMH de clase II es normalmente uno de: un epítipo de células T auxiliares Pan-DR (PADRE) y un epítipo de células T auxiliares de la molécula HA de virus influenza.

En un método típico, el agente terapéutico es un agente contra patógenos (por ejemplo, AmBisome® a una concentración de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg para una dosis única. En un ejemplo, el agente terapéutico es AmBisome® y al menos una pluralidad de APC profesionales están infectadas con *Leishmania*. En tal realización, la activación mediada por CMH de clase II de células T auxiliares es específica para *Leishmania* y la administración de la composición induce una producción aumentada de IFN- $\gamma$  en esplenocitos del sujeto infectado. Si el sujeto está infectado con *Leishmania*, el sujeto puede tener al menos una lesión. En tal realización, la administración de la composición da como resultado una reducción del tamaño o la eliminación de la al menos una lesión.

La administración de la composición no da como resultado generalmente reacciones adversas locales en el sujeto. Las composiciones, plataformas, los kits y métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse con cualquier sujeto adecuado, incluidos sujetos invertebrados y vertebrados. En una realización típica, un sujeto que va a tratarse es un animal tal como un mamífero (por ejemplo, seres humanos, roedores, perros, gatos, cabras, ovejas, vacas, caballos, etc.). Un paciente humano que padece o corre el riesgo de contraer una enfermedad infecciosa (por ejemplo, una infección por un patógeno intracelular) es un sujeto típico. Por ejemplo, el sujeto es un ser humano, y el patógeno intracelular es uno de: *Leishmania*, paludismo, tuberculosis y VIH.

#### Kits para administrar fármacos a las APC

Se describen en el presente documento kits para tratar o prevenir la infección por un patógeno intracelular (por ejemplo, *Leishmania*) en un sujeto. Un kit típico incluye: una composición que incluye al menos un dendrímero al que se ha conjugado al mismo al menos un resto que puede unirse a moléculas de CMH de clase II (por ejemplo, péptido de células T auxiliares universal) y al menos un agente terapéutico, en el que el al menos un resto que puede unirse a las moléculas de CMH de clase II y el al menos un agente terapéutico se conjugan a la superficie exterior del dendrímero de tal manera que el al menos un resto que puede unirse a moléculas de CMH de clase II se une específicamente a PAPC y en la que la composición puede inducir una respuesta inmunitaria cuando se administra a un sujeto; al menos un tampón, instrucciones de uso y envase. El PDD liofilizado o cualquier otra forma factible de PDD (epítipo de células T auxiliares universal, tal como PADRE conjugado a dendrímero) puede incluirse en un kit. En un ejemplo de un kit, el kit incluye el agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco) y un tampón que se compone de solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato u OptiMem, que tiene un pH fisiológico y está tamponado.

#### Administración de composiciones

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a invertebrados, animales y mamíferos (por ejemplo, perros, gatos, cerdos, caballos, roedores, primates no humanos, seres humanos) en cualquier formulación adecuada. Por ejemplo, una composición que incluye un PADRE-dendrímero conjugado a un agente terapéutico puede formularse en portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como solución salina fisiológica o una solución salina tamponada. Los portadores y diluyentes adecuados pueden seleccionarse en función del modo y la vía de administración y la práctica farmacéutica convencional. Puede hallarse una descripción de portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables a modo de ejemplo, así como formulaciones

farmacéuticas, en Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto convencional en este campo, y en la USP/NF. Se pueden añadir otras sustancias a las composiciones para estabilizar y/o preservar las composiciones.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto (por ejemplo, mamíferos) mediante cualquier técnica convencional. Normalmente, tal administración será parenteral (por ejemplo, introducción intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, oral, nasal o intratecal). Las composiciones también pueden administrarse directamente a un sitio diana. Las composiciones pueden administrarse en un único bolo, inyecciones múltiples o mediante infusión continua (por ejemplo, por vía intravenosa, mediante diálisis peritoneal, infusión por bomba). Para administración parenteral, las composiciones se formulan preferiblemente en una forma apirógena esterilizada. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones descritas en el presente documento se administran a un individuo ya infectado con el patógeno de interés (por ejemplo, *Leishmania*). En aplicaciones profilácticas, las composiciones descritas en el presente documento se administran a un individuo que corre el riesgo de desarrollar (por ejemplo, predispuesto genéticamente a o expuesto ambientalmente) o contraer una enfermedad infecciosa (es decir, infectado con un patógeno de interés).

#### Dosis eficaces

Las composiciones descritas en el presente documento se administran preferiblemente a un sujeto (por ejemplo, invertebrados, animales, mamíferos (por ejemplo, perro, gato, cerdo, caballo, roedor, primate no humano, ser humano)) en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad que puede producir un resultado deseable en un sujeto tratado (por ejemplo, protección contra enfermedad(es) infecciosa(s)). Tal cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse tal como se describe a continuación.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones descritas en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales, usando células en cultivo o animales de experimentación para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población). La razón de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren aquellas composiciones que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse aquellas que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado al diseñar un sistema de administración que minimice el daño potencial de tales efectos secundarios. La dosificación de composiciones preferidas se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo que incluye una DE<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones descritas en el presente documento oscilan generalmente entre aproximadamente 0,1 µg y aproximadamente 25.000 µg (por ejemplo, 1, 100, 500, 2000, 2500, 10.000, 15.000, 25.000 µg, 30.000 µg) de un complejo de epítipo de células T auxiliares/dendrímico conjugado a de 7 µg a 3500 mg para un paciente de 70 kg (por ejemplo, 0,1 µg de fármaco y 0,7 µg del dendrímico de células T auxiliares). En una realización en la que el complejo de epítipo de células T auxiliares/dendrímico se conjuga a AmBisome® para tratar una infección por *Leishmania* en un sujeto tal como un mamífero, la concentración de AmBisome® por dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Tal como se sabe bien en las técnicas médicas y veterinarias, la dosificación para cualquier sujeto depende de muchos factores, incluyendo la talla del sujeto, el área de superficie corporal, la edad, la composición particular que va a administrarse, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos administrados de manera concurrente.

#### **Ejemplos**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos específicos. Los ejemplos se proporcionan sólo a modo ilustrativo.

Ejemplo 1 - El sistema de nanoportador inmunopotenciador con migración dirigida a fagocitos reduce la dosis del fármaco AmBisome®

Puesto que las especies de *Leishmania* son parásitos estrictos en los fagocitos, la administración selectiva de AmB a fagocitos infectados mejora la eficacia, disminuye la toxicidad sistémica y simplifica los regímenes de dosificación. Para el direccionamiento de AmB a los fagocitos, se desarrolló una plataforma de nanoportador de dendrímico derivatizado con péptido-AmB (PDD-AmB) funcionalizando dendrímeros que se complejan con AmB con un péptido que se dirige a receptores de CMH de clase II. Puesto que la expresión del receptor de CMH de clase II aumenta durante el transcurso de la leishmaniosis, las células infectadas son dianas deseadas para PDD-AmB. En un modelo murino para infección por *Leishmania major*, PDD-AmB se dirigió eficazmente a células fagocíticas infectadas reduciendo la dosis eficaz de AmB en un 80% con farmacocinética mejorada. Además, puesto que el péptido de direccionamiento a CMH de clase II es un epítipo de células T auxiliares universal, los complejos PDD-AmB provocaron respuestas de células T específicas de parásitos. Por tanto, al reducir y simplificar la dosificación de AmB y los consiguientes efectos secundarios, y al estimular las respuestas de células T, el complejo PDD-AmB es un candidato potencial para desarrollo adicional y ensayos clínicos en seres humanos.

La captación de parásitos requiere moléculas de CMH de clase I y II, y también se ha asociado con la activación

manifestada en la regulación por incremento de CMH de clase I y en particular de las moléculas de CMH de clase II. Los epítomos de células T auxiliares universales se unen al flanco de CMH de clase II de ratones, ratas, primates no humanos y casi todos los seres humanos. Se ha concebido un uso novedoso de epítomos de células T auxiliares universales para dirigirse (principalmente) a macrófagos/células dendríticas y monocitos (P. Daftarian, AE Kaifer, W. Li, BB Blomberg, D. Frasca, F., Roth F, Chowdhury R, Berg EA, Fishman JB, Al Sayegh HA, Blackwelder P, Inverardi L, Perez VL, Lemmon V, Serafini P. Peptide-conjugated PAMAM dendrimer as a universal DNA vaccine platform to target antigen-presenting cells. *Cancer Res*, 71 (2011), págs. 7452-7462; Daftarian *et al.*, *Journal of Infectious Diseases*, 2013. 208 (11): págs. 1914-1922; Daftarian *et al.*, APC Targeted (DNA) Vaccine Delivery Platforms: Nanoparticle Aided IN “Molecular Vaccines Volume 2; From Prophylaxis to Therapy by Giese”. Springer 2014). Se diseñó un nanoportador decorado con epítomos de células T auxiliares universales que podían complejarse con AmB cargada negativamente. Los dendrímeros son macromoléculas altamente ramificadas que se extienden desde un núcleo central y contienen una serie de capas distintas a nivel estructural y sintético. Cada capa añadida a la estructura de un dendrímero se denomina “generación”, en una referencia clara al crecimiento gradual de la macromolécula. Se han desarrollado dendrímeros de PAMAM y ahora están disponibles comercialmente. El nanoportador usado en este informe es un dendrímero de quinta generación acoplado o bien a epítomos de células T auxiliares Pan DR o bien a PADRE (PADRE-dendrímero denominado más adelante en el presente documento PDD2), o a un epítomo de células T auxiliares de la molécula de hemaglutinina (HA) del virus de influenza (PDD1). El PDD1 o PDD2 proporcionan ventajas que incluyen la reducción de la biodistribución fuera de la diana y la reducción de la dosis eficaz del fármaco mediante el direccionamiento selectivo. Además, la actividad adyuvante intrínseca de la administración de fármacos de tipo PDD proporciona una “ayuda” para provocar inmunidad adoptiva en un entorno terapéutico en presencia de antígenos; convertir la infección en una vacuna incorporada. Se sabe que las células T auxiliares CD4+ desempeñan un papel vital en la generación de células T CD8+, así como en las respuestas inmunitarias humorales. Las citocinas funcionan a niveles muy bajos en un microambiente y deben estar en las proximidades de células inmunitarias cuando se produce la exposición al antígeno. El PDD está diseñado para formar un complejo con y acompañar a AmB a las células reservorio de parásitos, los fagocitos, mientras que tienen un péptido universal de células T auxiliares CD4+ intrínseco/potente para brindar “AYUDA” para la inmunidad adoptiva del huésped. Los antígenos de *Leishmania major* y células T auxiliares se expresarán en la misma APC dando como resultado respuestas de células T específicas potenciadas. Se espera que la administración dirigida y la encapsulación de anfotericina B en un vehículo biocompatible reduzca los efectos fuera de diana, la toxicidad y la dosis eficaz al tiempo que aumente la estabilidad. La administración dirigida de AmB a los fagocitos requiere una menor dosis administrada, lo que reduce las reacciones farmacológicas adversas, y debería dar como resultado una respuesta más eficiente. Además, en presencia de infección, la actividad adyuvante intrínseca de PDD da como resultado una respuesta inmunitaria adaptativa y actúa como vacuna incorporada.

#### Materiales y métodos

Ratones e inoculación de *L. major*. Se usaron ratones BALB/c hembra, de 8-9 semanas de edad, en este estudio. Se prepararon promastigotes metacíclicos de *L. major* (el clon VI (MHOM/IL/80/Friedlin) de la siguiente manera. Los parásitos aislados se lavaron dos veces en 20 ml de PBS y 0,5 microlitros de disolución de antibióticos durante 20 min y luego se cultivaron en un medio de FBS al 20% y medios de Schneider durante 6-7 días. Los parásitos se lavan dos veces con PBS antes de la infección. Experimentos *in vivo*, se inyectaron  $1 \times 10^6$  promastigotes metacíclicos por vía intradérmica en el dorso una pulgada delante de la base de la cola de los ratones. Las inoculaciones consistieron en promastigotes metacíclicos en suspensión en 0,1 ml de PBS. El tratamiento se inició una vez que las lesiones tenían entre 20 y 70 mm<sup>2</sup> y se administró una vez al día durante 10 días por vía intraperitoneal. El control positivo fue AmBisome<sup>®</sup> administrado a 37,5 mg/kg/día durante 10 días. Se examinaron los animales diariamente y se observaron signos clínicos de enfermedad. Una vez que se formó una lesión, se monitorizó su tamaño midiendo sus dos diámetros más amplios a intervalos semanales durante 4 semanas. Los tamaños de lesión se compararon con los ratones infectados pero no tratados. Se sacrificaron los animales moribundos o enfermos.

Péptidos. Se usaron los siguientes péptidos: epítomo pan DR (PADRE): a(o A)KXVAAWTLKAAa(o A)ZC (SEQ ID NO: 33) (21st Century); hemoglobina modificada HA110-120: SFERFEIFPKEC (SEQ ID NO: 34) (HA) (21st Century). Se produjo un tercer péptido de aminoácidos reordenados al azar y se usó como nanopartícula de control.

Conjugación de los péptidos a los dendrímeros y caracterización de los productos. Los conjugados péptido-dendrímero se fabricaron mediante reticulación de dendrímero de quinta generación (Dendritech, MI) y diana de péptidos: PADRE y HA110-120 con una cisteína añadida en el extremo C-terminal usando éster maleimido-bis-succinimidílico (MBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) tal como se notificó anteriormente (Daftarian *et al.*, *Cancer Res* <http://cancerres.aacrjournals.org/content/early/2011/12/07/0008-5472.CAN-11-1766.full.pdf>). En resumen, el péptido de PADRE o HA acetilado de extremo amino-terminal, ocupado en los extremos se une de manera covalente al dendrímero mediante formación de amida entre uno de los grupos de superficie de amina primaria (-NH<sub>2</sub>) del dendrímero y el extremo terminal de ácido carboxílico (-COOH) sin proteger del péptido. Se usó HPLC de fase inversa para purificar HA-dendrímero, PADRE-dendrímero y péptido de control-dendrímero reordenado (G5). Los productos de reacción se caracterizaron usando espectrometría de masas MALDI-TOF, UV-visible y espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN. Los conjugados péptido-dendrímero se caracterizaron mediante espectroscopía de masas MALDI-TOF (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) y técnicas espectroscópicas de <sup>1</sup>H-RMN. Para la espectroscopía de masas MALDI-TOF, se disolvieron las muestras en tampón de PBS (Daftarian *et al.*, *Cancer Res*.

<http://cancerres.aacrjournals.org/content/early/2011/12/07/0008-5472.CAN-11-1766.full.pdf>.

Complejación de nanopartículas/AmB. Un vial de AmB contiene 50 mg calculados de anfotericina B, que se reconstituye en 12 ml de PBS para su administración. La membrana también contiene aproximadamente 213 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada; 52 mg de colesterol, 84 mg de diestearoilfosfatidilglicerol, 0,64 mg de alfa-tocoferol, 900 mg de sacarosa y se tamponó con 26,25 mg de succinato de sodio hexahidratado. Antes de su uso, se reconstituyó un vial de AmB con 13,5 ml de agua estéril, lo que dio como resultado un pH de 5-6. Para formar los complejos, se resuspendió AmB en PBS caliente (37°C) (pH 7,4) a 3,6 mg/ml (Invitrogen). Para los complejos de AmB con preparaciones de PDD1 o PDD, se añadió la disolución de AmB gota a gota a las nanopartículas usando una punta p100 hasta un volumen igual de nanopartículas mientras que el vial que contenía nanopartículas se sometió a agitación en vórtice. Se usaron razones amina:fosfato (N:P) que incluyeron 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 y 7:1 a menos que se indique de otro modo. En algunos casos para el análisis de administración, se usó un control de carga útil marcado que incluía ARNbc-Alexa Fluor 555 (denominado más adelante en el presente documento AL4) (Invitrogen) o albúmina-FITC (Sigma). Los cargamentos de control marcados (ARNbc o albúmina) se usaron con nanoportador (PDD1 o PDD2) o en una mezcla con el complejo de AmB en una proporción de 0,1. La mezcla de cargamento de control marcado/AmB se añadió luego gota a gota a la disolución de nanopartículas. Estas preparaciones se analizaron después de incubación durante 20 min a temperatura ambiente. La dosis completa de AmB es de 37,5/kg/día durante 10 días. Para producir una quinta parte de esta dosis complejada con AmB a una razón de 1:7 (AmB:PDD1), se mezclaron 133  $\mu$ g de AmB y 931  $\mu$ g de PDD1.

Análisis por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés). Se detectaron las nanopartículas usando un instrumento de dispersión dinámica de luz/dimensionamiento molecular Malvern Zetasizer Nanaoseries con un láser de argón (Nano-ZS90). Se hizo funcionar el instrumento con una resolución de uso general. Los liposomas analizados eran de naturaleza bastante polidispersa. La tabla 2 muestra el diámetro promedio de partículas individuales y complejos. Todas las muestras se usaron tal como se obtuvieron sin dilución adicional. Para la determinación del tamaño, se seleccionó agua como dispersante. Se permitió que se equilibrasen todas las muestras durante 5 s antes de la adquisición de datos. Para cada muestra se realizó una única medición con 20 adquisiciones.

Tabla 2 - Diámetros promedio de partículas individuales y complejos.

Partícula	Diámetro promedio (nm)
PDD	N/D
AmBisome <sup>®</sup>	114,5
AmBisome <sup>®</sup> /PDD	166
AmBisome <sup>®</sup> /PDD/ARNip	251,35

Se analizaron los tamaños promedio de nanopartículas con DLS. Se prepararon partículas tal como se describe en la sección de materiales y métodos y se analizaron con DLS para determinar los tamaños promedio. Todas las muestras usadas fueron tal como se obtuvieron sin dilución adicional. Para la determinación del tamaño, el agua fue el dispersante. Se permitió que se equilibrasen todas las muestras durante 5 s antes de la adquisición de datos. Para cada muestra se realizó una única medición con 20 adquisiciones. Se prepararon AmB complejados o bien con PDD1 o bien con PDD2 con y sin AL4 tal como se describió anteriormente en agua y PBS. Se analizaron los tamaños después de incubación durante 20 min a temperatura ambiente usando el instrumento de dispersión dinámica de luz/dimensionamiento molecular Malvern Zetasizer Nanaoseries con longitud de onda de láser de argón  $\lambda = 830$  nm, un ángulo de detector de 90. Se realizaron experimentos de dispersión de luz usando al menos 20 lecturas independientes de 10 segundos en duración. Los datos representados gráficamente representan un promedio de 6 ejecuciones de DLS.

Evaluación de la unión y la internalización celular. Se incubaron ARNbc marcado con fluoróforo (ARN bicatenario de control-Alexa Fluor 555 marcado o AL4), albúmina marcada con FITC y complejos de nanopartículas (PDD1 o PDD2) con AL4 a las razones especificadas, durante 30 minutos o 2 horas con macrófagos peritoneales murinos, esplenocitos murinos o monocitos purificados humanos. Se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo para analizar la unión de los complejos de nanopartículas/carga útil a las células teñidas para los marcadores de expresión de CMH de clase II, macrófagos, células dendríticas o monocitos. Se usó un microscopio confocal para examinar la distribución de fluorescencia mediante secciones en z. En otra serie de experimentos, se inyectó (s.c.) un plásmido que albergaba GFP a 20  $\mu$ g en 100  $\mu$ l, libre o complejado con PDD2 (razón P:N de 1:7) en el flanco izquierdo de ratones C56BL. Se evaluaron los ganglios linfáticos de drenaje, así como el ganglio linfático del flanco opuesto mediante citometría de flujo. Se analizó la expresión de GFP en DC en el plásmido PDD2/GFP y en los grupos de control. Se evaluó la viabilidad de los macrófagos usando azul tripano y anexina v-APC y se halló que estaba en el intervalo del 13-24% para PDD2/AmB/AL4 y el 8-13% para medios solos.

ELISA DE IFN- $\gamma$ . Se usó recientemente (Daftarian *et al.*, Cancer Res <http://cancerres.aacrjournals.org/content/early/2011/12/07/0008-5472.CAN-11-1766.full.pdf>.) una plataforma PADRE-dendrímico similar para la transfección eficiente de células B humanas y de ratón con ácido nucleico. Esta

plataforma/método permite la transfección *in vitro* de células presentadoras de antígeno. El método implementa el uso de dendrímeros derivatizados con PADRE que se unen específicamente a las moléculas de CMH de clase II expresadas en APC para administrar epítomos de *L. major* específicos para las células T. Como resultado, se transfectan plásmidos de PADRE-dendrímero/ADN que albergan antígenos de *L. major* y hacen que los esplenocitos de los ratones inmunizados presenten epítomos (presentes) en 48 horas. Si los ratones han producido células T específicas, se verán estimulados para producir IFN- $\gamma$ . El método no sustituye a las técnicas actuales para medir la respuesta de células T, sino que ofrece la posibilidad de transfectar selectivamente las APC en las PBMC permitiendo la estimulación no restringida de las células T por parte de CMH. Mediante el uso de todo el repertorio de ADN presente en *L. major* como fuente de antígenos, este método permite la detección de la reacción inmunitaria contra epítomos conocidos y desconocidos. Se midió el IFN- $\gamma$  secretado tras la estimulación mediante PDD/ADN que alberga antígenos de *L. major* usando reactivos de ELISA de PharMingen (San Diego, CA). El plásmido de control (Invitrogen™ Life Technologies) y PVAX con genes insertados KMP11, TRYP, LACK y PAPLE (Lang *et al.*, J Cell Sci 107 (pt 1):69-82, 1994). Se mezcló PADRE-dendrímero con el antígeno de alojamiento y se dejaron los plásmidos de control a temperatura ambiente durante 20 minutos para formar el complejo. Se cocultivaron esplenocitos con complejos PADRE-dendrímero/ADN y se realizó ELISA de IFN- $\gamma$  con los sobrenadantes de los cultivos 48 horas después de la estimulación.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Se produjeron preparaciones de la nanopartícula, la nanopartícula y AmB, y se añadió el complejo a la población de células. Cada uno se conservó en una disolución de formaldehído al 2% y se diluyó 1:10 en agua destilada. Se colocó una gota de pipeta de cada muestra sobre una rejilla de cobre de 200 de malla recubierta con carbono y nitrocelulosa y se permitió que se secase al aire. Luego se examinaron las rejillas con varios aumentos de hasta 245.000X en un TEM Philips CM-10. Se tomaron imágenes de cada preparación usando una cámara digital Gatan.

Producción y recogida de macrófagos peritoneales. Se produjeron macrófagos peritoneales de la siguiente manera: ratones hembra BALB/c de tipo salvaje de 8 semanas de edad recibieron 1,5 ml de tioglicolato al 3% estéril por vía i.p. y se sacrificaron mediante CO<sub>2</sub> en el día 4 de inyección. Se administró tratamiento con AMB +/- PDD a estos ratones por vía i.p. durante las últimas 2 h del periodo de producción de 4 días. Se situaron los ratones anatómicamente para la disección; se realizó una pequeña incisión en la piel de la parte inferior del abdomen para insertar unas tijeras para cortar la piel abdominal por toda la línea media del cuerpo. Se dejó expuesto el peritoneo y se masajeó suavemente. La porción correspondiente a la parte superior del abdomen se levantó cuidadosamente con una pinza hemostática y se irrigó la cavidad peritoneal con 5 ml de PBS frío usando una jeringa de 5 ml con una aguja de calibre 26 ½. Se recogieron por succión exudados peritoneales, insertando cuidadosamente una pipeta Pasteur estéril a través de la cara lateral superior del peritoneo. Los exudados se colocaron en hielo durante el resto del procedimiento. Se lavaron los exudados recogidos con PBS frío y se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 rpm dos veces y se evaluó la viabilidad en el hemocitómetro mediante exclusión con azul tripano.

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico se usó Sigma-Plot (Systat Software Inc. San Jose, Ca) o análisis estadístico con Prism (ANOVA; software Prism, GraphPad, San Diego, CA). Se realizó análisis de la varianza de un factor entre grupos (ANOVA) después de la evaluación de la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizó un análisis *post-hoc* por parejas usando la prueba de Holm-Sidak o la prueba de Dunn. Se usó ANOVA a rangos si la muestra no presentaba una distribución normal. Se usó la prueba de la t de Student para comparar dos grupos. Se usó análisis de rangos logarítmicos de Kaplan Meier seguido de análisis *post-hoc* de Holm-Sidak para evaluar las diferencias en la supervivencia entre grupos.

## Resultados

Se ha desarrollado una nueva plataforma de nanopartículas dirigidas biodegradables para la administración de fármacos a células del sistema de fagocitos mononucleares para reducir la dosis/toxicidad del fármaco y mejorar la participación de la respuesta inmunitaria en el control de la infección. La plataforma de nanoportador se compone de un dendrímero de PAMAM de unión a fármacos que está decorado con un péptido ligando de unión a CMH de clase II (péptido de unión pan DR universal) con actividad inmunopotenciadora intrínseca. El resto de dendrímero (cargado positivamente) se compleja con AmB (cargado negativamente). El grupo de los inventores y otros han demostrado que los péptidos de células T auxiliares universales se unen específicamente a las moléculas de CMH de clase II de ratones, primates no humanos y seres humanos. Además, estos epítomos de células T auxiliares universales tienen la capacidad de activar DC y macrófagos, induciendo respuestas inmunitarias, lo que hace que la plataforma sea un candidato ideal tanto para la administración de fármacos como para la activación inmunitaria contra *Leishmania*. La síntesis de PDD1 y PDD2 se realizó y caracterizó tal como se describió previamente (Daftarian *et al.*, Cancer Res <http://cancerres.aacrjournals.org/content/early/2011/12/07/0008-5472.CAN-11-1766.full.pdf>) y a continuación. Se diseñó PDD1 específicamente para los experimentos realizados en BABL/c, mientras que PDD2 usa PADRE, un epítomo de células T auxiliares universal que actúa en ratones y seres humanos.

Caracterizaciones de péptido-dendrímero y los complejos PDD/fármaco (carga útil). Para evaluar la capacidad de direccionamiento de AmB, se usaron albúmina-FITC y ARNbc-Aexa Flour 555 (AL4) como cargamento. Se usaron MALDI-TOF, RMN de protón, DLS y TEM para caracterizar los conjugados y complejos de dendrímero-péptido a diferentes razones de PDD y AmB, o ARNbc acoplado a Alexa Fluor de control de PDD (AL4). Se evaluaron las sustituciones de péptidos o el número promedio de péptidos acoplados al dendrímero mediante experimentos de

espectrometría de masas MALDI-TOF. Cada lote recién sintetizado se comparó con una preparación previa para asegurar la sistematicidad de los productos mediante caracterización química. Tal como se muestra en la figura 12, el número promedio de péptidos dirigidos en cada nanopartícula fue de 2. Este diseño garantizaría que se mantenga la mayoría de los grupos amina en la superficie del producto, dando como resultado una fuerte carga positiva en las nanopartículas modificadas en superficie en condiciones fisiológicas de pH. Se determinó la diferencia de masa entre PDD y el dendrímero G5. Mientras que la masa del dendrímero es de 26184,2, el PM de PDD es de 3295 y 3187 en los lotes n.º 1 y n.º 2, respectivamente. El análisis indica que hay un promedio de 2 péptidos de PADRE (PM de 1613) unidos a cada superficie de molécula de dendrímero. Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de las tres muestras demuestran que la muestra 2 y la muestra 3 son de estructura muy similar (figura 12). Para verificar que PDD pudo complejarse con AmB, se realizaron estudios tanto de DLS como de TEM. Tanto PDD1 como PDD2 se mezclaron con AmB en una razón en peso de 10:1 en PBS. Después de un tiempo de incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, se analizaron los complejos usando DLS y TEM, que demostraron la complejación de AmB y PDD.

Análisis por TEM y DLS. PDD mostró un bajo índice de polidispersidad en la evaluación por TEM que se confirmó en múltiples mediciones de DLS. AmB presenta una distribución de tamaño de partícula (~110 nm, figura 3) que se correlaciona muy bien con las mediciones de DLS (114,5 nm). Las observaciones de TEM indican que PDD tenía aproximadamente 10 nm de tamaño. No hubo diferencia de tamaño detectable entre PDD1 y PDD2. Las observaciones de TEM también indicaron que el PDD de encapsulación de AmB (PDD/AmB) muestra un alto grado de polidispersidad tal como se confirma mediante los presentes estudios de DLS. El tamaño de AmB varió desde 50 nm hasta 290 nm. La pequeña AMB (60 nm -90 nm) de color claro (el 3,7% de la población total) presenta una baja carga de PDD (figura 3). Además, la AMB oscura y grande (~150 nm) parece indicar altas cargas de PDD2 dentro de las nanopartículas de AMB (figura 3) que constituyen el 22% de la población total de nanopartículas. Las observaciones de TEM confirman los datos de DLS (166 nm) para AMB/PDD. Además, también se observó que aproximadamente el 11% de PDD/AmB (AmB recubierta con nanopartículas) tenía un tamaño de aproximadamente 166 nm y un 11% adicional tenía un tamaño de aproximadamente 200 nm. Este cambio en el tamaño de nanopartícula de AmB desde ~114 nm hasta ~166 nm y 200 nm después de la encapsulación de PDD corresponde a un cambio de tamaño del 45,6% y el 75%, respectivamente. Además, las partículas oscuras observadas en TEM pueden indicar PDD restante no encapsulado por la AmB o PDD excluido durante el estallido de la AmB. En algunos casos, se observó PDD/AmB oscuro y muy grande (de 200 nm a 285 nm). Sin embargo, estos constituían sólo el 7,4% de la población total de AmB. A partir de las observaciones de TEM resulta evidente que más del 95% de las nanopartículas de AmB tienen PDD encapsulado. Sin embargo, aparte de MALDI-TOF, la complejación de PDD y PDD1 con AmB se mostró claramente en TEM y DLS (figura 3 y tabla 2). El análisis por DLS mostró un aumento de tamaño en las partículas cuando se complejó AmB con PDD, y un aumento adicional en el diámetro de las partículas cuando se complejó PDD con AL4 marcado (tabla 2). El intervalo de detección de tamaño de Zetasizer está por debajo del tamaño del PDD solo, por lo que no se detectó. Los diámetros promedio de AmBisome®, PD/AmB y PDD/AmB/AL4 fueron de 112 nm, 154 nm, 254 nm, respectivamente.

La plataforma se dirige a macrófagos/monocitos y bazos *in vitro* e *in vivo*. Para examinar la capacidad de direccionamiento de macrófagos de la plataforma, inicialmente se usó un cargamento cargado negativamente, AL4, que es un ARNbc marcado con Alexa Fluor 555. Se aislaron macrófagos enriquecidos peritoneales de ratones BALB/c o C57BL y se incubaron con AL4 con o sin PDD1. Una incubación de 20 minutos fue suficiente para que el complejo de PDD1/AL4 entrase en los macrófagos. Después de la incubación, se lavaron las células dos veces y se tomaron imágenes usando un microscopio de fluorescencia Leica. Una superposición de campo brillante e imágenes fluorescentes rojas demuestra la capacidad del dendrímero para administrar AL4 a macrófagos murinos diana (figura 4A). De manera similar, cuando se cocultivaron monocitos humanos purificados con PDD/ARNbc-FITC, más del 90% de los monocitos humanos fueron positivos para FITC (figura 4B). Los monocitos humanos son generalmente células difíciles de transfectar. El cultivo con ARNbc-FITC solo dio como resultado menos del 1% de transfección (captación del cargamento). Entonces se complejó PDD/AL4 o péptido reordenado-dendrímero/AL4 y se preparó para inyectarse por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho de los ratones. Una hora después de la inyección s.c. del PDD/AL4 y el complejo de control, se sacrificaron los ratones, se recogieron los bazos para obtención de imágenes mediante IVIS. El bazo de ratones C57B1/6 a los que se les inyectó PDD/AL4 fue positivo (figura 4C, emisión de fluorescencia roja relacionada con la presencia de AL4), mientras que el complejo de control (AL4 complejado con un dendrímero acoplado con un péptido reordenado aleatorio de control) fue negativo. Estos datos sugieren que las plataformas de PDD y PDD1 complejadas con un cargamento se dirigen activamente a los fagocitos, *in vitro* e *in vivo*.

La plataforma transporta la carga a macrófagos y DC *in vivo* e *in vitro*. El primer desafío de diseño en el desarrollo de un nanosistema dirigido de administración de fármacos es descubrir el ligando correcto en la membrana celular que es más o menos específico para el/los linaje(s) celular(es) diana. El direccionamiento a un sistema fagocítico que incluye diferentes tipos de células es complicado. El uso de una molécula de CMH de clase II que se expresa en monocitos, macrófagos y DC es una solución factible. Sin embargo, el nanovehículo no sólo debe poder penetrar/unirse a sus células diana, sino que también debe transportar la carga útil al interior de las células. Se inyectó PDD complejado con ADN de GFP por vía subcutánea (s.c.) a ratones C57BL. Cinco días después de la inyección, se recogieron y analizaron los ganglios linfáticos de drenaje. Los controles incluyeron ratones a los que se les inyectó PBS o con un pMAX-GFP complejado con dendrímero de control. El análisis por FACS (figura 5A) reveló un número significativamente mayor de células GFP+, células CMH de clase II+ y GFP+ DC+ en el ganglio linfático

de drenaje de ratones tratados con PDD/pMAX-GFP. De manera similar, los estudios de microscopía confocal mostraron que cuando se complejó con PDD, se transportó la albúmina marcada con FITC a macrófagos purificados (figura 5B). Además, el PDD/ADN de GFP puede ser difícil de transfectar células B humanas (figura 13A) y también se transfectaron PBMC de primates no humanos con PDD/AL4. Estos datos demuestran que la plataforma puede transportar eficazmente una carga útil a las células fagocíticas. Además, la expresión *in vivo* de GFP en DC de ganglios linfáticos de drenaje demuestra que la plataforma puede formar complejos, acompañar y administrar el cargamento a células dendríticas en el huésped.

La plataforma dirige AmB a macrófagos, *in vitro* e *in vivo*. Puesto que tanto AL4 (ARNbc con etiqueta de color rojo) como AmB están cargados negativamente, forman un complejo con el PDD cargado positivamente. Los estudios de microscopía confocal y de citometría de flujo usando macrófagos purificados y diversas razones de PDD/AL4/AmB indicaron que los complejos de [PDD:AL4:AmB] producidos a razones en peso 7:5:1 pudieron transfectar eficientemente (figuras 7A y B). La adición de AL4 al complejo PDD/AmB permitió que los presentes inventores realizaran estudios de entrada celular a través de la monitorización/visualización de AL4. Se examinó la captación del complejo PDD/AmB/AL4 por los macrófagos *in vitro* e *in vivo*. Para los estudios *in vitro*, se cocultivó el complejo con macrófagos seguido de análisis por citometría de flujo en varios puntos de tiempo. La producción y recogida de macrófagos peritoneales se realizaron tal como se describe en los materiales y métodos y se obtuvieron células enriquecidas en macrófagos (figura 6). Esta población enriquecida en macrófagos se usó en los estudios *in vitro* sobre la administración dirigida de AmB por PDD. Se complejó AmB con o bien [dendrímico/AL4, como control], o bien PDD/AL4. Se cocultivaron los complejos durante 10 ó 120 minutos y posteriormente se tiñeron las células con un marcador de macrófagos F4/80 y se sometieron a ensayo por citometría de flujo (figura 7A). Se observó un promedio de un aumento de 17 veces en las células positivas para PDD/AmB/AL4 en comparación con dendrímico-AmB-AL4. PDD potenció significativamente el direccionamiento de fármacos por macrófagos peritoneales *in vitro* (figura 7A).

Para examinar el efecto de PDD sobre la administración *in vivo* de AmB, se complejó AmB con el dendrímico de control y AL4 o con PDD y AL4 (razones en peso 7:5:1). Se inyectaron por vía i.p. los complejos 2 horas antes de la recogida de células de la cavidad peritoneal. PDD potencia la captación de AmB *in vivo* en los macrófagos peritoneales en ~ 6 veces cuando se retiraron las células 2 horas tras la inyección i.p. (figura 7B). Un diagrama resume el aumento experimental promedio de la captación de AmB (figura 7C). Tanto PDD como PDD1 presentaron resultados similares a los mostrados en los datos de experimentos representativos.

Determinación de la dosis eficaz de AmB en un entorno terapéutico de BALB/c cutáneo de *L. major*. Para determinar la dosis eficaz tolerada de AmB que da como resultado la reducción de lesiones, se inoculó un millón de parásitos en la base de la cola de los ratones. Se sometieron a prueba diferentes dosis para determinar la eficacia de AmB sobre el crecimiento de lesión. Los resultados de múltiples experimentos realizados sobre el modelo de *L. major* cutáneo terapéutico optimizado. El modelo en el laboratorio indicó que dosis menores de 37,5 mg/kg/día, durante 10 días, sólo tuvieron efectos moderados sobre la disminución del área de lesión. Sin embargo, una dosis de 37,5 mg/kg/día durante 10 días dio como resultado una disminución significativa del área de lesión (figura 8). Las dosis de 6,2 mg, 12,5 mg o 25 mg (por kilogramo, al día durante 10 días) no dieron como resultado la reducción de los tamaños de lesión, pero tuvieron efectos moderados porque esta dosis aparentemente ralentizó la formación de lesiones en comparación con el grupo de ratones que no recibieron tratamiento (figura 8). Una dosis de 50 mg/kg/día dio como resultado una pérdida de peso del 21%. Por tanto, se eligió una dosis baja ineficaz de 6,2 mg/kg/día (durante 10 días) con o sin PDD1 o PDD.

La eficacia de AmB aumenta un 80% cuando se envuelve en PDD1. La determinación final de la eficacia de una plataforma de administración dirigida de fármacos proviene de pruebas *in vivo* en un modelo animal riguroso/fisiológicamente relevante. *L. major* que provoca leishmaniosis cutánea en ratones BALB/c se aceptó como modelo que se asemeja a la inyección natural. Se usó un entorno agresivo en el que se inició el tratamiento cuando las lesiones alcanzaron un tamaño promedio de 20-70 mm<sup>2</sup>. En este entorno terapéutico optimizado, la dosis eficaz de 37,5 mg/kg/día durante 10 días controló la infección en la mayoría de los ratones. Se realizaron dos series de experimentos en ratones en grupos de 10 en los que se compararon los tamaños de lesión en grupos que recibieron la dosis completa, una dosis 5 veces menor (6,25 mg/kg/día durante 10 días) y grupos de control. Tal como se describe en los materiales y métodos, se inocularon (s.c.) ratones BALB/c con parásitos *L. major* y 17 días tras la inoculación de parásitos comenzaron las terapias (cuando las lesiones alcanzaron un tamaño promedio de 20-40 mm<sup>2</sup>). Todas las combinaciones de fármacos se administraron por vía intraperitoneal. Se midió el porcentaje de cambio de los tamaños de lesión. La AmB a dosis baja (6,25 mg/kg/día, durante 10 días) no reduce los tamaños de lesión, mientras que AmB/DRHA (AmB en el complejo: 6,25 mg/kg/día, durante 10 días) reduce significativamente los tamaños de lesión. Estos datos muestran un beneficio en la utilización de la nanopartícula, ya que potencia claramente la eficacia de AmB en comparación con el fármaco no encapsulado. Este tratamiento no se asoció con ninguna pérdida de peso, que se observó en dosis mayores de 37,5 mg/K/día durante 10 días. La rapidez de la eficacia de AmB a dosis baja cuando se une a PDD1 (AmB a 6,2 mg/kg/día, durante 10 días) es superior a la de 37,5 mg/kg/día durante 10 días para controlar las lesiones (figura 9). Curiosamente, el efecto de reducción de los tamaños de lesión en el grupo que recibe AmB/DRHA aparece mucho antes que el de la dosis completa, acorde con el efecto inmunopotenciador de la plataforma al involucrar una respuesta inmunitaria. Ya en el día 7 tras la terapia, el tratamiento con PDD/AmB dio como resultado un efecto que transportaba AmB a una dosis de 1/5 de la dosis eficaz (figura 9). Esta rápida acción /cinética de AmB/PDD1 (6,25 mg) se observó en ratones portadores de infección

activa, el día 53 después de la infección y sólo 7 días tras el tratamiento, mientras que se requirieron 21 días para la dosis completa (37,5 mg de AmB sin PDD1) para dar como resultado efectos similares.

En la figura 10 se muestran los efectos globales de diversos tratamientos en ratones que portaban lesiones de leishmaniosis cutánea que oscilaban entre 20 y 70 mm. Las mediciones de lesiones se muestran los días 0, 12 y 21 tras las terapias; se muestran AmB a dosis baja (AmB70) y alta (AmB370), dosis baja de AmB envuelta en PDD1 (AmB70/PDD1) y sin tratamiento. El protocolo de IACUC requiere que los ratones se sacrifiquen cuando el tamaño de lesión alcanza más de 150 mm<sup>2</sup> o 60 días tras la inoculación de parásitos. Los ratones que recibieron la dosis de 7 mg de AmB/PDD1 son comparables con los que recibieron un régimen de dosis de 37,5 mg (figura 10). También se muestra que las lesiones en ratones que recibieron 7 mg de AmB/PDD1 fueron significativamente menores (valor de  $P = 0,0034$ ) que las que recibieron tratamiento con 6,25 mg de AmB. También se demuestra que el efecto de AmB complejo en PDD1 se presenta mucho antes que el régimen de mayor dosis (figura 10).

PDD1/AmB y PDD/AmB provocan respuestas inmunitarias específicas de antígeno. El día 60 tras la inoculación de parásitos y 21 días tras el inicio de la terapia, se estimularon esplenocitos de ratones con antígenos de *L. major* tal como se describe en los materiales y métodos. Se detectaron aumentos de las producciones de IFN $\gamma$  específico de antígeno en ratones que recibieron PDD1 o PDD2/AmB o PDD2/AmB en comparación con los ratones que recibieron AmB sola o AmB con la nanopartícula de control (péptido-dendrímero reordenado-al azar). Los esplenocitos de ratones tratados con PDD/AmB después de incubación durante 48 horas con plásmidos que albergaban cuatro antígenos de *L. major* expresaron grandes cantidades de IFN $\gamma$  en comparación con esplenocitos de grupos tratados con AmB sola, AmB complejo con nanopartículas de control o PDD solo (figura 11). Esta producción de IFN $\gamma$  específico de antígeno es importante, puesto que la terapia de combinación con un agente quimioterápico y un agente inmunopotenciador (epítipo de células T auxiliares CD4+) puede convertir la infección en una respuesta inmunitaria de inducción de vacuna al educar las respuestas inmunitarias del huésped (por ejemplo, el sujeto que está tratándose). De manera acorde a muchos informes sobre la linfadenopatía transitoria y la esplenomegalia al usar agentes inmunopotenciadores, también se observó una esplenomegalia transitoria en ratones que recibieron 10 dosis de AmB/PDD. Se observó que los tamaños de bazo se agrandaron en el grupo que recibió PDD1 (figura 11B), que también se notifica en el caso de potentes adyuvantes tales como el tratamiento con CPG. Esto se considera un signo de expansión de células inmunitarias y la participación del sistema inmunitario. De hecho, sólo se preparó una respuesta de células T específicas de antígeno en ratones que recibieron tratamiento con PDD/AmB y no en ningún otro tratamiento (figura 11C). Las figuras 11A y B muestran que los ganglios linfáticos de drenaje y el bazo de ratones C57BL o BALB/c que recibieron inyecciones i.p. de PDD1/AmB o PDD2/AmB (por consiguiente) se agrandaron significativamente el día 5 tras las inyecciones, mientras que el péptido reordenado (al azar)-dendrímero complejo con AmB no mostró tal efecto. Se muestra claramente un agrandamiento transitorio de los ganglios linfáticos de drenaje y bazos de ratones que recibieron PDD/AmB. La figura 11C muestra el resultado de la producción de IFN $\gamma$  específico de antígeno. Los ratones en grupos de cinco no recibieron inyecciones, recibieron PDD1/AmB o AmB con dendrímero de control, se cocultivaron esplenocitos con plásmidos que albergaban antígenos de *L. major* complejados con PDD1. Se midió IFN $\gamma$  en el sobrenadante después de 48 horas y el grupo que recibió PDD1 (o PDD2) complejo con AmB mostró una producción potenciada de IFN $\gamma$  que indica la producción de inmunidad de células T específica de *L. major*. El panel D de la figura 11 muestra la expresión aumentada de CMH de clase II, un signo de activación de respuestas inmunitarias, en ratones que recibieron PDD/AmB y no en aquellos que recibieron el dendrímero de control más AmB.

Se evaluó la carga de parásitos en los bazos de los ratones tratados el día 21 tras el tratamiento. La detección por QPCR de parásitos en el ADN del bazo de los ratones tratados con AmB/PDD o AmB sola demostró una disminución significativa de las copias de parásitos (parásitos en los 100 mg de bazo) en grupos de ratones que recibieron AmB/PDD frente a los grupos que recibieron AmB sola (1900 parásitos en los 100 mg de bazo).

#### Resumen y discusión

La anfotericina B es un agente eficaz contra la leishmaniosis; sin embargo, el uso de este fármaco puede dar como resultado una toxicidad grave incluyendo, pero sin limitarse a, insuficiencia renal. Alternativamente, AmBisome® (AmB, anfotericina B envuelta en liposomas) presenta una toxicidad reducida y una eficacia mejorada para el tratamiento de la leishmaniosis en seres humanos. Sin embargo, estos beneficios con respecto a la anfotericina B sólo se producen a dosis menores de 5 mg/kg/día. De hecho, AmB se administra por vía intravenosa con especial cuidado a una dosis diaria de 1,0 mg/kg/día y se aumenta gradualmente hasta 5,0 mg/kg/día, según se requiera. Para reducir la dosis eficaz requerida, se requiere una diana de migración dirigida para dirigir el tratamiento a las células infectadas. Los parásitos e *Leishmania* infectan a los fagocitos, incluidos monocitos, macrófagos y células dendríticas, células que expresan moléculas de CMH de clase II. La expresión de CMH de clase II aumenta durante el transcurso de la leishmaniosis, lo que convierte a las células infectadas en una diana superior para un nanoportador de unión a CMH de clase II.

Puesto que las especies de *Leishmania* son parásitos intracelulares obligatorios del sistema fagocítico mencionado anteriormente, el objetivo principal era crear plataformas de nanoportadores de direccionamiento a fagocitos (péptido-dendrímero, PDD y HADD) que pudieran acoplarse a un fármaco tal como AmB para su administración en células fagocíticas usando un péptido de migración dirigida a CMH de clase II. Para esta investigación, se eligió el péptido universal PADRE como el polipéptido de direccionamiento basándose en su potencial para conferir diversas

ventajas, incluida la traslación adicional en seres humanos a la plataforma. Por ejemplo: a) PADRE se une con alta afinidad al complejo de CMH de clase II H2<sup>b</sup>, CMH de clase II de mono y el 95% de HLADR humano, lo que permite una fácil traslación de esta plataforma a la clínica; b) es un antígeno no propio y, por tanto, no lo reconocen las células T reguladoras naturales derivadas del timo, pero proporciona una señal auxiliar.

5 La generación de este sistema de nanoportador se logró mediante el diseño de una plataforma de nanoestructura biodegradable decorada con un péptido de migración dirigida específico de células con una baja sustitución. La plataforma se adaptó para el direccionamiento a los fagocitos a través del péptido de migración dirigida mientras se facilitaba la entrada celular acompañando a una carga útil (por ejemplo, un fármaco contra patógenos). Puesto que los fagocitos expresan CMH de clase II, se concibió el uso de péptidos de unión a CMH que no sólo se dirigen a los macrófagos, monocitos y células dendríticas, sino que también activan las respuestas inmunitarias de células T auxiliares CD4. Este sistema de nanoportador tiene grupos amina cargados positivamente que forman complejos estables con la AmB cargada negativamente y acompañan a AmB directamente a las células fagocíticas *in vivo*. Se crearon dos plataformas de unión a fagocitos portadoras de fármacos usando dos péptidos de unión a CMH de clase II diferentes. El dendrímero se conjugó con o bien PADRE: a(o A)KXVAAWTLKAAa(o A)ZC (SEQ ID NO: 33) dando como resultado dendrímero-PADRE (PDD2) o bien con una hemaglutinina modificada HA110-120: SFERFEIFPKEC (SEQ ID NO: 34) dando como resultado un dendrímero-HA (PDD1). Para examinar la capacidad de direccionamiento de las plataformas, se usaron ratones tanto BALB/c como C57BL/6 (alelos H2b y H2d de CMH, respectivamente). Puesto que el péptido HA se une específicamente a CMH de clase II de ratones BALB/c que son susceptibles a *L. major*, se seleccionó esta plataforma inicialmente para los estudios de leishmaniasis terapéuticos. Los estudios terapéuticos se realizaron inicialmente usando este HA-dendrímero (PDD1) en ratones que portaban lesiones mayores de 20 mm<sup>2</sup>. La plataforma de PDD2 está decorada con PADRE, un epítipo de células T auxiliares universal promiscuo que se une a DC/fagocitos de una gama más amplia de especies, incluidos los ratones, en particular C57BL/6 (se sabe que PADRE tiene una mejor afinidad de unión a H2d que al alelo H2b), primates no humanos y seres humanos mediante la unión a su molécula de CMH de clase II. Por tanto, el péptido-dendrímero (PDD) es un candidato ideal para la traslación a seres humanos. En este caso, se evaluó la capacidad de PDD para el direccionamiento a macrófagos, monocitos y células dendríticas *in vivo* e *in vitro* en ratones C57BL/6, e *in vitro* en primates no humanos y seres humanos. Tanto las plataformas de HA-dendrímero (PDD1) como de PDD2 se usaron para estudiar las administraciones específicas en un modelo de leishmaniasis cutánea en ratones susceptibles, BALB/c. Tanto el PDD1 como el PDD2 se dirigen a fagocitos, transportan su cargamento a estas células, activan las células T auxiliares CD4 y actúan como adyuvante para potenciar las respuestas inmunitarias.

Puesto que la afinidad de PADRE por H2<sup>d</sup> no está bien establecida en la bibliografía, se diseñó un dendrímero-péptido usando HA que se une con una alta afinidad a H2<sup>d</sup> (fondo de BALB/c). Usando un modelo murino para la infección por *Leishmania major*, los presentes resultados muestran que esta nueva plataforma de nanopartículas puede acompañar su carga a las células fagocíticas, incluidos los macrófagos y las células dendríticas. Se observó eficacia en la reducción de los tamaños tamaño de lesión a una dosis cinco veces menor que la dosis eficaz convencional. También mejoró la cinética del tratamiento. La utilización de la plataforma PDD-AmB permite reducir la dosis eficaz y la frecuencia de las administraciones de fármacos, de manera concomitante con una toxicidad asociada a AmB reducida, lo que hace que esta plataforma sea candidata para la aplicación en ensayos clínicos en seres humanos.

Los hallazgos previos han demostrado que los agentes inmunopotenciadores tales como ligandos de diversos receptores tipo Toll (TLR) pueden usarse como agentes profilácticos y/o terapéuticos para diversas enfermedades infecciosas; ejemplos son isatoribina y ANA975 (TLR-7), CpG de clase C, IMO-2125 (TLR-9), MPL (TLR-4), imiquimod (TLR-4), resiquimod (TLR7/8), poli I:poli C12U (TLR3) y E5564 o TAK-242 (TLR-4). Sin embargo, estas terapias actúan a través de la activación de componentes del sistema inmunitario innato, mientras que el uso de complejos de PDD no sólo ofrece la administración dirigida de fármacos sino que también potencia la inmunidad adaptativa de una manera igualmente dirigida. Las nanopartículas portadoras de fármacos de PDD se dirigen indiscriminadamente a los fagocitos en ratones, primates no humanos, ratas y seres humanos, lo que hace que la plataforma sea un candidato ideal para estudios traslacionales que involucren la administración generalizada de fármacos a los fagocitos. En el presente documento se describe un uso novedoso para tales sistemas de administración de nanopartículas; además del direccionamiento a las células fagocíticas CMH II+, este nanoportador permite de manera concomitante la estimulación de respuestas inmunitarias adaptativas. Sin embargo, en algunas realizaciones, las composiciones y los métodos de PDD descritos en el presente documento pueden combinarse con uno o más de los ligandos descritos en el presente documento (por ejemplo, TLR-7, TLR-9, TLR-4, TLR7/8, TLR3, etc.) para tratar a un sujeto que lo necesita.

Los parásitos de *Leishmania* usan fagocitos mononucleares como reservorios. Los nanovehículos portadores de AmB descritos en el presente documento (PDD y HADD) se dirigieron eficazmente a los fagocitos y dieron como resultado i) dosis eficaz de AmB reducida, ii) cinética de respuesta potenciada, iii) toxicidad disminuida y, finalmente, iv) efectos inmunopotenciadores que ayudan al huésped a preparar respuestas específicas de células T anti-*Leishmania*.

En resumen, los parásitos de *Leishmania* usan fagocitos como reservorios. Los nanovehículos portadores de AmB descritos en el presente documento (PDD) se dirigen eficazmente a los fagocitos y dan como resultado i) una dosis eficaz de AmB reducida, ii) una rapidez potenciada de la respuesta, iii) una toxicidad reducida y iv) efectos

inmunopotenciadores que ayudan al huésped a preparar respuestas de células T anti-*Leishmania*.

#### Ejemplo 2 - Terapias oculares

Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden usarse en aplicaciones oculares terapéuticas. En aplicaciones oculares, las composiciones pueden administrarse de manera tópica o por vía intravítrea. Muchas, si no todas, las infecciones descritas en el presente documento tienen afectación ocular y, por tanto, una terapia local usando los métodos y composiciones descritos en el presente documento sería de enorme utilidad. Los ejemplos de estados oculares que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen la queratitis micótica (específica para anfo) y otras infecciones relevantes de los ojos relacionadas con organismos intracelulares tales como toxoplasmosis, ceguera de los ríos (oncosarquiiasis), CMV y herpes (por ejemplo, VHS y HZO).

#### 10 Ejemplo 3 - Fármacos basados en liposomas en el mercado y en ensayos clínicos.

Basándose en la capacidad del dendrímero para unirse a clases específicas de lípidos en el liposoma y el uso general de sólo unos pocos tipos de lípidos en estas formulaciones, se abarcan todos los fármacos o bien aprobados o bien en desarrollo. Se espera que los fármacos con composiciones lipídicas similares a Ambisome se unan y dirijan. Véanse las figuras 14 y 15 que incluyen tablas que enumeran ejemplos de algunos de los fármacos que pueden administrarse usando las composiciones y los métodos descritos en el presente documento.

Ejemplo 4: Un nanoportador dirigido y con adyuvante reduce la dosis eficaz de anfotericina B liposomal y potencia la inmunidad adaptativa en la leishmaniosis cutánea murina

En el presente documento se describe un uso novedoso de un nanoportador de péptido-dendrímero que se ha demostrado que se dirige al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II) expresado en APC humanas y de ratón (por ejemplo, macrófagos y células dendríticas) (Daftarian *et al.*, Peptide-conjugated PAMAM dendrimer as a universal platform for antigen presenting cell targeting and effective DNA-based vaccinations, Cancer Research 2011). La plataforma usa un epítipo de unión a Pan-DR (PADRE) como su resto de migración dirigida a APC. PADRE es un determinante de Th CD4<sup>+</sup> promiscuo que se une a la mayoría de las moléculas de CMH II humanas y murinas, y se ha usado previamente como adyuvante para potenciar las respuestas del sistema inmunitario en muchos estudios, incluidos ensayos en seres humanos. El direccionamiento a APC es un uso novedoso de epítopos de células T auxiliares universales tales como PADRE. Los dendrímeros derivatizados con PADRE (PDD) han dado como resultado un direccionamiento eficaz de ADN a APC para la vacunación basada en genes. Puesto que *Leishmania* son parásitos intracelulares obligatorios, se requieren respuestas de células T e inmunidad mediada por células Th1 para el control de la infección y células Th1 CD4<sup>+</sup>, en particular, son indispensables para la resistencia. Por tanto, se razonó que PDD, un nanoportador que direcciona a APC y provoca una respuesta Th1, debería poder transportar LAmB a la fuente de infección (macrófagos) al tiempo que potenciaría las respuestas inmunitarias adaptativas Th1.

El nanoportador notificado en el presente documento es un dendrímero de poliamidoamina de 5<sup>a</sup> generación (PAMAM) acoplado a PADRE (PADRE-dendrímero o PDD1). También se diseñó una plataforma alternativa de epítipo de células T auxiliares-dendrímero específica para ratones BALB/c en la que se conjugó un epítipo de células T auxiliares de la molécula de hemaglutinina (HA) del virus influenza (PDD2). Ambas plataformas tienen carga positiva y pueden unirse a fármacos con una carga neta negativa y protegerlos frente a la degradación (Daftarian *et al.*, Peptide-conjugated PAMAM dendrimer as a universal platform for antigen presenting cell targeting and effective DNA-based vaccinations, Cancer Research 2011; Medina SH, El-Sayed MEH. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. Chem Rev 2009; 109:3141-57). Aunque PDD2 sólo se une a APC que portan el haplotipo H-2<sup>d</sup> (BALB/c), PDD1 puede unirse a CMH II en APC de seres humanos y ratones. Adicionalmente, puesto que las células T CD4<sup>+</sup> desempeñan un papel vital en la generación de células T CD8<sup>+</sup>, así como las respuestas inmunitarias humorales, se planteó la hipótesis de que la actividad adyuvante intrínseca de la administración de fármacos de PDD puede inducir inmunidad adaptativa anti-*Leishmania* en un entorno terapéutico en el que se producen antígenos de *Leishmania* en el sitio de infección (figura 2). Por tanto, en un huésped infectado, PDD1 o PDD2 pueden convertir la infección en una vacuna terapéutica al inducir una respuesta inmunitaria en APC en el sitio de la infección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Conjugación de péptidos con dendrímeros y caracterización de productos

Se usaron los siguientes péptidos (21st Century Biochemicals, Inc.): epítipo de unión a Pan-HLA-DR (PADRE): a(o A)KXVAAWTLKAAa(o A)ZC (SEQ ID NO: 33); HA110-120 derivada de hemoagglutinina de virus influenza: SFERFEIFPKEC (SEQ ID NO: 34) (HA), que es un péptido restringido a H2-I-Ed que puede usarse en BALB/c. Se usó un tercer péptido, compuesto por aminoácidos reordenados aleatoriamente, para una nanopartícula de control (péptido al azar-dendrímero de control o ScrDR). Los conjugados péptido-dendrímero se produjeron y caracterizaron tal como se describió anteriormente (Daftarian *et al.*, Peptide-conjugated PAMAM dendrimer as a universal platform for antigen presenting cell targeting and effective DNA-based vaccinations, Cancer Research 2011; véase la figura 12 y la sección de métodos).

Complejacion de PDD/LAmB o PDD/LAmB-rodamina

Véase la figura 20.

Análisis por dispersión dinámica de luz (DLS).

5 Se detectaron las nanopartículas usando un instrumento de dispersión dinámica de luz/dimensionamiento molecular Malvern Zetasizer Nanaoeries con un láser de argón (Nano-ZS90). Se hizo funcionar el instrumento con una resolución de uso general. Para la determinación del tamaño, se seleccionó agua como dispersante. Se permitió que se equilibrasen todas las muestras durante 5 segundos antes de la adquisición de datos. Se realizaron mediciones individuales con 20 adquisiciones. Se preparó LAmB complejada con o bien PDD1 o bien PDD2 en agua o solución salina normal. Se analizaron los tamaños después de incubación durante 20 min a temperatura ambiente usando el  
10 instrumento de dispersión dinámica de luz/dimensionamiento molecular Malvern Zetasizer Nanaoeries con longitud de onda de láser de argón  $\lambda = 830$  nm, ángulo del detector de  $90^\circ$ . Los experimentos de dispersión de luz se llevaron a cabo usando al menos 20 lecturas independientes de 10 s de duración. Los datos representados gráficamente representan un promedio de 6 ejecuciones de DLS.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

15 Se produjeron preparaciones de la nanopartícula, la nanopartícula y AmB, y el complejo se añadió a la población de células. Cada uno se conservó en una disolución de formaldehído al 2% y se diluyó 1:10 en agua destilada. Se colocó una gota de cada muestra en una rejilla de cobre de 200 de malla recubierta con carbono y nitrocelulosa y se permitió que se secase al aire. Se examinaron luego las rejillas con aumentos de hasta 245.000X en un TEM Philips CM-10. Se tomaron imágenes de cada preparación usando una cámara digital Gatan.

20 Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad se realizó en células Hep2 y se evaluó usando el ensayo MTT.

Evaluación del direccionamiento celular específico y la internalización celular.

25 La captación por macrófagos *in vivo* de LAmB-Rh y los complejos de PDD (PDD1 o PDD2)/LAmB-Rh a las razones especificadas también se evaluaron. Después de recibir inyecciones i.p. de LAmB-Rh o PDD/LAmB-Rh, se sacrificaron ratones y se recogieron macrófagos de la cavidad peritoneal tal como se describe en los materiales y métodos. Los macrófagos peritoneales murinos o bien eran residentes o bien se indujeron tal como se describe. Se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia confocal para analizar la unión de los complejos a las células. Se usó un microscopio confocal para examinar la distribución de fluorescencia mediante secciones en z.

30 Producción y recogida de macrófagos peritoneales.

Los macrófagos peritoneales se produjeron de la siguiente manera: a ratones hembra BALB/c o C57BL de 8 semanas de edad se les administraron 1,5 ml de tioglicolato al 3% estéril por vía i.p. y se sacrificaron mediante CO<sub>2</sub> en el día 4 de inyección. Los tratamientos con LAmB-Rh +/- PDD o ScrDR se administraron a estos ratones a través de inyección i.p. durante las últimas 2 horas del periodo de producción de 4 días.

35 Ratones e inoculación de *L. major*

40 Para los experimentos *in vivo*, se inyectaron  $1 \times 10^6$  promastigotes metacíclicos por vía intradérmica en el dorso una pulgada delante de la base de la cola de los ratones. El tratamiento se inició una vez que las lesiones tenían entre 20 y 70 mm<sup>2</sup> de tamaño y se administró una vez al día durante 10 días por vía intraperitoneal (i.p.). El control positivo fue LAmB administrada a 37,5 mg/kg/día durante 10 días. Se examinaron los animales diariamente y se observaron signos clínicos de enfermedad. Una vez que se formó una lesión, se monitorizó su tamaño midiendo sus dos diámetros más amplios a intervalos semanales durante 4 semanas. Los tamaños de lesión se compararon con los ratones infectados pero no tratados. Se sacrificaron los animales moribundos o enfermos tal como se describe en el protocolo aprobado por el IACUC de la Universidad de Miami. Todos los estudios con ratones fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC, por sus siglas en inglés) en la Facultad de Medicina Miller de la Universidad de Miami, y todos los animales se alojaron en instalaciones aprobadas por la Asociación Americana para la Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio.

ELISA de IFN- $\gamma$

50 Debido a la capacidad de las células T auxiliares universales para unirse a CMH de clase II, recientemente se ha usado una plataforma de nanopartículas para la transfección dirigida de células APC de ratón con ácido nucleico, lo que da como resultado la expresión de la forma nativa del antígeno. En este caso, el resto de direccionamiento a APC es un epítipo I-E<sup>d</sup> de CMH de clase II (H-2-IE<sup>d</sup>), SFEFEIFPKEC (SEQ ID NO: 34) o HA, que se une específicamente a CMH de clase II de BALB/c, expresado en APC de BALB/c. El HA-dendrímero (HADR) se compleja con ADN y lo acompaña a APC. Este método crea una nueva plataforma de inmunomonitorización de

células T que implementa el uso de HADR/ADN (por ejemplo, ADN de plásmido que codifica para antígenos de *L. major*) para generar APC que expresan epítomos específicos de *L. major* para la presentación a las células T, todo en el mismo pocillo. Por tanto, para evaluar las respuestas de células T específicas de antígeno en ratones tratados, se empleó HADR complejado con una mezcla de cuatro plásmidos de ADN que albergan antígenos de *L. major* (KMPII, TRYP, LACK y PAPLE22).

Ratones, 5 por grupo, con lesiones por *L. major* recibieron inyecciones i.p. de PDD/LAmB (dosis baja), Scr DR/LAmB (dosis baja) o L-AmB (dosis completa) durante 10 días. Se aislaron esplenocitos de ratones individuales, se lavaron con medio de cultivo RPMI 1640 complementado con FCS al 10% y penicilina, y se colocaron a  $1 \times 10^6$  células/pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Los esplenocitos de los animales tratados se estimularon con HADR (40  $\mu$ g) complejado con un conjunto de plásmidos (4  $\mu$ g) que codifican para antígenos de *L. major*. HADR (40  $\mu$ g) complejado con pVAV vacío (4  $\mu$ g) se usó como "fondo" en pocillos en paralelo para cada prueba. Se realizaron mediciones de IFN $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos usando un kit de ELISA (R&D Systems, MN) después de que se incubaron las placas a 37°C, el 5% de CO $_2$  durante 48 horas. Se restaron las mediciones de "fondo" de IFN $\gamma$  de todos los datos. Se midió el IFN- $\gamma$  secretado tras la estimulación con plásmidos de HADR/*L. major* usando reactivos de ELISA. En este estudio se usaron el plásmido de control (Invitrogen Life Technologies) y pVAX con 4 genes de antígenos de *L. major* insertados (proporcionados por el profesor Jordi Alberola Domingo, LeishLAB Universitat Autònoma de Barcelona, España). En resumen, después de mezclar 40  $\mu$ g de HADR con los cuatro plásmidos codificantes de *L. major* (total de 4  $\mu$ g, 1  $\mu$ g de cada plásmido) o con el plásmido de control (vector vacío, 4  $\mu$ g), se dejaron los tubos a temperatura ambiente durante 20 min para formar el complejo. Todos los complejos HADR/plásmido se produjeron en solución salina. Se cocultivaron esplenocitos con complejos HADR/ADN y se realizó ELISA de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de los cultivos 48 horas tras la estimulación.

#### Amplificación por PCR en tiempo real

Se detectó ADN de *Leishmania* en muestras de tejido mediante PCR en tiempo real. En resumen, se diseñaron el cebador directo, el cebador inverso y la sonda Taq-Man MGB para el direccionamiento a regiones de ADN conservadas del ADN del minicirculo de cinetoplasto de *Leishmania sp.* Se usaron como referencia interna los reactivos de ensayo TaqMan desarrollados con 18SRNAP eucariotas (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada amplificación se realizó por triplicado en un volumen de reacción de 25  $\mu$ l (mezcla maestra de CR TaqMan Universal; Applied Biosystems). El perfil de ciclos térmicos fue de 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos a 95°C durante 15 s, seguido de 60°C durante 1 min. Se determinó la carga de ADN de *Leishmania* en cada muestra mediante cuantificación relativa usando el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los resultados se expresan como x veces más de copias de ADN que la muestra del calibrador. El calibrador era una muestra de adiciones conocidas con un número conocido de parásitos.

#### Análisis estadístico

Se realizó análisis de la varianza de un factor entre grupos (ANOVA) después de la evaluación de la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizó un análisis *post-hoc* por parejas usando la prueba de Holm-Sidak o la prueba de Dunn. Se usó ANOVA a rangos si la muestra no presentaba una distribución normal. Se usó la prueba de la t de Student para comparar dos grupos. Se usó análisis de rangos logarítmicos de Kaplan Meier seguido de análisis *post-hoc* de Holm-Sidak para evaluar las diferencias en la supervivencia entre grupos.

## RESULTADOS

### 40 Caracterizaciones de complejos PDD/LAmB

PDD, cargado positivamente, y LAmB, cargada negativamente, se complejan fácilmente en disolución. La formación del complejo PDD-LAmB se confirmó usando análisis por TEM y DLS (figuras 16A y B). Se analizaron el tamaño de los complejos PDD, LAmB y PDD/LAmB por TEM y DLS. Se observó que la muestra de PDD tenía un diámetro de ~11,7 nm (99,9%) mientras que LAmB tenía un tamaño de 124,2 nm. El ensamblaje electrostático de los dos dio como resultado el complejo PDD-LAmB de tamaño de 141,8 nm. El tamaño esperado del complejo (~147,6 nm) y los datos de DLS coincidieron estrechamente confirmando la formación del complejo PDD/LAmB estable. Del mismo modo, los resultados obtenidos por DLS se corroboran por las micrografías de TEM. Se usó una razón de 1:10 (LAmB:PDD) en estos estudios basándose en el trabajo previo. Esta razón ha dado como resultado un transporte eficiente del cargamento y está asociada con una fuerte actividad inmunopotenciadora no tóxica. El TEM muestra claramente que LAmB está decorada con múltiples moléculas de PDD (figura 16A).

### Direccionamiento a macrófagos *in vivo* no tóxico

A continuación, LAmB se marcó con rodamina B, un fluorocromo cargado positivamente (figura 20A), y se complejó el producto (LAmB-Rh) con PDD en una razón en peso de 1:10 (LAmB-Rh:PDD). Se inyectaron por vía i.p. PDD-LAmB y PDD-LAmB-Rh en ratones MAFIA C57BL/6 que expresan GFP sólo en macrófagos. Los ratones de control recibieron LAmB sola o LAmB complejada con PAMAM-dendrúmero acoplado a un péptido al azar no dirigido (ScrDD-LAmB). El líquido peritoneal se aspiró una hora después de la inyección i.p. y se lavaron las células y se analizaron por citometría de flujo y microscopía confocal. El análisis por citometría de flujo demostró que el

porcentaje de macrófagos positivos para rodamina B fue significativamente mayor en ratones tratados con PDD-LAmB-Rh que aquellos que recibieron o bien Rh-LAmB o bien ScrDR-Rh-LAmB (figura 17A). El direccionamiento a macrófagos *in vivo* por PDD/LAmB-Rh (30% +/- 5%) fue significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) que el de LAmB-Rh (7,0% +/- 3,7%). Además, los macrófagos examinados con un microscopio confocal, usando cortes de 0,5 micrómetros, revelaron que en 1 hora, PDD/LAmB-Rh estaba en la célula (figura 17B). La toxicidad *in vitro* de LAmB y PDD/LAmB en células HEPG2 también se analizó ampliamente. Tal como se muestra en la figura 17C, PDD redujo significativamente la toxicidad de LAmB. PDD reduce la toxicidad de LAmB mediante la reducción de la dosis y la reducción del direccionamiento fuera de diana.

#### Eficacia en modelo animal

Se usaron PDD-LAmB y los controles descritos anteriormente en un modelo de ratón de terapia para infección cutánea por *L. major*. Se inocularon ratones BALB/c hembra por vía intraperitoneal con  $1 \times 10^6$  promastigotes metacíclicos de *L. major* (clon VI (MHOM/IL/80/Friedlin). El tratamiento se inició una vez que las lesiones alcanzaron un área superficial de entre 20 y 70 mm<sup>2</sup>. Los ratones recibieron inyecciones intravenosas de LAmB (37,5 mg/kg/día, la dosis completa), LAmB (dosis baja de 6,25 mg/kg/día), PDD-LAmB (dosis baja de 6,25 mg/kg/día con PDD, o el 16,7% de la dosis completa), o ScrDR-LAmB (6,25 mg/kg/día o el 16,7% de la dosis completa) una vez al día durante 10 días consecutivos. La figura 18A muestra que la terapia con PDD/LAmB a dosis baja fue tan eficaz como la de LAmB a dosis completa. Las lesiones cutáneas de los dos grupos tenían un tamaño comparable a pesar de las diferentes dosis de LAmB (figura 18A). Este hallazgo demuestra que el PDD conjugado con LAmB potenció la eficacia del tratamiento con LAmB en al menos 6 veces (figura 18A), lo que concuerda con un direccionamiento *in vivo* aumentado de macrófagos en la cavidad peritoneal (figura 17A). El tratamiento con PDD-LAmB dio como resultado el cierre de lesiones cutáneas en el 100% de los ratones tratados (figura 18A). La observación de que el tratamiento con LAmB a dosis baja con nanopartículas no dirigidas (ScrDD-LAmB) no tiene ningún efecto del tratamiento sugiere fuertemente que se requiere PDD para aumentar la eficacia del fármaco y reducir la dosis requerida de LAmB presumiblemente dirigiendo LAmB a los macrófagos. Además, la cinética del cierre de lesiones cutáneas demostró claramente que la conjugación de PDD aceleró los efectos terapéuticos de LAmB (17A y figura 21). Aunque la dosis completa de LAmB requirió > 12 días para reducir el tamaño de lesiones cutáneas, el tratamiento con el complejo PDD-LAmB que contiene sólo el 16,7% de la dosis de LAmB condujo a una mejora notable de las lesiones cutáneas sólo después de unos pocos días de tratamiento (figura 17A y figura 21). Curiosamente, la amplificación por PCR en tiempo real y el análisis de la carga de parásitos [17], en el bazo, mostraron que los ratones tratados con PDD-LAmB tenían una carga de parásitos significativamente menor ( $p < 0,005$ ) que los tratados con LAmB (figura 18B) que representa una reducción de ~86% en la carga de parásitos.

El complejo PDD-LAmB potenció las respuestas inmunitarias a la infección por *L. major*

En comparación con el tratamiento con LAmB, la terapia con PDD-LAmB dio como resultado el agrandamiento del ganglio linfático de drenaje (figura 19A). Además, el bazo de los ratones tratados con PDD-LAmB era notablemente más grande que el de los ratones tratados con ScrDR-LAmB (figura 19B). Se sabe que potentes inmunoterapias o vacunaciones con adyuvante dan como resultado un agrandamiento transitorio del bazo y los ganglios linfáticos en ratones, lo que se asocia con una respuesta de tipo Th1. Además, la expresión de CMH II en células aisladas de los ganglios linfáticos del área dorsal proximales a la lesión cutánea fue estadísticamente mayor en ratones tratados con PDD-LAmB que en ratones tratados con LAmB y ScrDR-LAmB (figura 19C,  $p < 0,002$ ). Finalmente, se aislaron los esplenocitos de los ratones tratados con LAmB a dosis completa o aquellos que recibieron LAmB a dosis baja (1/6<sup>a</sup> parte de la dosis completa) complejada con o bien ScrDR (nanopartícula de control) o bien con PDD, doce días tras los tratamientos. Estos esplenocitos se cocultivaron luego con un complejo que se componía de HADR y plásmidos que expresan el gen de *L. major* (o HADR/pVAX vacío) seguido de la medición de IFN $\gamma$  en los sobrenadantes de los esplenocitos después de incubación durante 48 horas. Al transfectar selectivamente las APC en el cultivo de esplenocitos, este nuevo método de inmunomonitorización de células T permite la medición de respuestas de células T específicas de antígeno. Este método de transfección *in vitro* usa el repertorio peptídico completo de proteínas de *L. major* seleccionadas como fuente de antígeno, lo que permite la detección de la reacción inmunitaria contra epítomos de *L. major* tanto conocidos como desconocidos. La figura 19D muestra que el tratamiento con PDD-LAmB condujo a una potenciación sustancial de inducción de IFN $\gamma$  específica de *L. major* a partir de esplenocitos estimulados con antígeno en comparación con LAmB a dosis completa ( $p < 0,0001$ ) o control ( $p < 0,0002$ ).

Después de la unión de CMH II a péptidos endógenos, los complejos péptido-CMH II se transportan a la superficie celular, donde los péptidos se presentan a células T CD4<sup>+</sup>. *Leishmania sp.* inhibe la presentación de antígeno al interferir con la regulación por incremento de CMH II de las moléculas de CMH II. Por tanto, se han examinado la expresión aumentada de CMH II y la expansión de células T CD4<sup>+</sup> como enfoque terapéutico en el tratamiento de la leishmaniosis. En el presente documento, se muestra que la potenciación mediada por PDD de la expresión de CMH II y la estimulación de células T CD4<sup>+</sup> están asociada con la producción de respuestas de células T específicas de parásitos. De hecho, las respuestas de células T auxiliares 2, la supresión inmunitaria mediada por macrófagos y los defectos en la presentación de antígeno son mecanismos subyacentes que se usan para evadir el sistema inmunitario en la leishmaniosis, lo que da como resultado una carga de parásitos aumentada en tejidos tales como el bazo. Se mostró que los efectos inmunopotenciadores de PDD, en particular en células infectadas por *L. major*, inducen i) linfadenopatía y expansión y tráfico de células dendríticas (figuras 19A y 19B), ii) expresión de CMH II potenciada en células en el ganglio linfático de drenaje (figura 19C), lo que indica activación celular y presentación

de antígeno aumentada, iii) y lo más importante, la elevación de las respuestas de células T específicas de parásitos (figura 19D).

5 Los datos presentados en el presente documento proporcionan evidencia de que el PDD reduce la dosis eficaz de LAmB en ~80% mientras que también muestra una eficacia más rápida y una menor toxicidad. PDD se une a LAmB y lo acompaña selectivamente a células reservorio de parásitos (fagocitos) mientras que su péptido universal de células T auxiliares CD4<sup>+</sup> intrínseco proporciona "AYUDA" para la inmunidad adaptativa del huésped, lo que da como resultado un aumento espectacular de respuestas de células T específicas de antígeno de *L. major*.

#### Otras realizaciones

10 Cualquier mejora puede realizarse en parte o en la totalidad de las composiciones, kits, plataformas y etapas de método. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, pretende aclarar la invención. Por ejemplo, aunque los experimentos descritos en el presente documento implican el tratamiento de infección por *Leishmania*, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden encontrar uso en varias otras aplicaciones terapéuticas y profilácticas, incluyendo inducir una respuesta inmunitaria y, por tanto, inmunidad contra cualquier antígeno de interés (por ejemplo, antígenos de patógenos infecciosos). Adicionalmente, la plataforma de nanoportador de dendrímero derivatizado con péptido (PDD) descrita en el presente documento puede complejarse con un ácido nucleico, un polipéptido o un péptido en lugar de un fármaco (por ejemplo, un compuesto) para tratar los trastornos y las enfermedades descritos en el presente documento (por ejemplo, infección por *Leishmania*).

#### Lista de secuencias

20 <110> UNIVERSIDAD DE MIAMI

<120> NANOPORTADORES DE FÁRMACOS DE POTENCIACIÓN INMUNITARIA Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN Y USO DE LOS MISMOS

<130> P13957WO/EP

<140>

25 <141>

<150> Documento 61/788.666

<151> 15-03-2013

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Ciclohexilalanina

40 <400> 1

Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
5 <400> 2  
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5  
<210> 3  
<211> 4  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
<400> 3  
Gly Phe Leu Gly  
1  
15 <210> 4  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
<220>  
<223> Ac N-term.  
<220>  
<221> MOD\_RES  
25 <222> (1)..(1)  
<223> D-alanina  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
30 <223> Ciclohexilalanina  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (14)..(14)  
<223> D-alanina  
35 <220>  
<221> MOD\_RES

- <222> (15)..(15)  
 <223> Ácido aminohexanoico  
 <220>  
 <223> C-term OH
- 5 <400> 4  
 Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Ala Xaa Cys  
 1 5 10 15  
 <210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES
- 15 <222> (1)..(1)  
 <223> D-alanina  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)
- 20 <223> Ciclohexilalanina  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> D-alanina
- 25 <400> 5  
 Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 <210> 6  
 <211> 13  
 <212> PRT
- 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES
- 35 <222> (1)..(1)  
 <223> D-alanina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> D-alanina  
 5 <400> 6  
 Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 <210> 7  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> D-alanina  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 20 <223> D-alanina  
 <400> 7  
 Ala Lys Tyr Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 <210> 8  
 <211> 13  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>  
 30 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-alanina  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (13)..(13)  
 <223> D-alanina

<400> 8

Ala Lys Phe Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10

<210> 9

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

10 <221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-alanina

<220>

<221> MOD\_RES

15 <222> (3)..(3)

<223> Ciclohexilalanina

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)..(13)

20 <223> D-alanina

<400> 9

Ala Lys Ala Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10

<210> 10

<211> 13

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

30 <221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-alanina

<220>

<221> MOD\_RES

35 <222> (13)..(13)

<223> D-alanina

<400> 10

Ala Lys Tyr Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1                      5                      10

<210> 11

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>

10 <221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-alanina

<220>

<221> MOD\_RES

15 <222> (13)..(13)

<223> D-alanina

<400> 11

Ala Lys Phe Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1                      5                      10

<210> 12

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> D-alanina

<220>

30 <221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Ciclohexilalanina

<220>

<221> MOD\_RES

35 <222> (13)..(13)

<223> D-alanina

<400> 12  
**Ala Lys Ala Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala**  
 1                    5                    10

<210> 13  
 <211> 13  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>

10 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-alanina  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

15 <222> (13)..(13)  
 <223> D-alanina  
 <400> 13  
**Ala Lys Tyr Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala**  
 1                    5                    10

<210> 14  
 20 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-alanina  
 <220>

30 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> D-alanina  
 <400> 14  
**Ala Lys Phe Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala**  
 1                    5                    10

35 <210> 15

<211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-alanina  
 10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ciclohexilalanina  
 <220>  
 15 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> D-alanina  
 <400> 15  
**Ala Lys Ala Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala**  
**1 5 10**  
 20 <210> 16  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> D-alanina  
 30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)..(13)  
 <223> D-alanina  
 <400> 16  
**Ala Lys Tyr Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala**  
**1 5 10**  
 35 <210> 17

<211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ciclohexilalanina  
 10 <400> 17  
 Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 <210> 18  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <400> 18  
 Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 20 <210> 19  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <400> 19  
 Ala Lys Tyr Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 <210> 20  
 <211> 13  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <400> 20  
 35 Ala Lys Phe Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10

<210> 21  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)

10 <223> Ciclohexilalanina  
 <400> 21  
 Ala Lys Ala Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 <210> 22  
 <211> 13

15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <400> 22  
 Ala Lys Tyr Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10

20 <210> 23  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <400> 23  
 Ala Lys Phe Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 <210> 24

30 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Ciclohexilalanina  
 <400> 24  
 Ala Lys Ala Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 5 1 5 10  
 <210> 25  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <400> 25  
 Ala Lys Tyr Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 <210> 26  
 15 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 20 <400> 26  
 Ala Lys Phe Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 <210> 27  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 30 <222> (3)..(3)  
 <223> Ciclohexilalanina  
 <400> 27  
 Ala Lys Ala Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10  
 <210> 28  
 35 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 28

Ala Lys Tyr Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala  
 1 5 10

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 29

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser  
 1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu  
 20

15 <210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 30

Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn Ser Ser Ile Gly Leu Ile Met  
 1 5 10 15

<210> 31

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 31

Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met Gln  
 1 5 10

30 <210> 32

<211> 15

<212> PRT

ES 2 776 201 T3

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
<400> 32  
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
5 1 5 10 15  
<210> 33  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
15 <223> D-alanina o alanina  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> Ciclohexilalanina  
20 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)..(13)  
<223> D-alanina o alanina  
<220>  
25 <221> MOD\_RES  
<222> (14)..(14)  
<223> Ácido aminocaproico  
<400> 33  
Ala Lys Ala Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Xaa Cys  
1 5 10 15  
30 <210> 34  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
35 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético  
<400> 34

ES 2 776 201 T3

Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Cys  
1                    5                                    10

## REIVINDICACIONES

1. Composición para su uso en terapia, comprendiendo la composición al menos un dendrímero al que se ha conjugado al mismo al menos un resto de direccionamiento a CMH II y al menos un fármaco, en el que el al menos un resto de direccionamiento a CMH II se conjuga a la superficie exterior del al menos un dendrímero de tal manera que el al menos un resto de direccionamiento a CMH II se une específicamente a células presentadoras de antígeno (APC), y el al menos un fármaco se encapsula mediante el al menos un dendrímero o conjugado a la superficie exterior del al menos un dendrímero, y en la que el al menos un fármaco es cualquier forma de formulación liposomal unilaminar de anfotericina B.
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el al menos un fármaco se encapsula en un liposoma con una carga neta opuesta a la del al menos un dendrímero, preferiblemente la carga del al menos un dendrímero es negativa y la carga neta del al menos un fármaco y el liposoma es positiva o la carga del al menos un dendrímero es positiva y la carga neta del al menos un fármaco y el liposoma es negativa.
3. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el al menos un resto de direccionamiento a CMH II es un péptido.
4. Composición para su uso según la reivindicación 3, en la que el péptido se une de manera covalente a el al menos un dendrímero.
5. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el al menos un fármaco comprende un liposoma.
6. Composición para su uso según la reivindicación 5, en la que el liposoma se une de manera no covalente a el al menos un dendrímero.
7. Composición para su uso según la reivindicación 1, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
8. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el al menos un resto de direccionamiento a CMH II es un epítipo de células T auxiliares Pan-DR (PADRE).
9. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el al menos un dendrímero es un dendrímero de poliamidoamina (PAMAM).
10. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el agente contra patógenos es eficaz para reducir el crecimiento de o destruir un patógeno seleccionado del grupo que consiste en: *Leishmania*, paludismo, tuberculosis y virus de inmunodeficiencia humana (VIH).
11. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición se usa en el tratamiento de un sujeto que corre el riesgo de contraer o tener una infección por patógeno intracelular, comprendiendo el uso:  
 administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición según la reivindicación 1 para inducir la activación mediada por CMH de clase II de células T auxiliares en el sujeto, e inhibir el crecimiento de o eliminar el patógeno intracelular, en la que administrar la composición al sujeto da como resultado la producción de anticuerpos monoclonales contra el patógeno intracelular.

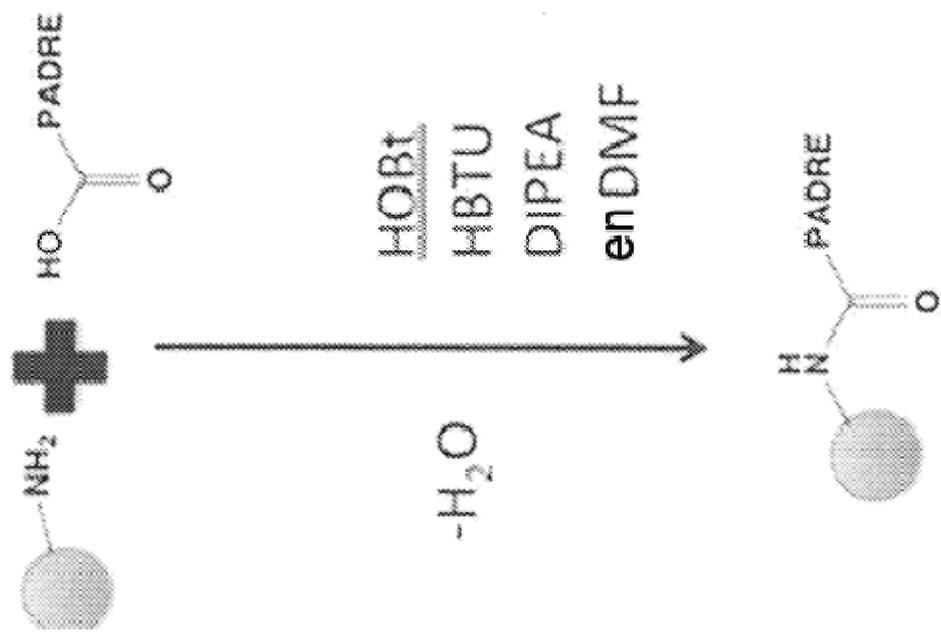
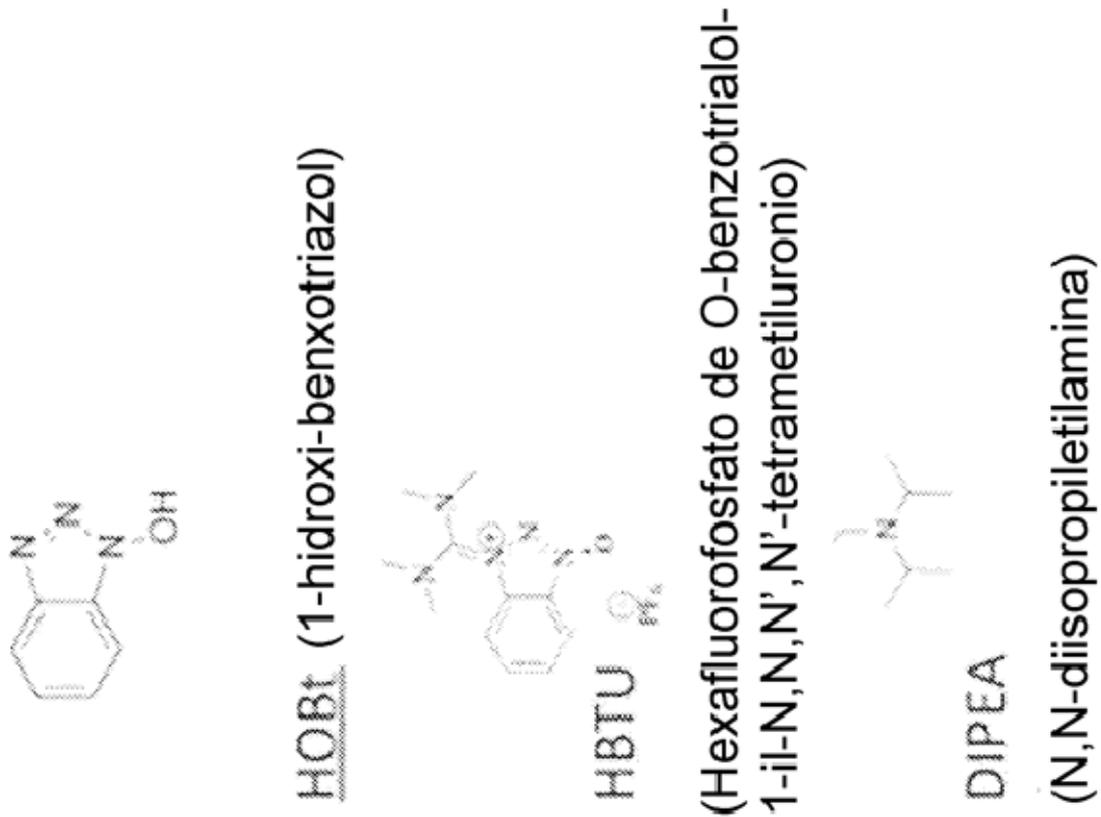


Figura 1.

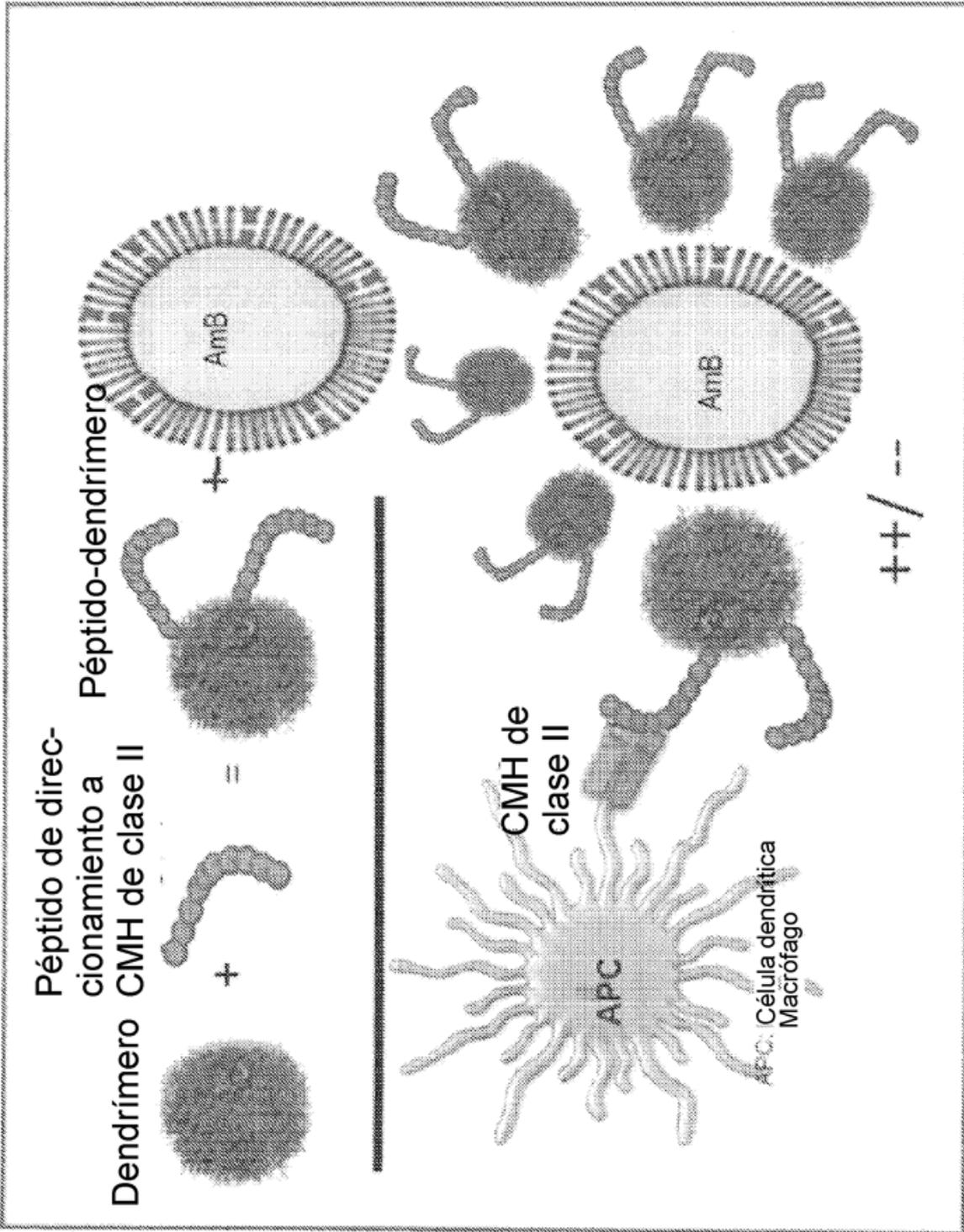


FIG. 2

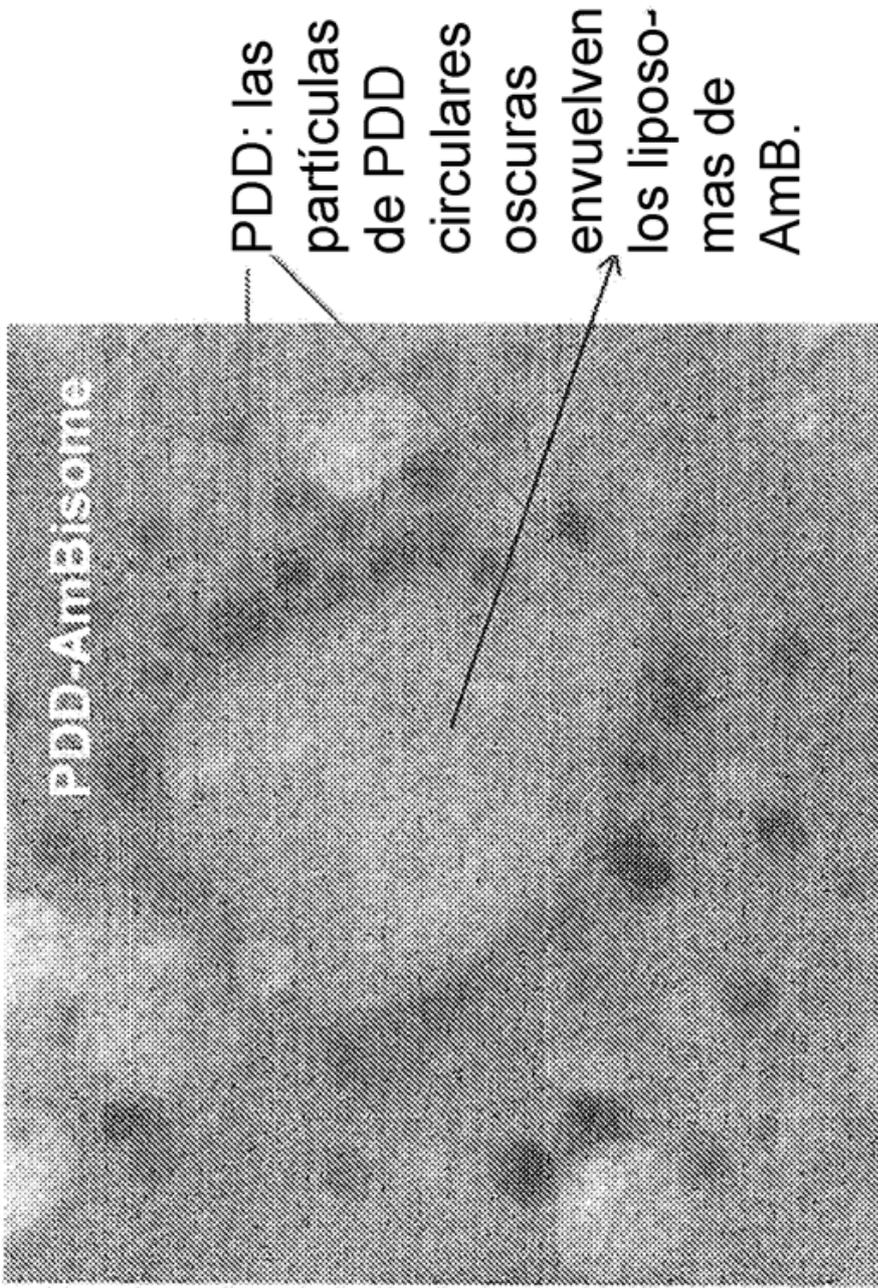


Figura 3.

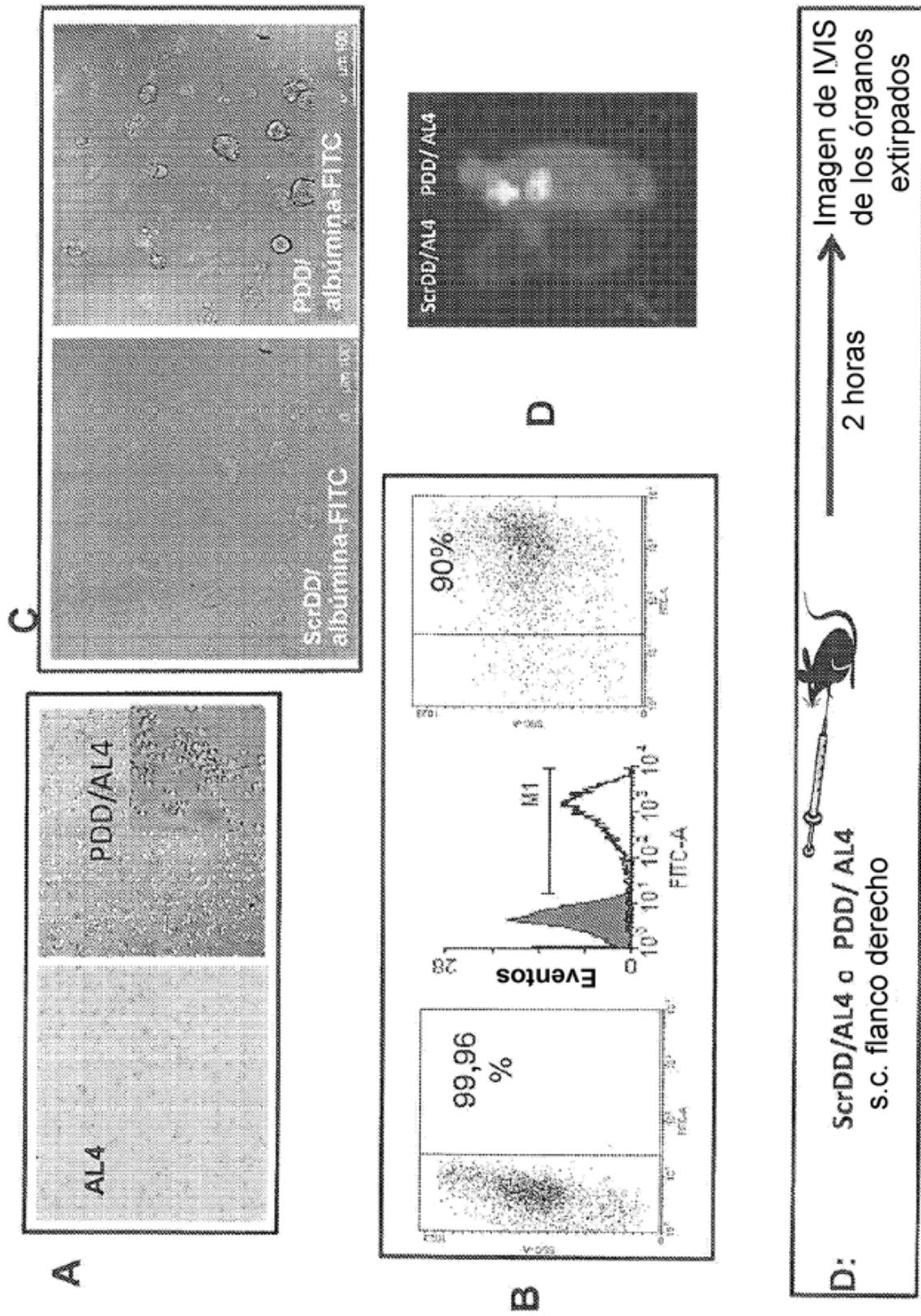


Figura 4.

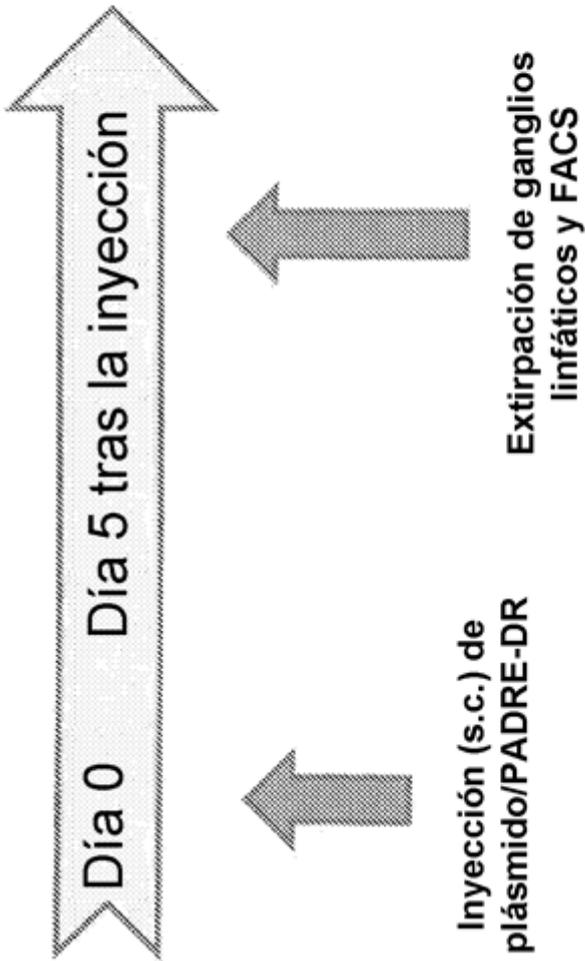
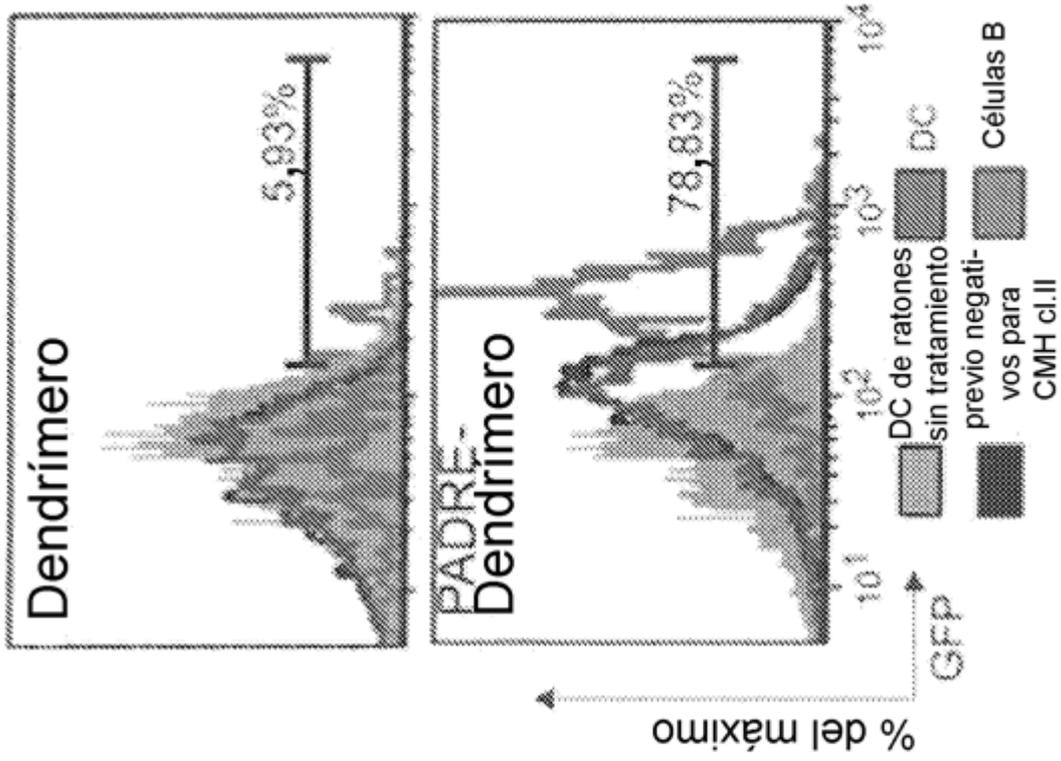


Figura 5A

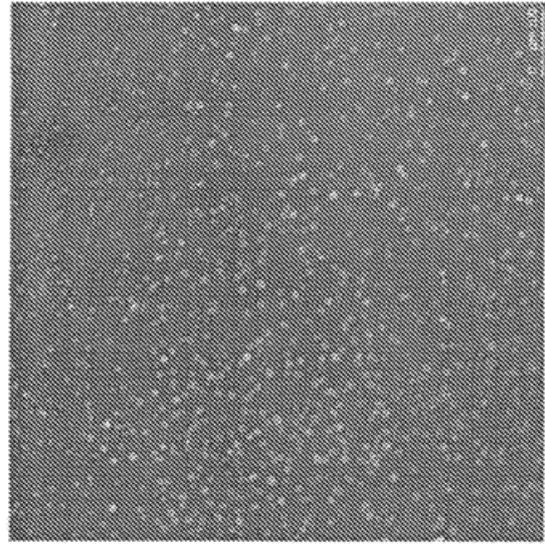
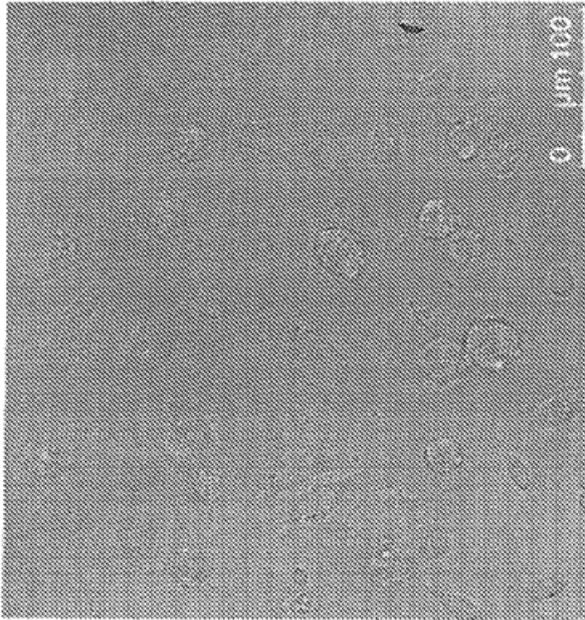
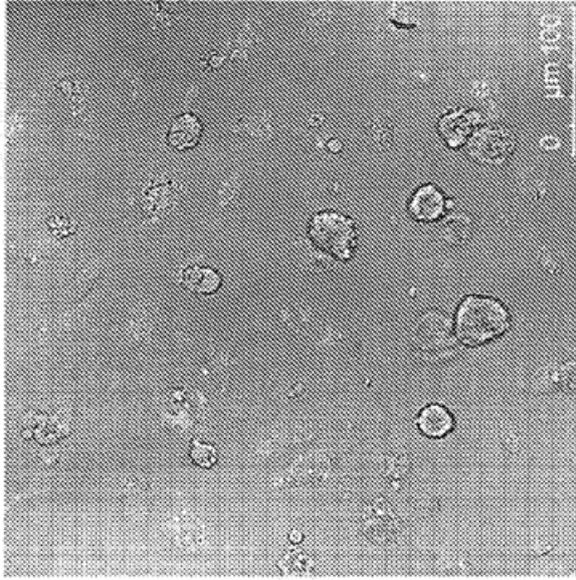


Figura 5 B

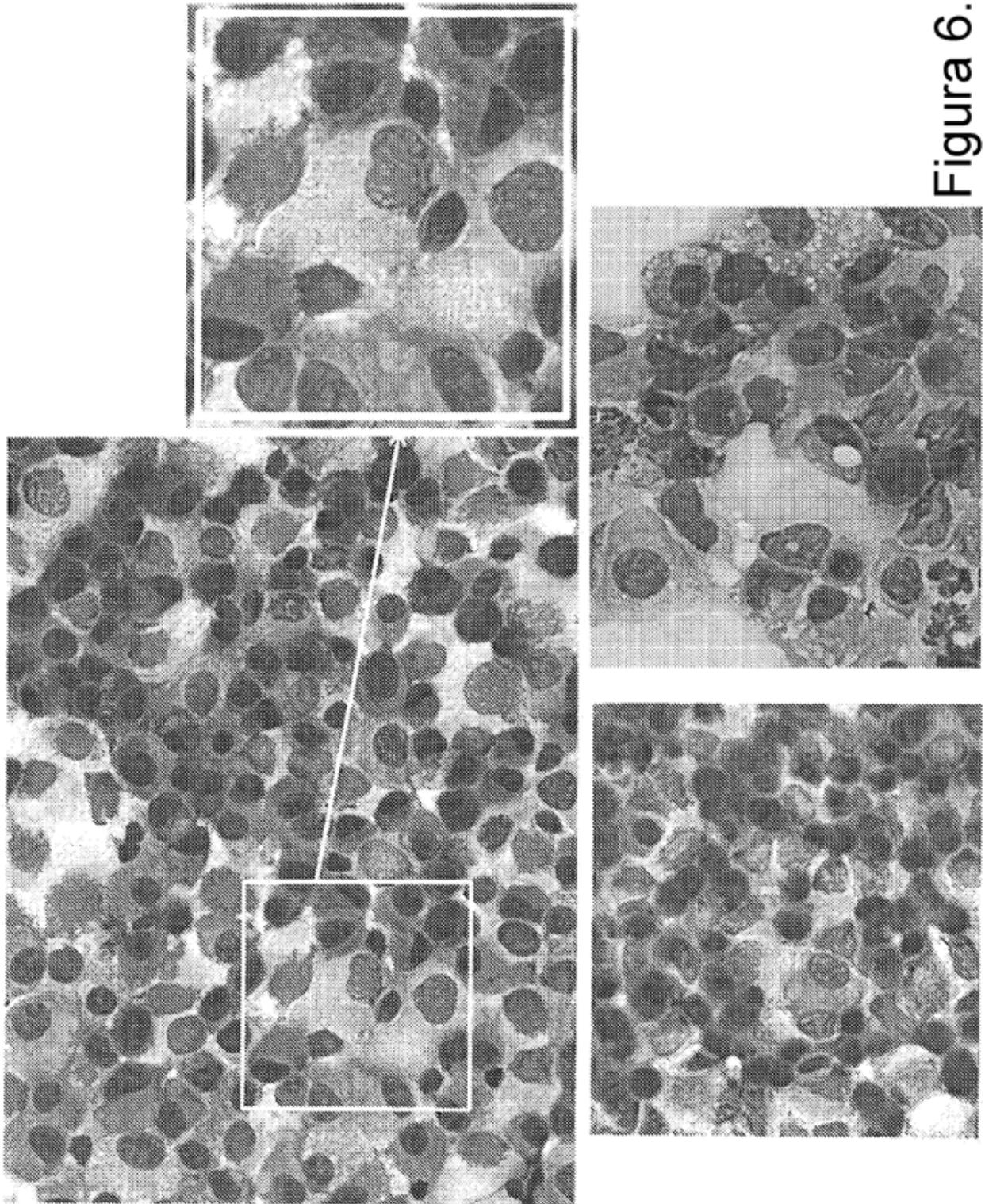


Figura 6.

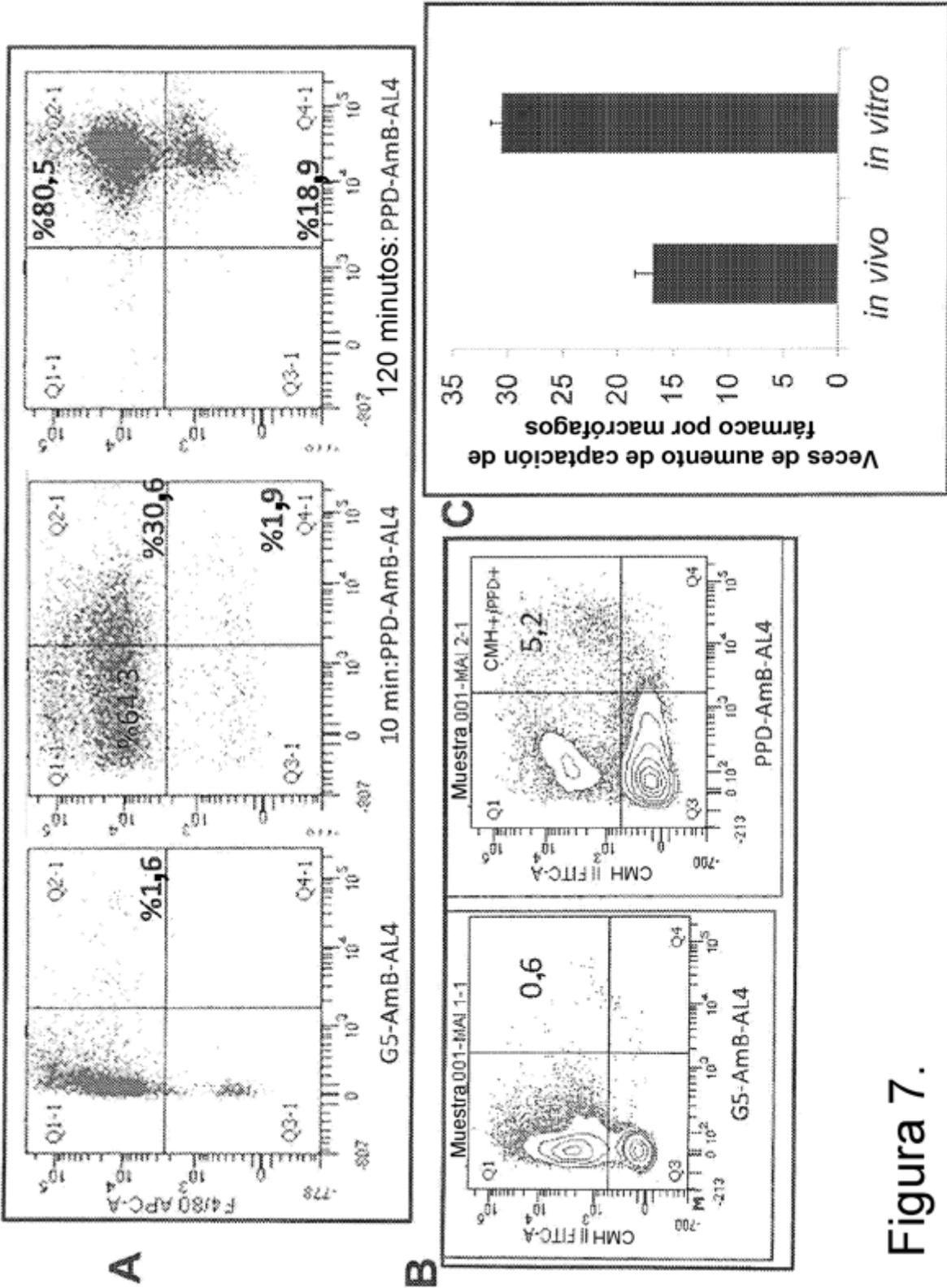


Figura 7.

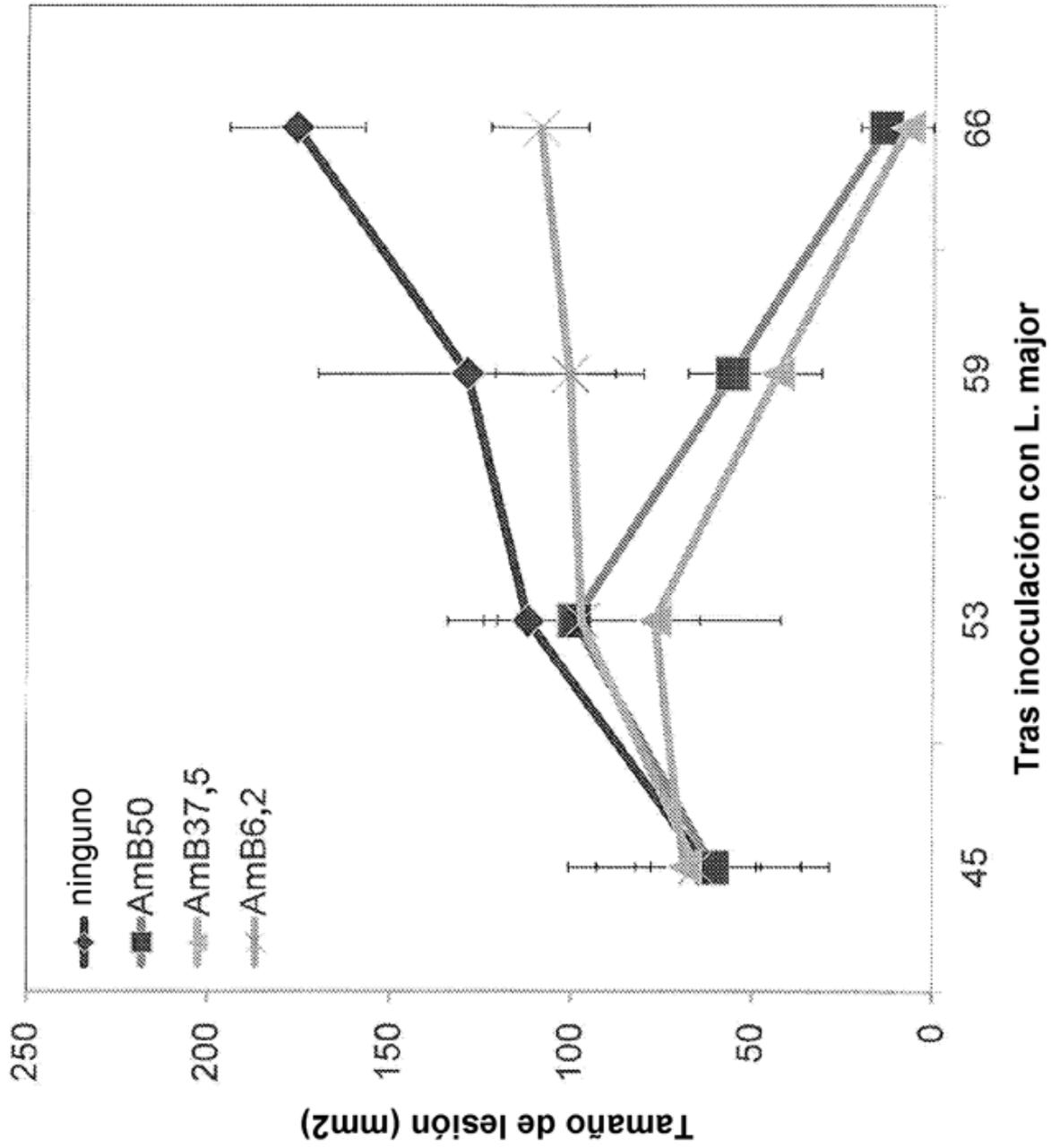


Figura 8.

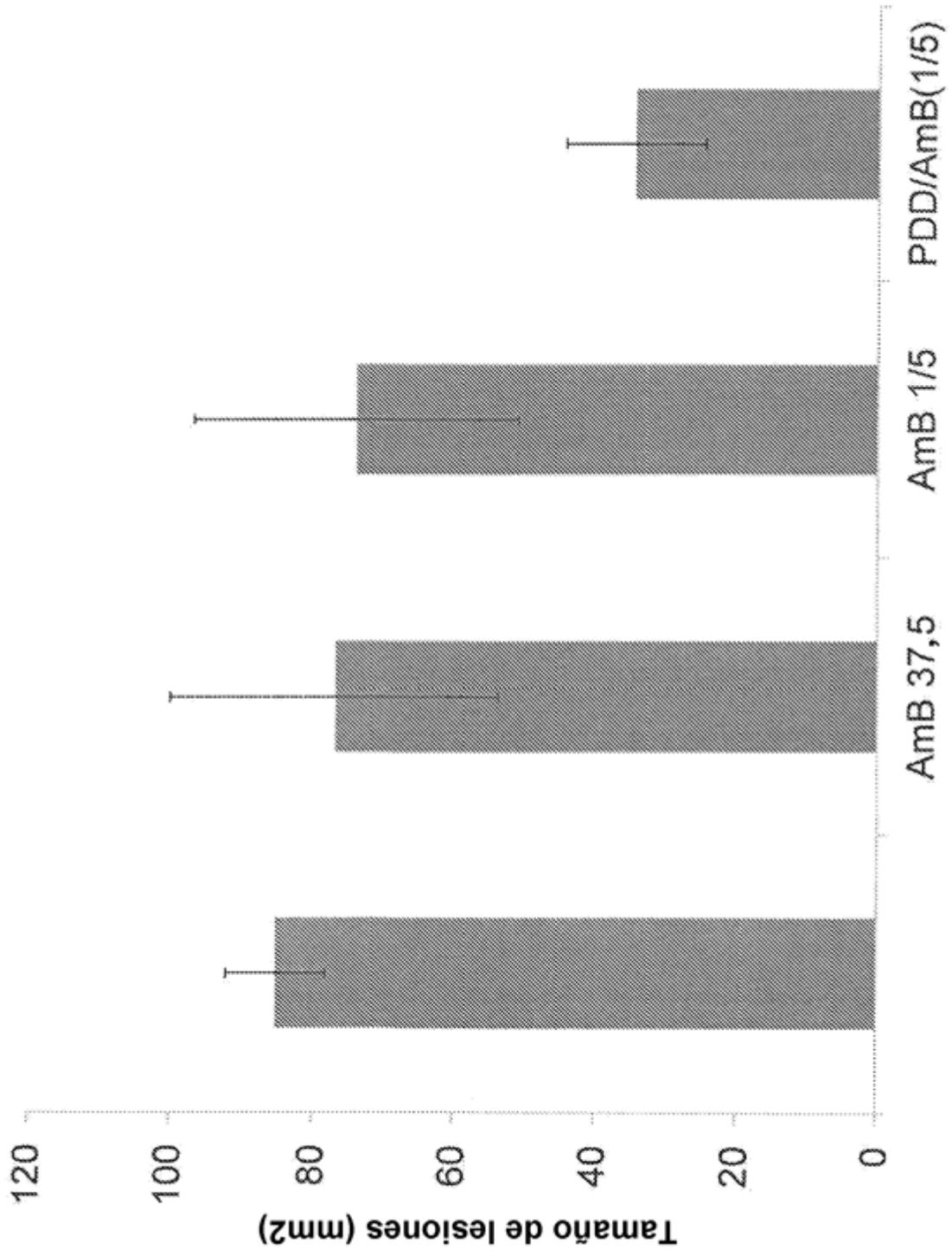


Figura 9.

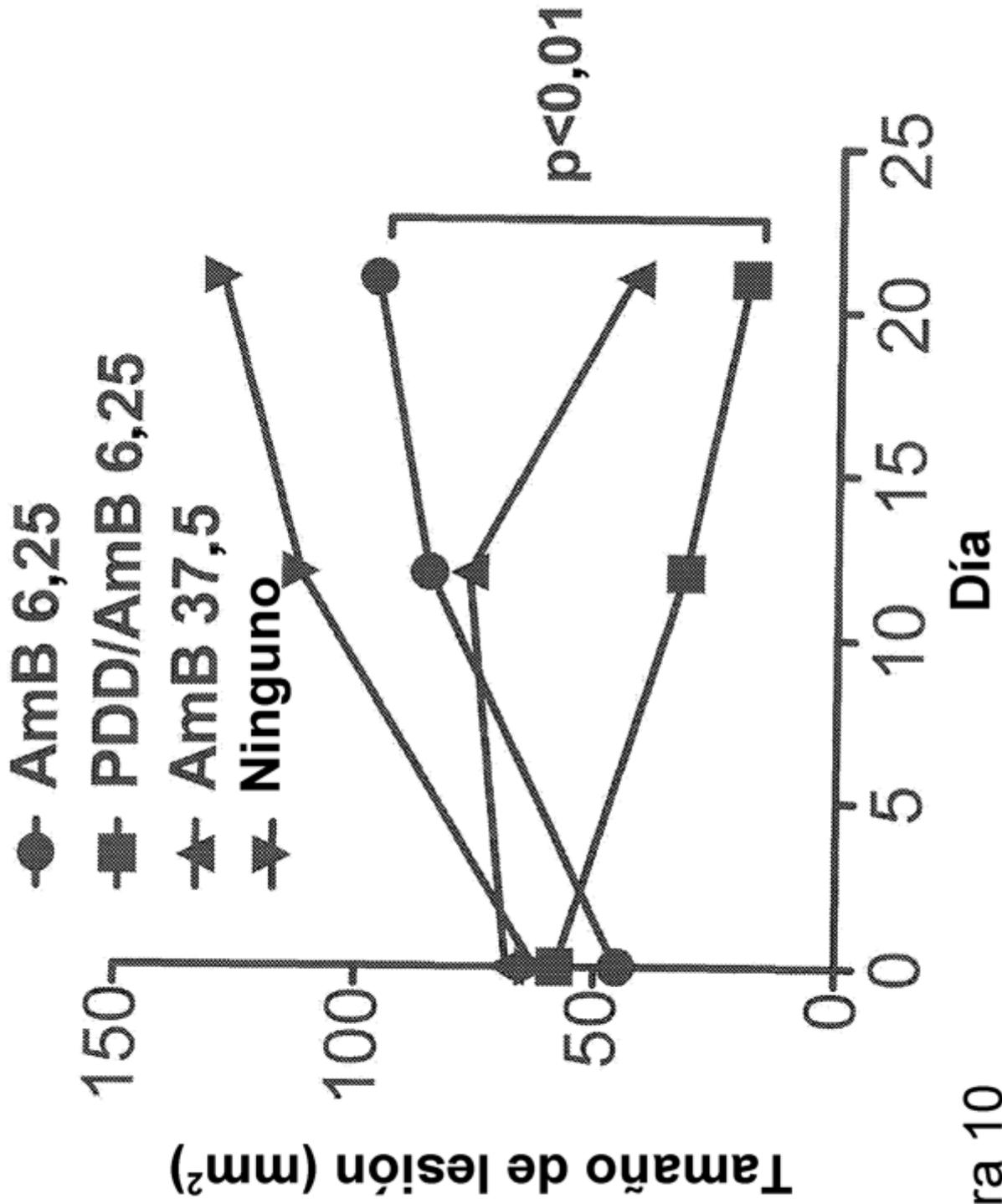


Figura 10

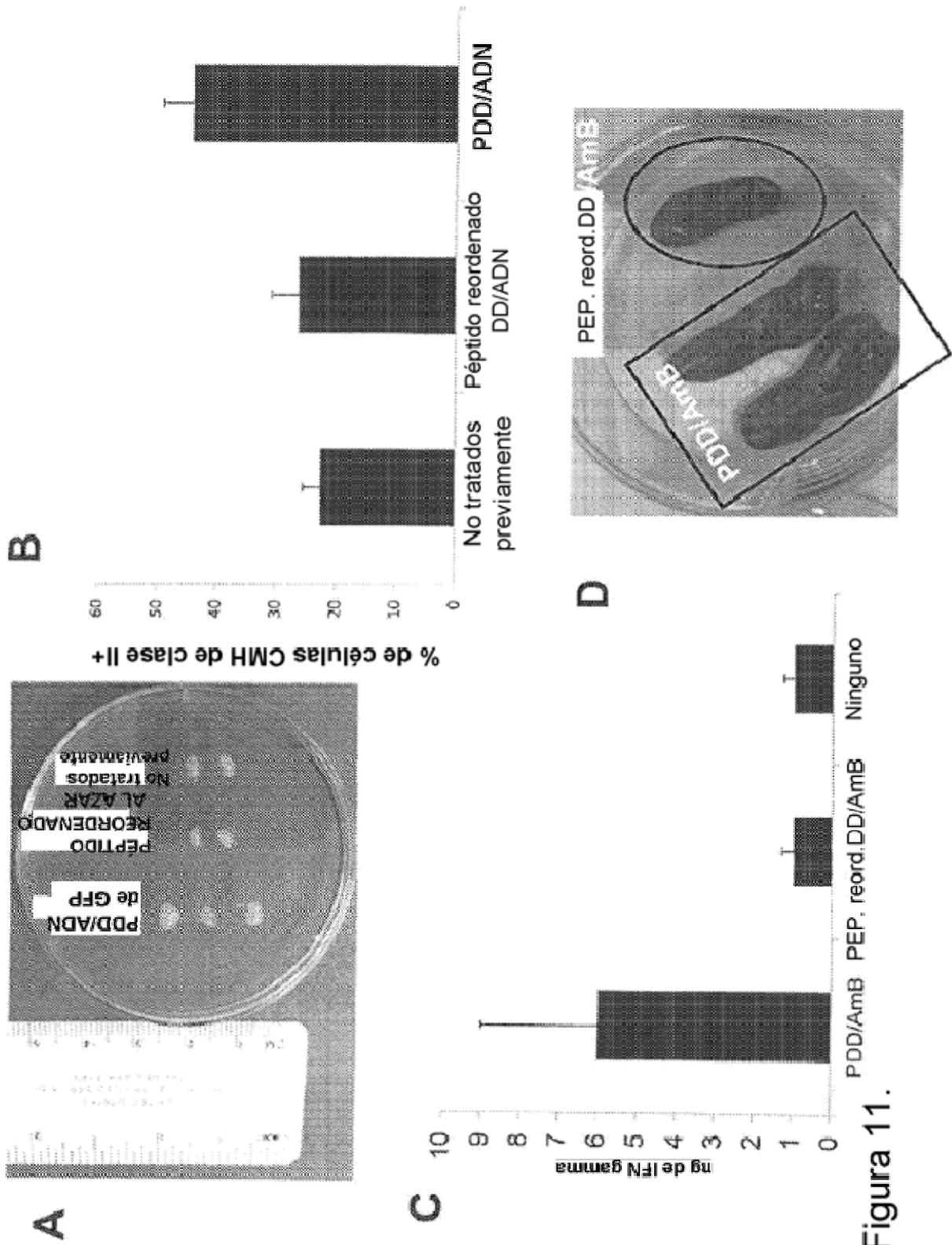


Figura 11.

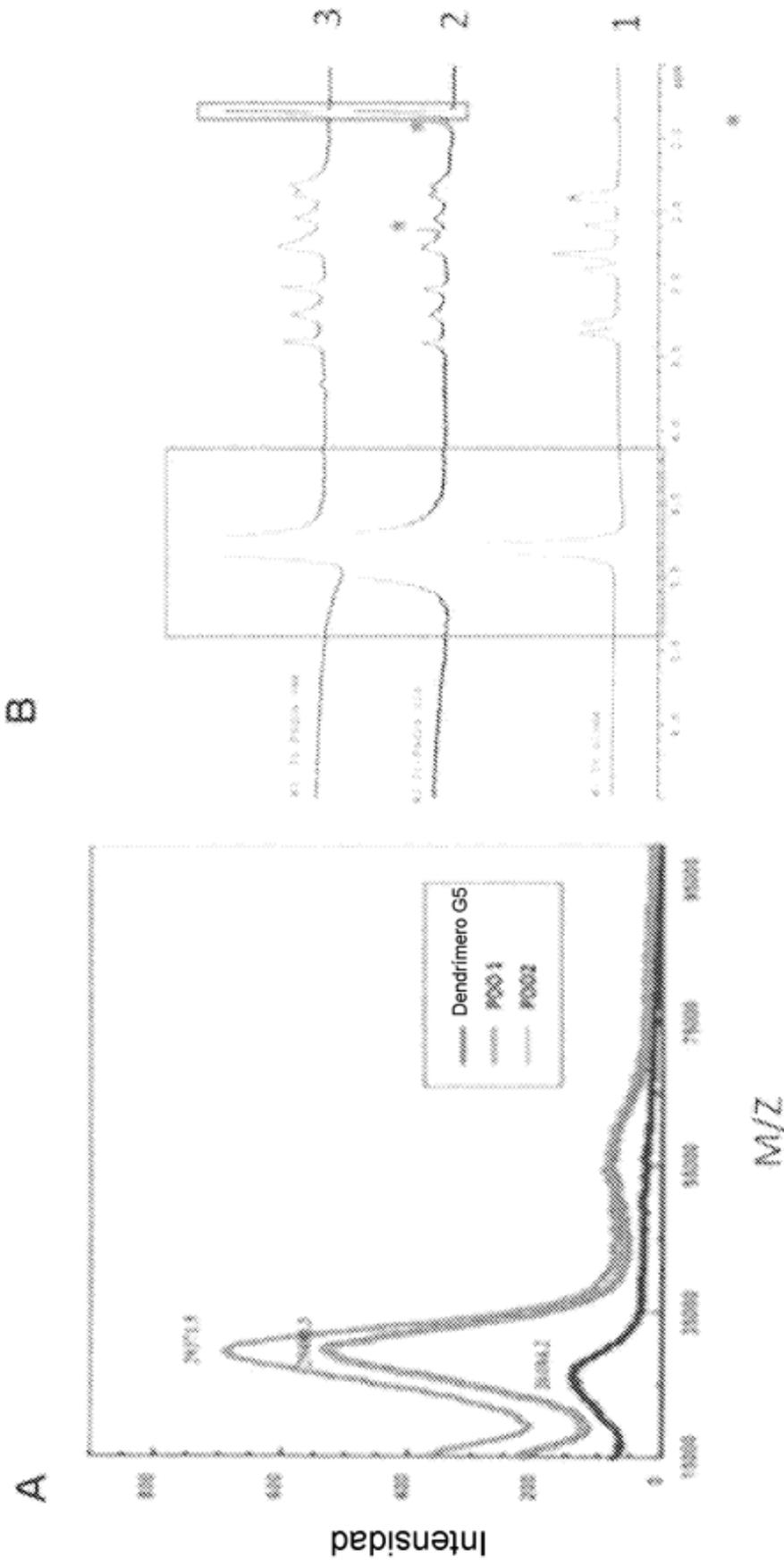


Fig. 12

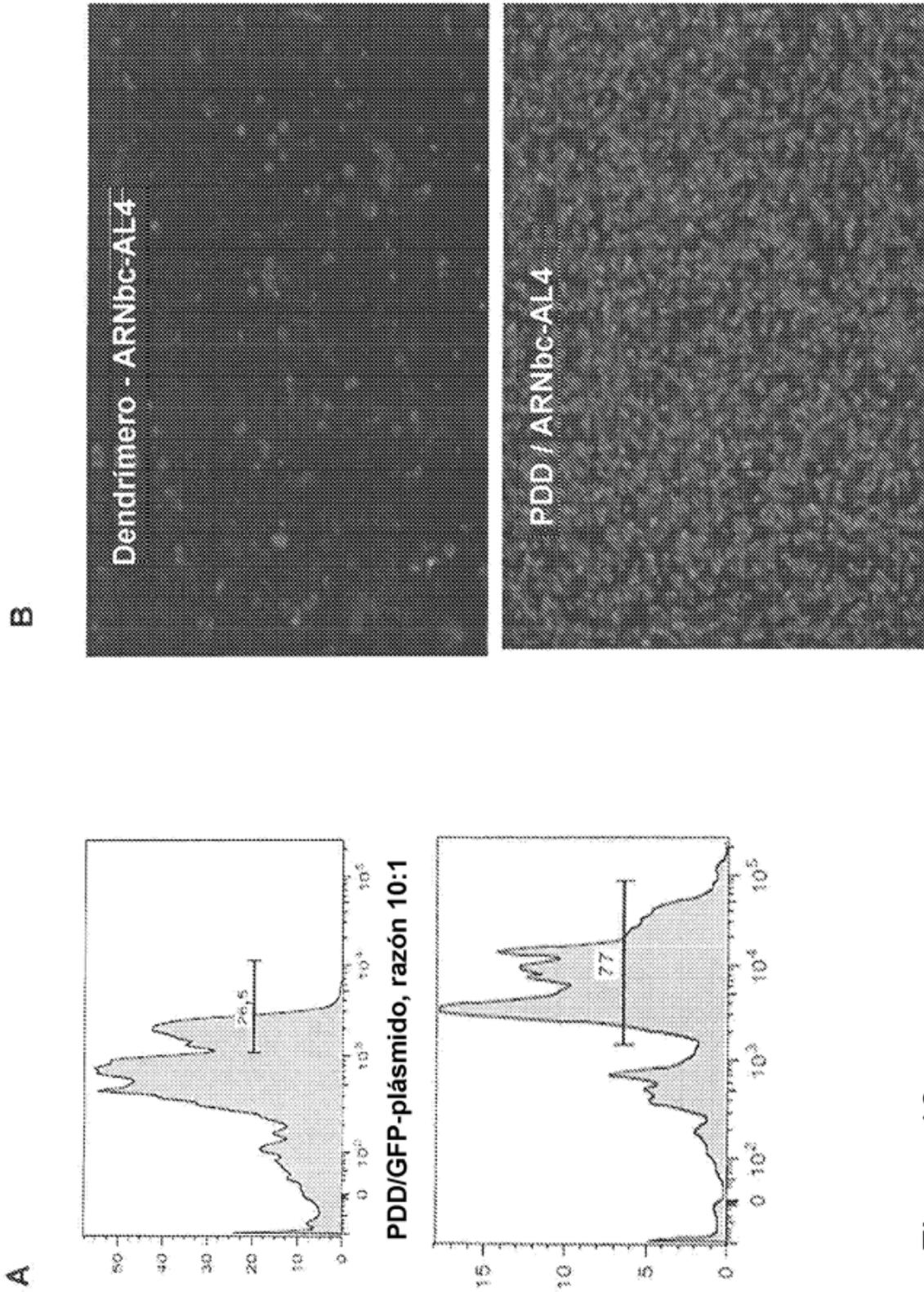


Figura 13.

Nombre de producto	Vía de inyección	Fármaco	Tipo/tamaño de partícula	Forma farmacológica/ tiempo de almacenamiento	Composición lipídica	Indicación aprobada	Ref.
Ambisome	Intravenosa	Anfotericina B	Liposoma	Polvo/36 meses	HSPC, DSPG, colesterol y anfotericina B (razón molar 2:0,8:1:0,4)	Infecciones fúngicas graves	13,17,18
Abelcet	Intravenosa	Anfotericina B	Complejo lipídico	Suspensión/24 meses	DMPC y DMPCG (razón molar 7:3)	Infecciones fúngicas graves	19,20
Amphotec	Intravenosa	Anfotericina B	Complejo lipídico	Polvo/24 meses	Sulfato de colesterol	Infecciones fúngicas graves	21,22
DaunoXome	Intravenosa	Daunorubicina	Liposoma	Emulsión/12 meses	DSPC y colesterol (razón molar 2:1)	Tumores hematológicos	13,23-25
Doxil	Intravenosa	Doxorubicina	Liposoma pegilado	Suspensión/20 meses	HSPC, colesterol y PEG 2000-DSPE (razón molar 56:39:5)	Sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario/mama	13,14,26
Lipo-dox	Intravenosa	Doxorubicina	Liposoma pegilado	Suspensión/36 meses	DSPC, colesterol y DSPE (razón molar 56:39:5)	Sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario/mama	27
Myocet	Intravenosa	Doxorubicina	Liposoma	Polvo/18 meses	EPC y colesterol (razón molar 55:45)	Terapia de combinación con ciclofosfamida en cáncer de mama metastásico	13,14,28
Visudyne	Intravenosa	Verteporfina	Liposoma	Polvo/48 meses	EPG y DMPC (razón molar 3:5)	Degeneración macular asociada a la edad, miopía patológica, histoplasmosis ocular	29-31
Depocyt	Espinal	Citarabina	Liposoma	Polvo/18 meses	Colesterol, trioleína, DOPC y DPPG (razón molar 11:1:7:1)	Meningitis neoplásica y meningitis linfomatosa	13,32
DepoDur	Epidural	Sulfato de morfina	Liposoma	Suspensión/24 meses	Colesterol, trioleína, DOPC y DPPG (razón molar 11:1:7:1)	Gestión del dolor	33,34
Epaxal	Intramuscular	Virus inactivado de la hepatitis A (cepa RG-SB)	Liposoma	Suspensión/36 meses	DOPC y DOPE	Hepatitis A	35-37
Inflexal V	Intramuscular	Hemaglutinina inactivada de cepas A y B de virus influenza	Liposoma	Suspensión/12 meses	DOPC y DOPE	Gripe	38,39

**Abreviaturas:** DOPE: dioleilfosfatidiletanolamina; DOPC: dioleilfosfatidilcolina; DPPG: dipalmitoilfosfatidilglicerol; HSPG: fosfatidilcolina de soja hidrogenada; DSPG: diestearoilfosfatidilglicerol; EPC: fosfatidilcolina de huevo; DSPE: diestearoilfosfatidilcolina; DMPC: 1- $\alpha$ -dimiristoilfosfatidilcolina; DMPCG: 1- $\alpha$ -dimiristoilfosfatidilglicerol; EPG: fosfatidilglicerol de huevo; PEG 2000-DSPE: polietilenglicol 2000-diestearoilfosfatidilglicerol.

FIG. 14

**Tabla 2.** Fármacos basados en liposomas en ensayos clínicos

Nombre de producto	Via de inyección	Fármaco	Composición lipídica	Indicación aprobada	Fase de ensayo	Ref.
LEP-ETU (polvo/12 meses)	Intravenosa	Paclitaxel	DOPC, colesterol y cardioliipina (razón molar 90:5:5)	Cánceres de ovario, mama y pulmón	Fase II/III	13,40
LEM-ETU	Intravenosa	Mitoxantrona	DOPC, colesterol y cardioliipina en razón molar 90:5:5	Leucemia, cánceres de mama, estómago, hígado, ovario	Fase I	13,41
EndoTAG-1 (polvo/24 meses)	Intravenosa	Paclitaxel	DOTAP, DOPC y paclitaxel (razón molar 50:47:3)	Propiedades anti-angiogénicas, cáncer de mama, páncreas	Fase II	13,42-44
Arikace	Administración por aerosol portátil	Amikacina	DPPC y colesterol	Infección pulmonar	Fase III	45,46
Marqibo	Intravenosa	Vincristina	Colesterol y esfingomielina de huevo (razón molar 45:55)	Melanoma uveal maligno metastásico	Fase III	13,47-48
ThermoDox	Intravenosa	Doxorrubicina	DPPC, MSPC y PEG 2000-DSPE (razón molar 90:10:4)	Carcinoma hepatocelular no operable	Fase III	49,50
Atragen	Intravenosa	Tretinoína	DMPC y aceite de soja	Leucemia promielocítica aguda, cáncer de próstata resistente a las hormonas	Fase II	13
Loción liposómica T4N5	Tópica	Endonucleasa S de bacteriófago T4	Desconocido	Xeroderma pigmentosa	Fase III	51
Liposomal Grb-2	Intravenosa	Oligodesoxinucleótido antisentido <i>Grb2</i>	Desconocido	Leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda	Fase I	52
Nyotran	Intravenosa	Nistatina	DMPC, DMPC y colesterol	Infecciones fúngicas sistémicas	Fase I/II	13
LE-SN38	Intravenosa	SN-38, el metabolito activo de irinotecán	DOPC, colesterol y cardioliipina	Cáncer colorrectal metastásico	Fase I/III	13,53
Aroplatin	Intraleural	Análogo de cisplatino (L-NDDP)	DMPC y DMPC	Cáncer colorrectal metastásico	Fase II	54
Liprostin	Intravenosa	Prostaglandina E1	Desconocido	Enfermedad vascular periférica	Fase II/III	55
Stimuvax	Subcutánea	Lipopéptido BLP25 (péptido marcado con MUC1)	Monofosforil lípido A, colesterol, DMPC y DPPC	Vacuna contra el cáncer para encefalitis desarrollada de mieloma múltiple	Fase III	56,57
SPI-077	Intravenosa	Cisplatino	SHPC, colesterol y DSPE-PEG	Cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón	Fase I/II	13
Lipoplatin (suspensión/36 meses)	Intravenosa	Cisplatino	SPC, DPPG, colesterol y mPEG 2000-DSPE	Cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma, cáncer de mama y gástrico y carcinoma broncopulmonar no microcítico no escamoso	Fase III	13,58
S-CKD602	Intravenosa	Análogo de camptotecina	DPSC y DSPE-PEG (razón molar 95:5)	Carcinoma recurrente o progresivo del cuello del útero	Fase I/II	13,59,60
OSI-211	Intravenosa	Lurtotecán	HSPC y colesterol (razón molar 2:1)	Cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello	Fase II	25,61
INX-0125	Intravenosa	Vinorelbina	Colesterol y esfingomielina de huevo (razón molar 45:55)	Tumores sólidos avanzados	Fase I	13,62
INX-0076	Intravenosa	Topotecán	Colesterol y esfingomielina de huevo (razón molar 45:55)	Tumores sólidos avanzados	Fase I	13
Liposoma-annamicina (polvo)	Intravenosa	Annamicina	DSPC, DSPG y Tween	Leucemia linfocítica aguda	Fase I/II	13

**Abreviaturas:** DOPC: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina; MSPC: monoestearyl fosfatidilcolina; DPPC: dipalmitoil fosfatidilcolina; DOTAP: 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano; SPC: fosfatidilcolina de soja; mPEG 2000-DSPE: metoxi-poli(etilenglicol)-diestearyl-fosfatidilcolina; DSPE: diestearyl fosfatidilcolina.

**Figura 15**

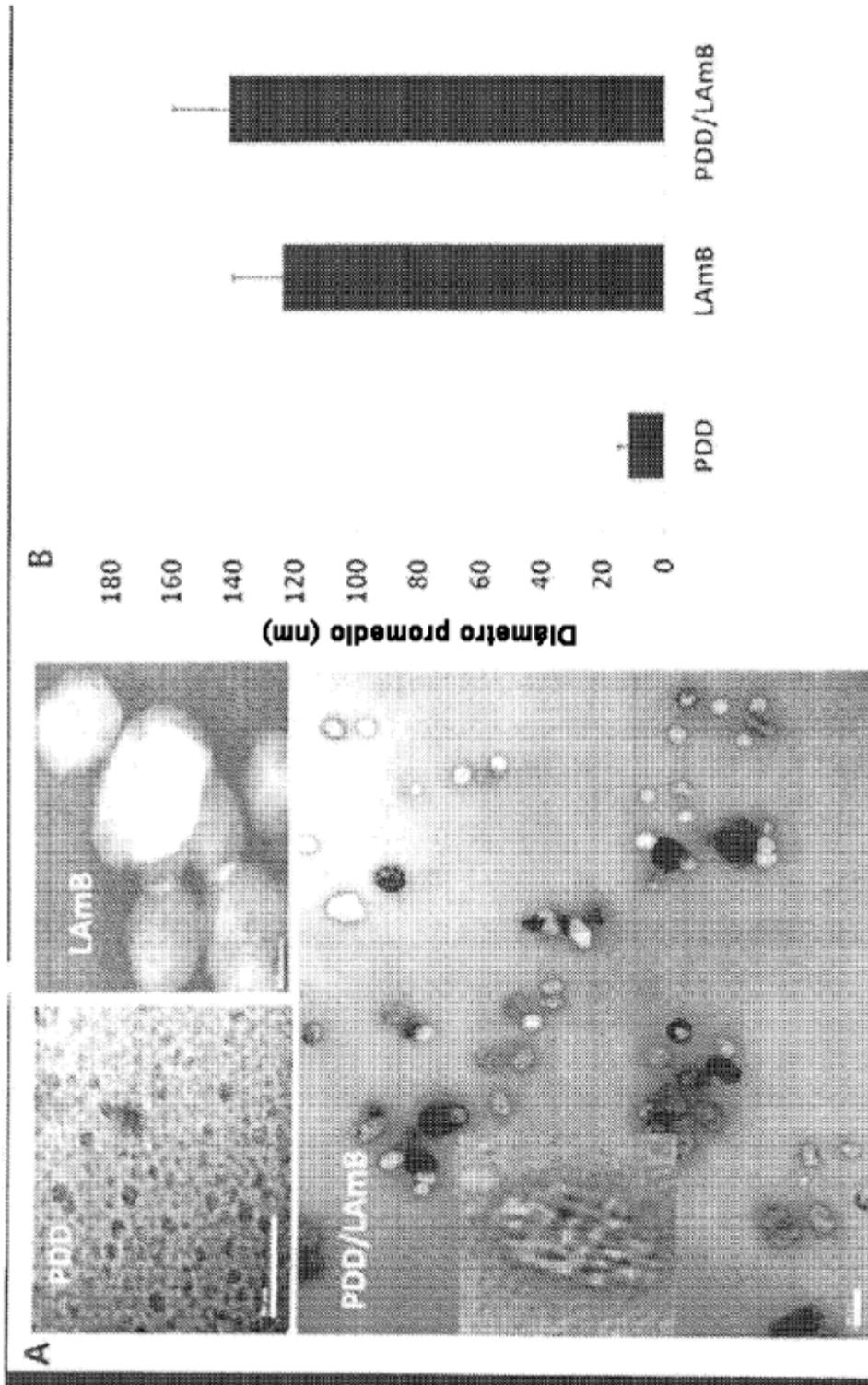


FIG. 16

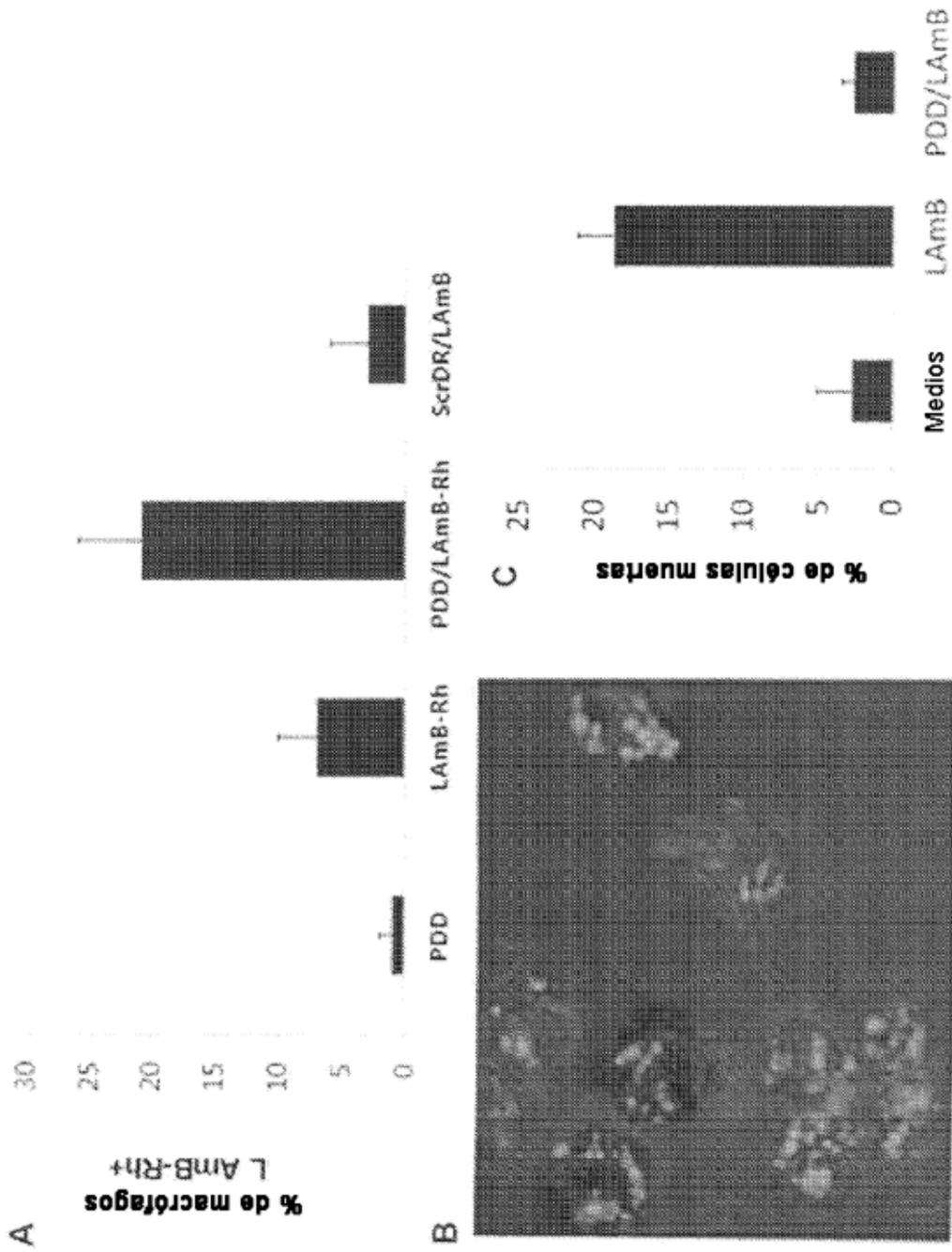
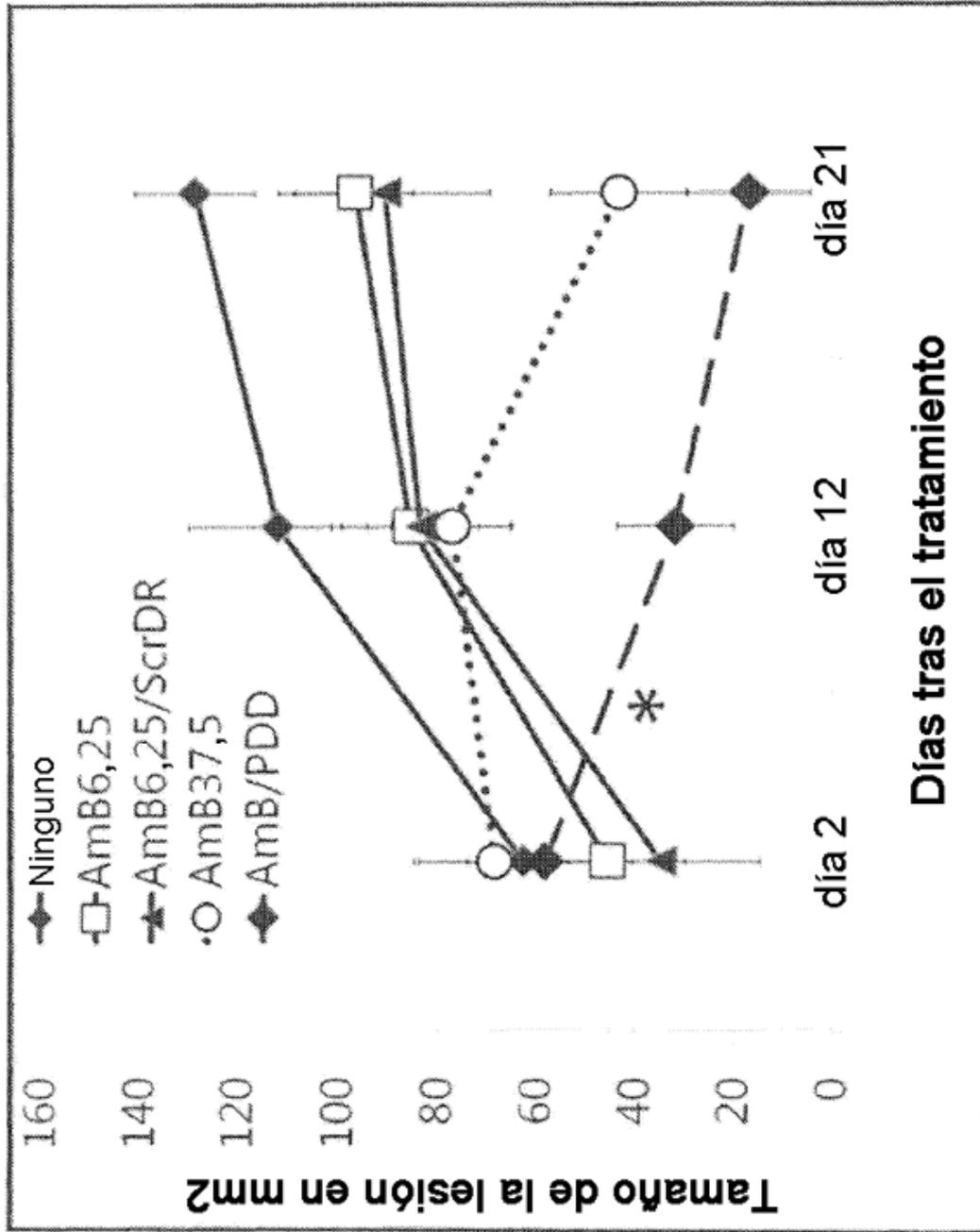


FIG.17



A

FIG.18A

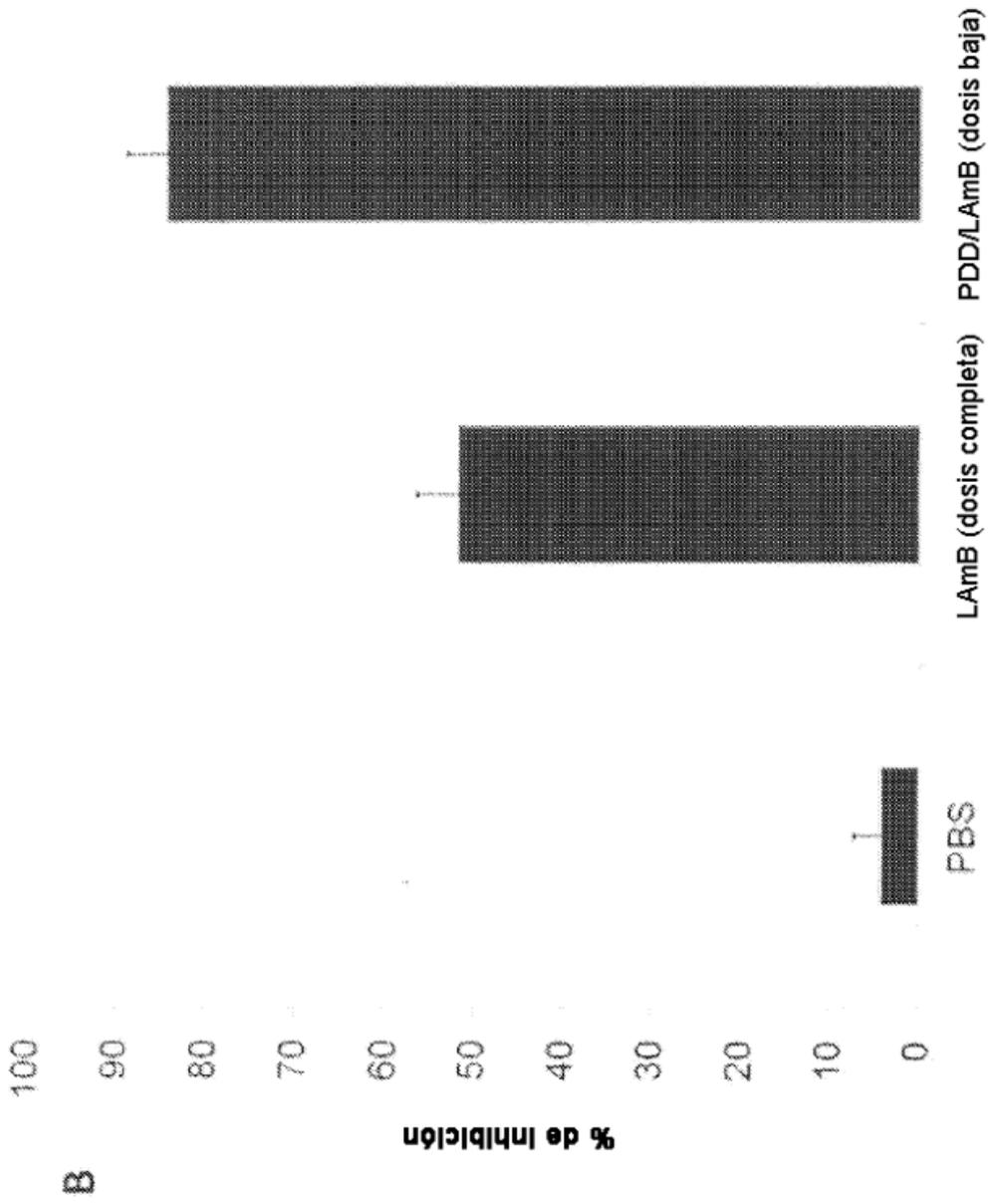


FIG. 18B

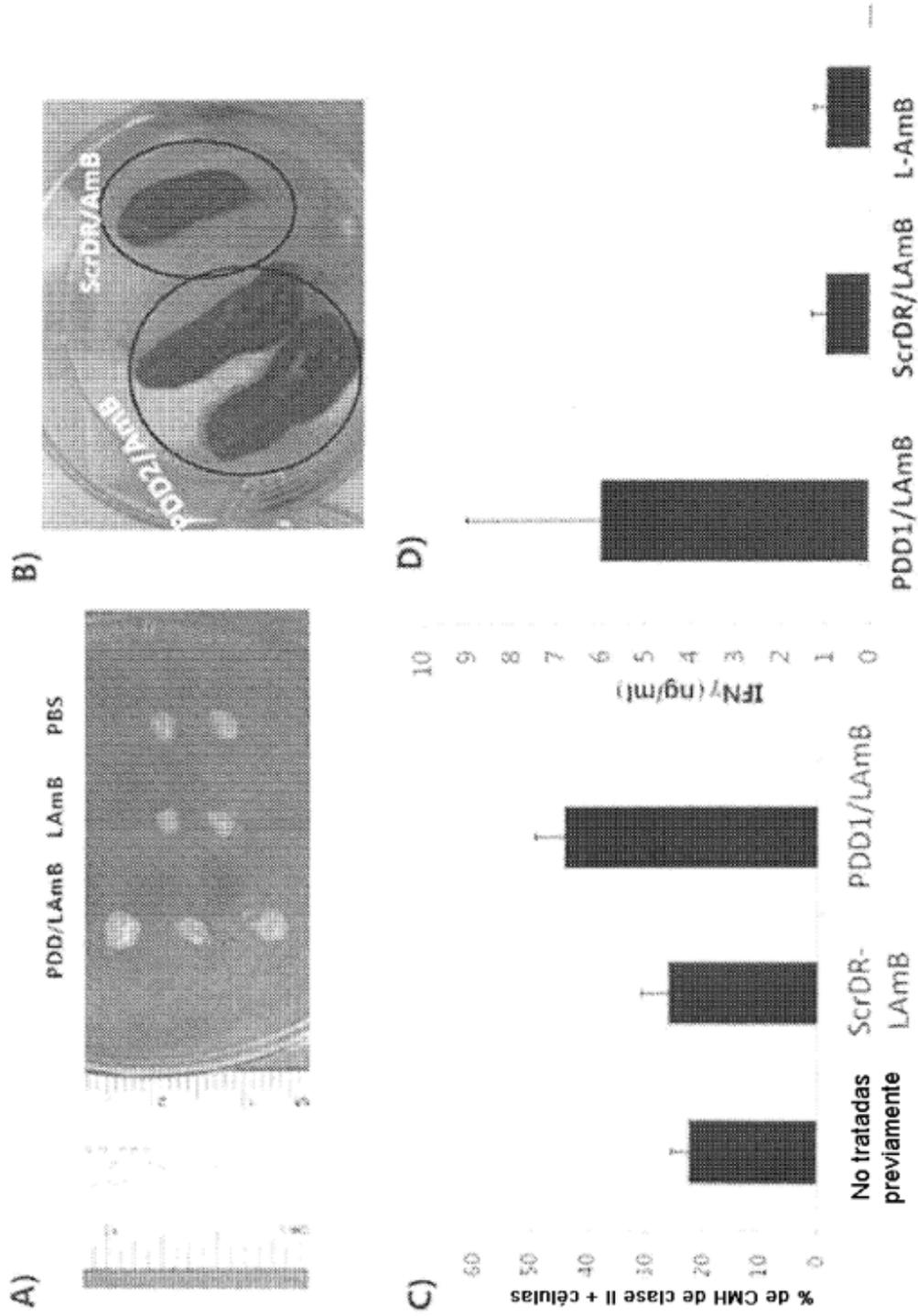


FIG.19

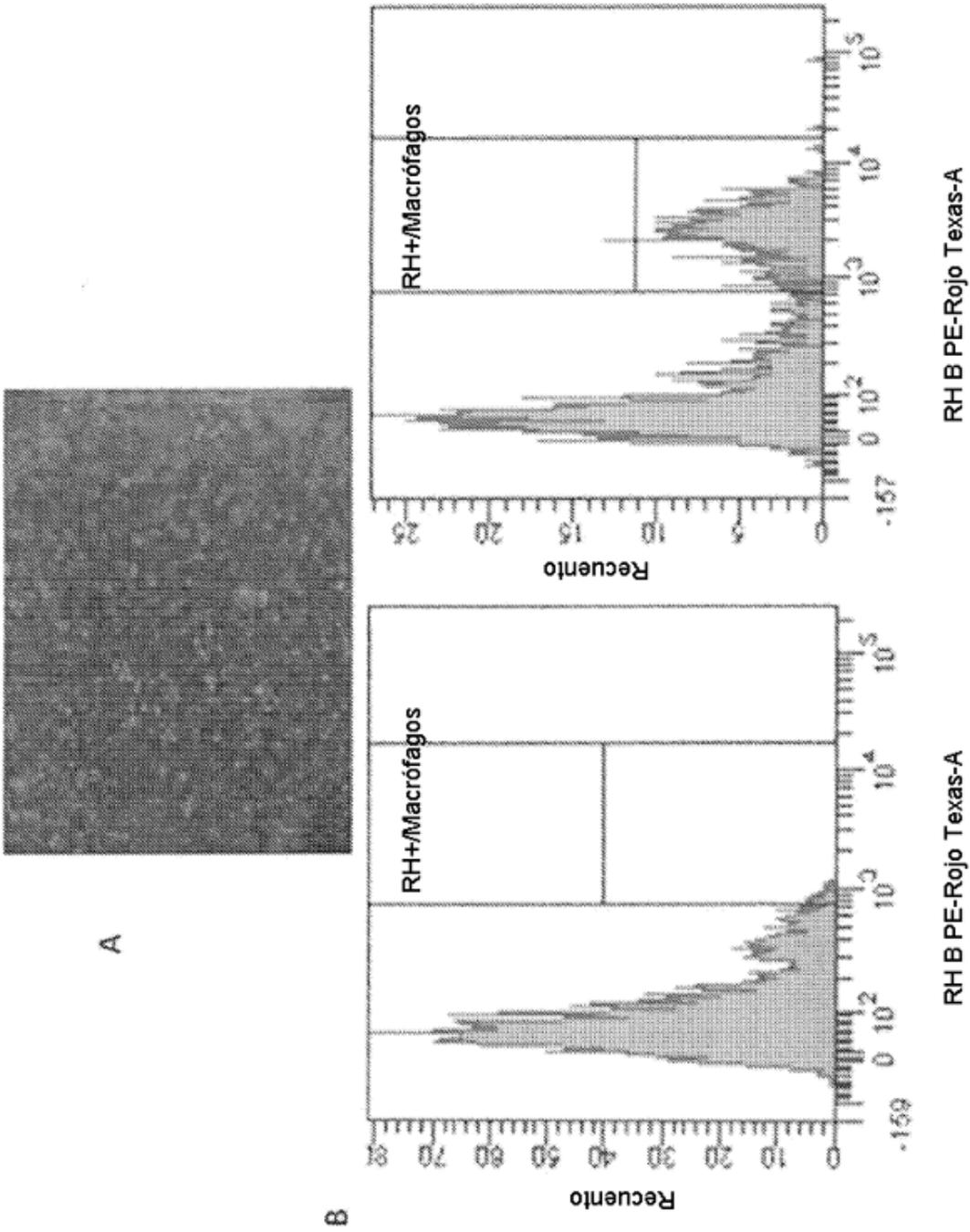


FIG. 20

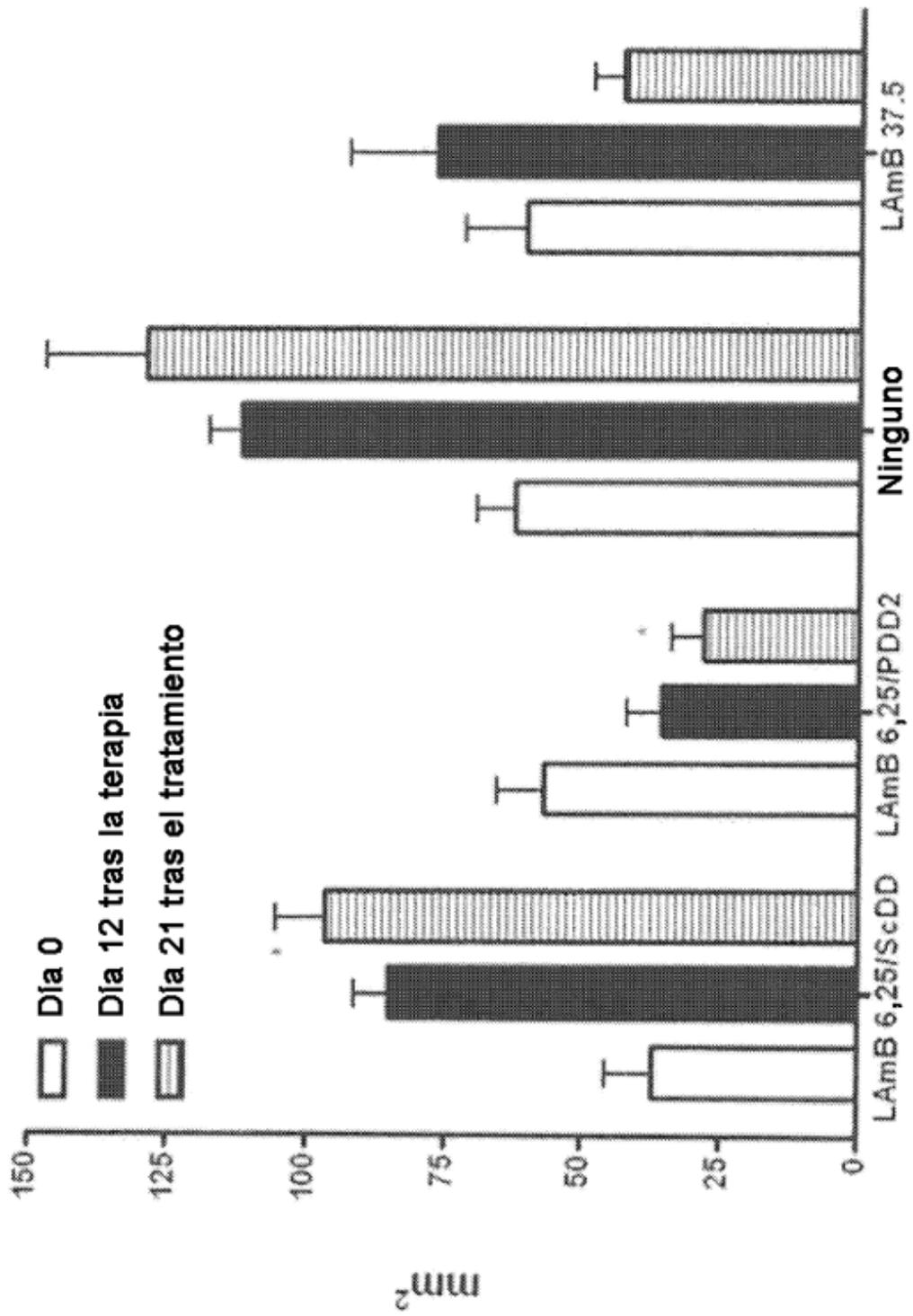


Fig. 2)