

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 865 392**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/41 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

C07K 14/795 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/69 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA LIMITADA

T7

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2016** **PCT/US2016/028102**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016** **WO16168817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2016** **E 16780996 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras limitación: **06.04.2022** **EP 3283056**

54 Título: **Nanoestructuras que comprenden conjugados de porfirina de cobalto-fosfolípido y etiquetas de polihistidina**

30 Prioridad:

16.04.2015 US 201562148292 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente limitada:
07.09.2022

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE
UNIVERSITY OF NEW YORK UNIVERSITY AT
BUFFALO (50.0%)
Office Of Science, Technology Transfer
Economic Outreach, Baird Research Park, Suite
111, 1576 Sweet Home Road
Amherst, NY 14228-2567, US y
PATH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LOVELL, JONATHAN;
SHAO, SHUAI;
GENG, JUMIN;
HUANG, WEI-CHIAO;
LEE, SHWU-MAAN y
KING, CHARLES, RICHTER**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 865 392 T7

DESCRIPCIÓN

Nanoestructuras que comprenden conjugados de porfirina de cobalto-fosfolípido y etiquetas de polihistidina

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente divulgación se refiere de manera general al campo de nanoestructuras funcionalizadas. Más particularmente, la divulgación se refiere a nanoestructuras que comprenden porfirina de cobalto.

10 **ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN**

[0002] En el campo de nanopartículas funcionalizadas, uno de los desafíos es acoplar péptidos y proteínas de manera más fácil y segura a andamiajes más grandes. Las nanopartículas dirigidas requieren ligandos eficaces y péptidos no conjugados por sí mismos son inmunógenos débiles. La química de bioconjugados ha proporcionado una variedad de estrategias, pero la mayoría de conjugaciones de nanopartículas sufren de limitaciones que tienen relación con uno o más de los siguientes: 1) rendimientos de baja conjugación y etapas de purificación necesarias; 2) incompatibilidad con tampones biológicos, haciendo imposible el marcado de nanopartículas intactas; 3) sitios de marcado variable y configuraciones de polipéptidos conjugados, creando una población de partículas no homogénea de eficacia variable; 4) necesidad de enfoques químicos complejos y externos.

[0003] Los enfoques estándares para acoplamiento de ligandos a nanopartículas acuosas utilizan maleimidadas, ésteres succinimidílicos y ácidos carboxílicos activados con carbodiimida. Estos pueden reaccionar de manera covalente con grupos amina y tiol de polipéptidos. El uso de maleimida-lípidos se ha investigado extensivamente para inmunoliposomas conjugados con anticuerpos. Los rendimientos de conjugación pueden ser tan altos como 90% de una reacción durante la noche, pero se necesita el apagado posterior de grupos libres de maleimida y purificación adicional. Las proteínas pueden necesitar una etapa preparativa de tiolación y purificación antes de la conjugación. La orientación de anticuerpo es un factor principal que influencia la eficacia de unión de direccionamiento a anticuerpos conjugados, pero estos enfoques dan lugar a numerosos sitios de marcado de anticuerpos y orientaciones indiscriminadas. Recientemente se han utilizado las estrategias sintéticas biortogonales tales como la reacción click para liposomas desarrolladas, sin embargo, estas requieren el uso de catalizadores exógenos y aminoácidos no convencionales.

[0004] Otro enfoque que es adecuado para los péptidos pequeños que son menos propensos a desnaturalización permanente en disolventes orgánicos es conjugar los péptidos con un anclaje lipídico. Los lipopéptidos resultantes pueden incorporarse a continuación conjuntamente con otros lípidos durante el proceso de formación de liposomas. Este enfoque se ha utilizado para generar vacunas sintéticas que inducen producción de anticuerpos contra péptidos que de otro modo son no inmunogénicos. Sin embargo, debido a su carácter anfipático, en tal caso los lipopéptidos eran difíciles de purificar con un rendimiento de 5-10%. También se ha demostrado que los lipopéptidos no se incorporan completamente en liposomas durante el proceso de formación, dando como resultado agregación.

[0005] US2012/253191 da a conocer nanovesículas que comprenden una bicapa de conjugado de porfirina-fosfolípido de como mínimo 15 % molar.

CARACTERÍSTICAS DE LA DIVULGACIÓN

[0006] La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

[0007] La presente divulgación da a conocer nanoestructuras funcionalizadas. Las nanoestructuras pueden utilizarse para suministro de carga, suministro selectivo y/o suministro de moléculas presentadoras. Las nanoestructuras pueden ser monocapas o bicapas que contienen un compartimento acuoso en ellas. Las estructuras bicapa que contienen un compartimento acuoso se denominan liposomas en el presente documento. Las nanoestructuras pueden ser recubrimientos monocapa o bicapa sobre una nanopartícula. La monocapa o la bicapa comprende conjugado de porfirina de cobalto -fosfolípido, opcionalmente, fosfolípidos que no se conjugan con porfirina, opcionalmente esteroides, y, opcionalmente, polietilenglicol (PEG). Uno o más de péptidos o polipéptidos diana (denominados en el presente documento como moléculas presentadoras) que tienen una etiqueta de polihistidina se incorporan en la monocapa o bicapa de tal modo que una parte de la etiqueta de polihistidina se encuentra en la monocapa o bicapa y la molécula presentadora se expone en la parte exterior de la monocapa o bicapa. Además del conjugado de porfirina de cobalto-fosfolípido, se puede utilizar porfirina de cobalto.

[0008] Las nanoestructuras de la presente divulgación pueden cargarse con la carga para su administración en los sitios que pueden ser específicos para las moléculas presentadoras marcadas con polihistidina. Por ejemplo, los liposomas pueden cargarse con la carga para su administración en los sitios deseados utilizando moléculas presentadoras marcadas con polihistidina.

[0009] Los datos presentados en el presente documento demuestran que una bicapa que contiene una porfirina de cobalto, tal como un porfirina de cobalto-fosfolípido (CoPoP) puede unirse de manera estable a polipéptidos

etiquetados con histidina (también denominada en el presente documento como «etiqueta his») (Figura 1a). Otras metaloporfirinas tales como cinc, níquel y cobre no son estables para unirse a polipéptidos etiquetados con his. Esto representa un nuevo paradigma de unión con como mínimo algunas polihistidinas enterradas en la fase de membrana, debido a que las porfirinas por sí mismas forman la parte hidrofóbica de la bicapa y no son accesibles para el ambiente acuoso externo. Esto lleva a la unión más estable, posibilita paradigmas de post-marcaación no covalente más simples después de la formación de partículas y elimina la ambigüedad que tiene relación con la orientación de ligando.

[0010] Mostramos que las bicapas lipídicas que contienen porfirina-fosfolípido que está quelado con cobalto, pero no con otros materiales, pueden capturar eficazmente proteínas y péptidos etiquetados con his. La unión sigue una transición de Co(II) a Co(III) y sucede dentro de la bicapa hidrofóbica protegida, dando lugar a, por ejemplo, acoplamiento irreversible esencialmente en suero o en más de un millón de pliegues de imidazol competitivo. Utilizando este enfoque insertamos péptidos guiados en la bicapa de liposomas preformadas y cargadas con carga para hacer posible direccionamiento de sitio (tal como direccionamiento tumoral) sin alterar la integridad de la bicapa. Los péptidos o péptidos sintéticos pueden unirse a liposomas que contienen un adyuvante (tal como el lípido monofosforil lípido A) para la generación de anticuerpos para péptidos que de otro modo son no antigénicos.

[0011] La presente divulgación da a conocer las estructuras monocapa o bicapa, en las que la monocapa o bicapa comprende porfirinas con cobalto quelado a ellas de tal modo que el metal de cobalto se encuentra dentro de la monocapa o bicapa y el macrociclo de porfirina y más contiene moléculas con una etiqueta de histidina acoplada de manera no covalente a ella, de tal modo que como mínimo una parte de la etiqueta his se encuentra dentro de la monocapa o bicapa y se coordina con el núcleo metálico de cobalto. Las moléculas presentadoras pueden tener diferentes usos que incluyen direccionamiento y generación de respuestas inmunes. Los liposomas formados por las capas presentes pueden cargarse con la carga para su liberación en localizaciones deseadas. La porfirina de cobalto es porfirina de cobalto-fosfolípido (CoPoP). Las capas presentes pueden utilizarse también como recubrimientos para nanopartículas metálicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0012]

Figura 1. Unión de etiqueta his a bicapas PoP. (a) Esquema que muestra un péptido con una etiqueta His (verde) que se une a liposomas CoPoP preformados en solución acuosa. (b) Inserción de polipéptido etiquetado con his en una bicapa que contiene CoPoP. Solamente se muestra un único prospecto de la bicapa. (c) Estructura química de metalo-PoPs utilizados en este estudio.

Figura 2. La unión de proteína marcada con His a liposomas Co (III)-PoP. (a) Una proteína fluorescente marcada con heptahis que comprende Cerúleo (C) fusionado con Venus (V) muestra unión a bicapas PoP. Cuando C se excita, se produce FRET y V emite fluorescencia (izquierda), pero se inhibe cuando se une a la bicapa PoP debido a FRET competitivo con la bicapa fotónica (centro). Se puede sondear la fluorescencia C directamente incluso cuando la proteína se une a la bicapa (derecha). (b) Las imágenes de fluorescencia multiespectral de cambios de movilidad electroforética de proteína de fusión después de la incubación con liposomas metalo-PoP indicados. (c) Cinética de unión de la proteína de fusión a los liposomas metalo-PoP indicados basada en la pérdida de C frente a V FRET. (d) Las anchuras de picos de RMN del protón subrayado del grupo vinilo en CoPoP demuestra la ampliación paramagnética de Co (II) en clorofórmio deuterado (CDCl_3) excepto los picos no paramagnéticos de Co (III) después de la formación de CoPoP-liposoma en agua deuterada. Para cada conjunto de barras, de izquierda a derecha las barras son para: CoPoP y 2H-PoP (e) Cambio de unión de péptido etiquetado con his a liposomas CoPoP después de la adición de 2 M de sulfato de sodio. Los liposomas se formaron con 10 molar % de CoPoP o fosfolípido Ni-NTA. Para cada conjunto de barras, las barras desde izquierda a derecha son: agua y +2M de sulfato.

Figura 3. La proteína resistente marcada con His que se une a liposomas CoPoP (a) Imágenes de cambio de movilidad electroforética multiespectral de la proteína reportera fluorescente incubada con liposomas que contienen el lípido indicado. (b) Estabilidad de unión de proteína reportera unida a liposomas indicados en suero 1: 1. (c) Estabilidad de unión de proteína reportera unida a liposomas indicados en exceso de imidazol libre. Media +/- desviación estándar para n=3.

Figura 4. La unión de péptido RGD etiquetado con his a liposomas CoPoP. (a) La unión de un péptido corto marcado con FAM a liposomas metalo-PoP. (b) El efecto de longitud de etiqueta His sobre la unión a medio tiempo a liposomas CoPoP. No se observó ninguna unión «N.U.» para el péptido que carecía de una etiqueta His. El efecto de composición de liposomas sobre la unión a tiempo medio a liposomas CoPoP de composición indicada cuando se incubó en PBS (c) o en 5 mg/mL de BSA (d). Media +/- desviación estándar para mediciones triplicadas. En (c) y (d), para cada conjunto de barras, las barras desde izquierda a derecha son 50 y 0.

Figura 5. Direccionamiento de RGD-His de liposomas cargadas con carga. (a) Liberación de liposomas Bin PoP atrapados en sulforodamina durante la unión a péptido. Para cada conjunto de barras, las barras desde izquierda a derecha son: 8 horas y 24 horas. (b) Absorción dirigida de liposomas cargados con sulforodamina B. Las células se incubaron bajo las condiciones indicadas y la absorción se evaluó examinando la fluorescencia de sulforodamina B. Para cada conjunto de barras, las barras desde izquierda a derecha son: Células MCF7 y células U87 (c) Micrografías focales que muestran la absorción de liposomas. Las células se incubaron con las soluciones de liposomas indicadas durante 2 horas, se lavaron y se visualizaron. Todas las imágenes se obtuvieron con las mismas configuraciones. (d) Biodistribución de sulforodamina B atrapada en liposomas CoPoP con o sin acoplamiento a un

péptido diana de RGD cíclico etiquetado con his 45 minutos después de la inyección en ratones nude que padecen tumores U87 subcutáneos. Media +/- desviación estándar para n=3. Para cada conjunto de barras, las barras desde izquierda a derecha son: no dirigidos y +cRGD-His.

Figura 6. Vacunación con péptido HIV que utiliza liposomas CoPoP inmunogénicos. (a) Los ratones nude BALB/c o atímicos se inmunizaron con liposomas CoPoP que contenían 25 µg de 5 MPL y 25 µg de péptido MPER etiquetado con his derivado de la proteína de la envoltura VIH gp41. Se evaluó el título de sueros con una técnica ELISA que utiliza un péptido MPER biotinilado que carece de una etiqueta His y se sondó con un anticuerpo secundario anti-IgG. Las flechas indican tiempos de vacunaciones. (b) Título anti-MPER en ratones BALB/c vacunados tal como se indicó. Los ratones se vacunaron durante la semana 0 y la semana 2 y el suero se recogió durante la semana 4. (c) Título anti-MPER sostenido en ratones vacunados con liposomas CoPoP que contienen MPL. Media +/- desviación estándar para n=4 ratones por grupo. Las primeras dos barras (unidas) a la izquierda son CoPoP y Ni-NTA (d) Neutralización de la infección VIH en 293 células en presencia de anticuerpos indicados. IgGs se purificaron a partir de sueros de ratón que utilizan Proteína A Media +/- desviación estándar para n=3.

Figura 7. Estabilidad de péptido RGD-His que se une a liposomas. (a) Péptido RGD-His marcado con FAM que se une a liposomas que contienen 10 molar % de Ni-NTA-lípido, Co-NTA-lípido o CoPoP. (b) Filtración con gel seguida de unión a péptido. Solamente los liposomas CoPoP mantuvieron la unión estable (c) Estabilidad de péptido seguida de incubación con dilución en suero bovino fetal a una proporción de 1:1. Solamente los liposomas CoPoP mantuvieron la unión estable.

Figura 8. La unión estable de proteína marcada con his a liposomas que contienen CoPoP. La proteína reportera se incubó con liposomas que contenían CoPoP, Co-porfirina libre o 2HPoP, a continuación, se incubaron en suero y se sometieron a técnica EMSA. A continuación, la proteína se visualizó utilizando canal FRET (ex: 430 nm, em: 525 nm). La falta de señal en la vía CoPoP demuestra la unión estable a los liposomas. La señal disminuida en la vía Co-porfirina demuestra poca unión de la proteína marcada con his a los liposomas.

Figura 9. El tiempo para 90% de unión de péptido de RGD-His a liposomas CoPoP de diferentes composiciones. El efecto de composición de liposomas durante el tiempo para 90% de unión de péptido a liposomas CoPoP (10 molar % CoPoP), que contienen los componentes indicados cuando se incuban en PBS con el péptido RGD-His. Para cada conjunto de barras, las barras desde izquierda a derecha son: + colesterol y - colesterol.

Figura 10. La unión de RGD-His a liposomas CoPoP en presencia de suero o albúmina. Los liposomas de las composiciones indicadas se incubaron con el péptido RGD-his en presencia de 50% de suero fetal bovino o 50 mg/mL de albúmina de suero bovino. La emisión de péptido marcado con FAM se normalizó al comparar la emisión de péptido cuando se unió a liposomas CoPoP con liposomas 2H-PoP.

Figura 11. La permeabilización de membrana por lipopéptidos. Los liposomas cargados con sulforodamina B se incubaron con los péptidos indicados (5 µg/mL) a temperatura ambiente y se evaluó la liberación utilizando fluorescencia. Para cada conjunto de barras, las barras desde izquierda a derecha son: 8 horas y 24 horas.

Figura 12. La unión de péptido RGD-His a liposomas que contienen 1 molar % de CoPoP y direccionamiento celular. (a) Fluorescencia de péptido normalizada tras incubación con liposomas CoPoP que contienen 1 molar % de CoPoP. La emisión se normalizó al comparar las muestras CoPoP con 2H-PoP. (b) Absorción celular de liposomas de sulforodamina B que contienen 1 molar% de CoPoP, incubados con células tal como se indica. Para cada conjunto de barras, las barras desde izquierda a derecha son: Células MCF7 y células U87.

Figura 13. Las nanopartículas recubiertas con oro con una superficie de unión marcada con CoPoP his. (a) Fotografía de protocolo de recubrimiento para dispersar la nanoesfera de oro. Sin el recubrimiento PoP, el citrato estabilizó los agregados de oro seguido de etapas de centrifugación repetida (flecha). (b) El tamaño de nanoesferas antes y después de recubrimiento con lípidos. El añadido muestra la micrografía de electrones de transmisión de oro CoPoP con una barra de escala de 50 nm. (c) El espectro de absorción de oro estabilizado con citrato y oro CoPoP seguido de unión RGD-His. (d) Las imágenes de reflectancia confocal mostrando la absorción de nanoesferas diana. Las células se incubaron con las nanoesferas de oro indicadas durante 2 horas, se lavaron y, a continuación, se visualizaron. Todas las imágenes se obtuvieron con las mismas configuraciones.

Figura 14. (A) Psf25 (Pfs25 _ B) la unión se midió utilizando un ensayo de filtración con centrifuga. Estos datos indican el 100% de unión de la proteína Psf25 a liposomas Co-PoP. (B) El tamaño de partícula de liposomas CoPoP antes y después de la unión a proteína Psf25.

Figura 15. Los niveles de anti-Psf25 IgG en ratones CD-I. Los ratones se vacunaron con Psf25 en CoPoP/MPL o ISA70 después de las inyecciones intramusculares con (A) pre-estimulación y (B) después de estimulación, primeras tres semanas/estimulación de tres semanas (5, 0,5 o 0,05 ug Psf25 por inyección). Se midieron los títulos IgG utilizando técnica ELISA sobre placas con 96 pocillos de ratones vacunados con liposomas CoPoP (Psf25) o proteína Psf25 libre (con o sin ISA70). Los datos muestran media +/- S.D. para n=5 ratones por grupo.

Figura 16. Títulos de Anti-Psf25 IgG. Los títulos se definieron como dilución en suero recíproca que produjo una absorbancia superior a 0,5 sobre el fondo.

Figura 17. La ilustración y la caracterización de diferentes longitudes de recubrimiento de péptido NANP sobre liposomas CoPoP. (A) Diferentes números de péptido que repite NANP que contiene 7x de etiqueta de histidina (His). (B) Diámetro promedio y polidispersidad (PDI) de liposomas CoPoP conjugados con diferentes longitudes de péptido NANP se calcularon utilizando dispersión dinámica de luz (n = 3). Barras de errores, SD. (C) Se midió la unión de péptido a péptidos NANP con liposomas CoPoP y 2HCoPoP utilizando el proceso de filtración con microcentrífuga y ensayo de BCA (n=3).

Figura 18. Los títulos anti MPER IgG en ratones tratados previamente con liposomas CoPoP/fosfatidilserina unidos a MPER etiquetado con his. Los ratones se trataron previamente con liposomas MPER/CoPoP/PS 4 semanas y 2 semanas antes de la inyección de MPER en liposomas CoPoP/MPLA para inducir una respuesta de anticuerpos frente

a MPER.

Figura 19. La fluorescencia de células U87 seguida de incubación con liposomas CoPoP unidos a diferentes CPPs etiquetados con his.

5 DESCRIPCIÓN DE LA DIVULGACIÓN

[0013] La presente divulgación da a conocer nanoestructuras que comprenden como mínimo una monocapa. Por ejemplo, las estructuras pueden comprender una monocapa o una bicapa, en la que la monocapa o la bicapa comprenden conjugados de porfirina-fosfolípido que tienen cobalto quelado a los mismos de tal modo que el cobalto se encuentra dentro de la bicapa. Las estructuras de bicapa pueden formar liposomas. Las estructuras pueden comprender dos monocapas (bicapas), en las que los grupos hidrofóbicos de las dos monocapas se oponen y los grupos hidrofílicos se exponen en la superficie.

[0014] En el presente documento la divulgación que se refiere bicapas también es aplicable a monocapas. Las bicapas o las monocapas se denominan a veces «membranas» en el presente documento.

[0015] Todos los rangos proporcionados en el presente documento incluyen todos los valores que se encuentran dentro de los rangos hasta la décima cifra decimal, a menos que se indique lo contrario.

[0016] Algunas o todas de las porfirinas de cobalto en las moléculas etiquetadas con polihistidina unidas de manera no covalente a monocapa o bicapa de tal modo que como mínimo una parte de los residuos marcados con polihistidina dentro de la bicapa y la molécula marcada está presente sobre la superficie de la bicapa. En las bicapas y monocapas actuales, se considera que uno o más residuos de histidina en la etiqueta de polihistidina se coordinan con el núcleo metálico de cobalto dentro de la bicapa, proporcionando de este modo estabilidad a la estructura. Los residuos de histidina de una etiqueta de polihistidina se coordinan con el metal de cobalto en el núcleo de la porfirina en la membrana. La etiqueta de histidina completa puede residir dentro de la bicapa. Un conjugado de porfirina fosfolípido que tiene metal cobalto conjugado al mismo se denomina CoPoP en el presente documento. Los liposomas en los que la bicapa comprende CoPoP se denominan en el presente documento liposomas CoPoP. Los liposomas CoPoP se funcionalizan con moléculas marcadas con histidina. El término «moléculas marcadas con his» tal como se utiliza en el presente documento significa moléculas - tales como, por ejemplo, péptidos, polipéptidos o proteínas - que tienen una cola de histidina. Por ejemplo, un péptido con una cola de histidina es una molécula marcada con histidina. Tales liposomas CoPoP que contienen etiqueta his se denominan en el presente documento liposomas CoPoP etiquetados con his o CoPoP etiquetados con his.

[0017] Las monocapas o bicapas CoPoP funcionalizadas con moléculas presentadoras marcadas con his de la presente divulgación dan a conocer una plataforma para la presentación de diferentes moléculas de interés en la circulación o para la administración en localizaciones deseadas o para la generación de respuestas inmunes específicas para aquellas moléculas marcadas con his. Estas moléculas se denominan en el presente documento moléculas presentadoras (MPs). Las estructuras que contienen bicapas CoPoP marcadas con his, que tienen Mps acopladas a la etiqueta de histidina muestran estabilidad deseada. Las moléculas marcadas con his no se acoplan (se coordinan con) de manera covalente a los CoPoP y pueden prepararse utilizando procedimiento de incubación. Por consiguiente, el procedimiento no necesita eliminación de fracciones reactivas tales como maleimida y similares - catalizadores exógenos o aminoácidos no naturales que se utilizan en otros tipos de químicas de conjugación.

[0018] La porfirina de cobalto puede encontrarse en una bicapa en liposomas autoensamblados que contienen en sí mismos un compartimento acuoso. Alternativamente, puede ser un recubrimiento de capa única o bicapa que recubre otras nanopartículas. El porfirina de cobalto fosfolípido (CoPoP) se comporta como un lípido convencional en lo que respecta a su naturaleza anfipática. Por consiguiente, las monocapas o las bicapas que comprenden CoPoP pueden utilizarse para el recubrimiento de nanopartículas utilizando los procedimientos que se conocen por los expertos en la técnica. La bicapa o la monocapa de la presente divulgación puede presentarse sobre otras nanopartículas, tal como, por ejemplo, en forma de un recubrimiento. En una realización, la bicapa o la monocapa que contiene porfirina de cobalto está presente como un recubrimiento sobre nanopartículas de oro. En una realización, el recubrimiento puede estar en forma de monocapas. En un ejemplo divulgado, pero no reivindicado, la monocapa o la bicapa que contiene porfirina de cobalto (por ejemplo, porfirina de cobalto-fosfolípido) está presente como un recubrimiento sobre superficies hidrofóbicas tales como nanotubos de carbono. En un ejemplo divulgado, pero no reivindicado, las monocapas pueden formar micelas que envuelven una o más moléculas hidrofóbicas.

[0019] Esta divulgación proporciona una nanoestructura que comprende una monocapa o una bicapa, en la que la monocapa o la bicapa comprende: i) fosfolípidos y ii) porfirina que contiene cobalto coordinado con ella misma formando porfirina de cobalto. La nanoestructura contiene también una o más moléculas presentadoras marcadas con polihistidina. Como mínimo una parte de la etiqueta de polihistidina reside en la parte hidrofóbica de la monocapa o la bicapa y una o más histidinas de la etiqueta de polihistidina se coordinan con el cobalto en la porfirina de cobalto. Como mínimo una parte de la molécula presentadora marcada con histidina se expone sobre la parte exterior de la nanoestructura. La nanoestructura puede estar en forma de un liposoma que contiene un compartimento acuoso. Sin embargo, la nanoestructura puede recubrir también una nanopartícula de oro. La porfirina de cobalto se conjuga con un fosfolípido para formar un conjugado de porfirina de cobalto-fosfolípido. La porfirina de cobalto puede constituir

desde 1 hasta 100 % molar de la monocapa o la bicapa, que incluye 0,1 % molar de valores y rangos entre ellos. Por ejemplo, la porfirina de cobalto puede constituir desde 1 hasta 20 % molar, o desde 5 hasta 10 % molar de la monocapa o la bicapa. Si la porfirina de cobalto constituye 100% de la monocapa o la bicapa, entonces, no existen fosfolípidos presentes que no se conjugan con porfirina de cobalto. La bicapa o la monocapa pueden comprender también esterol y/o polietilenglicol. El esterol puede ser colesterol.

[0020] El número de histidinas en la etiqueta de poliestidina en la monocapa o la bicapa puede ser desde 2 hasta 20. Por ejemplo, el número de histidinas en la etiqueta de polihistidina puede ser desde 6 hasta 10. Por ejemplo, el número de histidinas puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20.

[0021] Los liposomas pueden ser esféricos o no esféricos. El tamaño de los liposomas puede ser desde 50 hasta 1000 nm o superior. En una realización, los liposomas tienen un tamaño (por ejemplo, una dimensión más larga tal como, por ejemplo, un diámetro) de 50 hasta 1000 nm, que incluye todos los valores y rangos de números enteros de nm entre ellos. Por ejemplo, el tamaño puede ser desde 50 hasta 200 nm o desde 20 hasta 1000 nm. Si los liposomas no son esféricos, la dimensión más larga puede ser desde 50 hasta 1000 nm. Estas dimensiones pueden alcanzarse mientras se conserve la anchura de nanoestructura de la monocapa o la bicapa. Los liposomas pueden llevar carga en el compartimento acuoso. La carga, o una parte de ella, puede también, o alternativamente, incorporarse en la monocapa o la bicapa.

[0022] En una realización, esta divulgación da a conocer un liposoma que comprende: una bicapa, en donde la bicapa comprende un conjugado porfirina de cobalto-fosfolípido, opcionalmente, fosfolípidos que nos se conjugan con porfirina de cobalto y una molécula presentadora marcada con polihistidina, en la que como mínimo una parte de la etiqueta de polihistidina se encuentra en la parte hidrofóbica de la bicapa y una o más histidinas de la etiqueta de polihistidinas se coordinan con el cobalto en los conjugados de porfirina de cobalto-fosfolípido. Como mínimo una parte de la molécula presentadora marcada con polihistidina se expone sobre la parte exterior de la nanoestructura. El liposoma incluye un compartimento acuoso. La bicapa no necesita contener ningún fosfolípido que no se conjugue con porfirina de cobalto y en este caso solamente tiene conjugados de porfirina de cobalto-fosfolípido. La carga puede encontrarse en el compartimento acuoso. La carga no necesita estar exclusivamente en el compartimento acuoso y una parte de ella puede encontrarse en la bicapa.

[0023] También se da a conocer y no se reivindica de por sí una monocapa o una bicapa que comprende monómeros de fosfolípidos y porfirina que contiene cobalto coordinado con ellos mismos (formando porfirina de cobalto). La monocapa o la bicapa se ha asociado con esto una o más moléculas presentadoras marcadas con polihistidina, en las que como mínimo una parte de la etiqueta de polihistidina se encuentra en la parte hidrofóbica de la monocapa o la bicapa. Una o más histidinas de la etiqueta de polihistidina se coordinan con el cobalto en la porfirina de cobalto y como mínimo una parte de la molécula presentadora marcada con polihistidina se encuentra en la parte exterior de la bicapa o la monocapa. En diferentes ejemplos, la monocapa o la bicapa incluyen un compartimento acuoso o forma un recubrimiento sobre una nanopartícula - tal como una nanopartícula de oro o sílice.

[0024] Esta divulgación proporciona una nanoestructura que comprende un núcleo y una monocapa o una bicapa que recubre el núcleo, en donde la monocapa o la bicapa comprende fosfolípidos y porfirina que contiene cobalto coordinado con ella misma formando porfirina de cobalto. La nanoestructura contiene una o más moléculas presentadoras marcadas con polihistidina, en donde como mínimo una parte de la etiqueta de polihistidina reside en la parte hidrofóbica de la monocapa o la bicapa y una o más histidinas de la etiqueta de polihistidina se coordinan con el cobalto en la porfirina de cobalto. Como mínimo una parte de la molécula presentadora marcada con polihistidina se expone sobre la parte exterior de la nanopartícula. El núcleo de la nanoestructura puede ser una nanopartícula de oro.

[0025] Los liposomas o nanopartículas que tienen un recubrimiento o una monocapa o una bicapa, tal como se describe en el presente documento tienen moléculas presentadoras en ellos, que pueden ser moléculas antigénicas y/o moléculas diana. Las moléculas presentadoras pueden proporcionar también la habilidad de direccionamiento y/o visualización u otras funcionalidades.

[0026] Los liposomas u otras nanoestructuras que comprenden polipéptidos etiquetados con his y composiciones CoPoP muestran alta estabilidad en suero con respecto a la unión del polipéptido etiquetado con his al liposoma. En una realización, cuando se incuba con el suero (tal como suero diluido) a temperatura ambiente, más de 60% del péptido etiquetado con his permanece unido a la bicapa que contiene CoPoP después de 24 horas de incubación. En una realización, más de 85% del péptido etiquetado con his permanece unido a la capa CoPoP después de la incubación con suero durante 24 horas.

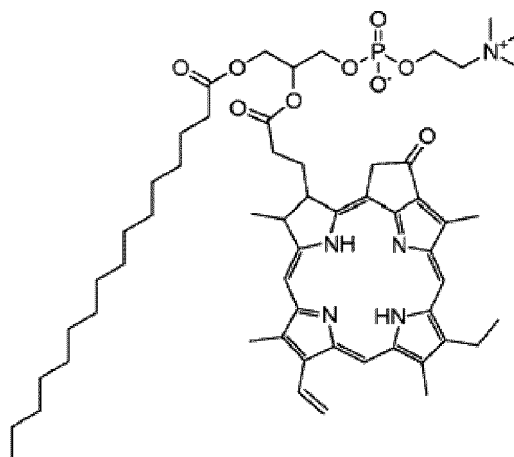
[0027] Los liposomas CoPoP o los liposomas CoPoP etiquetados con his pueden cargarse con carga - que típicamente se encuentra en el compartimento acuoso, pero puede encontrarse completamente o parcialmente incrustada en la bicapa - si es hidrofóbica o contiene un componente hidrofóbico. Además de tener las moléculas presentadoras en la superficie, estas estructuras pueden utilizarse para cargar la carga en el compartimento acuoso dentro de las estructuras o en la bicapa. La liberación de la carga de los liposomas CoPoP puede desencadenarse utilizando luz infrarroja cercana (NIR). La carga puede liberarse en localizaciones deseadas - tal como utilizando

asimilación en las células diana o mediante liberación desencadenada por luz.

[0028] Las monocapas o las bicapas de porfirina de cobalto es una porfirina que contiene un catión de cobalto (Co) conjugado con la porfirina. La porfirina se conjuga con un fosfolípido (denominado en el presente documento como un porfirina de cobalto-fosfolípido o conjugado de porfirina de cobalto-fosfolípido).

[0029] La parte de porfirina del conjugado porfirina de cobalto que constituye como mínimo una parte de algunas de las bicapas de los liposomas u otras estructuras que comprenden porfirinas, derivados de porfirina, análogos de porfirina o combinaciones de los mismos. Las porfirinas de ejemplo incluyen hematoporfirina, protoporfirina y tetrafenilporfirina. Los derivados de porfirina de ejemplo incluyen pirofeoforbidas, bacterioclorofilas, Clorofila A, derivados de benzoporfirina, clorinas de tetrahidroxifenilo, purpurinas, benzoclorinas, naftoclorinas, verdinas, rodinas, cetoclorinas, azaclorinas, bacterioclorinas, toliporfinas y benzobacterioclorinas. Los análogos de porfirina de ejemplo incluyen miembros de familia de porfirina expandidos (tales como texafricanas, sapfirinas y hexafricanas) e isómeros de porfirina (tales como porfícenos, porfirinas invertidas, ftalocianinas y naftalocianinas). Por ejemplo, la porfirina de cobalto puede ser una vitamina B12 (cobalamina) o derivado.

[0030] En una realización, el PoP es pirofeoforbida-fosfolípido. La estructura de pirofeoforbida-fosfolípido se muestra a continuación:



[0031] En una realización, la capa (monocapa o bicapa) contiene solamente CoPoP que tiene sus moléculas presentadoras marcadas con his incrustadas en ella. En esta realización, el único fosfolípido en la capa es CoPoP (es decir, CoPoP es 100 % molar). En una realización, la capa (monocapa o bicapa) contiene solamente CoPoP y porfirina conjugados con fosfolípidos (PoP), en donde CoPoP contiene histidinas incrustadas ahí dentro, con las histidinas que tienen un péptido u otras moléculas presentadoras acopladas a ellas. En determinadas realizaciones, no existe ningún otro fosfolípido, pero la capa (monocapa o bicapa) puede contener opcionalmente esteroides y/o lípidos PEG.

[0032] En una realización, además de CoPoP, la bicapa o la monocapa también contiene fosfolípidos que no se conjugan con porfirina y por lo tanto, no se coordinan con Co. Tales fosfolípidos pueden denominarse en el presente documento como «fosfolípidos adicionales». La bicapa o la monocapa pueden comprender también esteroles y lípidos PEG. En una realización, la bicapa o la monocapa consiste esencialmente en o consiste en CoPoP, los fosfolípidos que no se conjugan con las porfirinas y, opcionalmente, esteroles y/o PEG pueden conjugarse con el lípido. En una realización, el único metal-PoP en la bicapa es CoPoP, que tiene moléculas presentadoras marcadas con his incrustadas en ella. En una realización, el único metal en la bicapa es Co.

[0033] En una realización, la bicapa de los liposomas comprende CoPoP y PoP. Además del CoPoP y el PoP, la bicapa puede contener fosfolípidos adicionales. La bicapa o la monocapa puede comprender adicionalmente esteroles y/o PEG. El PEG puede conjugarse con un lípido. En una realización, la bicapa consiste esencialmente en o consiste en CoPoP, PoP, fosfolípidos adicionales y, opcionalmente, esteroles y/o PEG, en donde el PEG puede conjugarse con el lípido. En una realización, el único metal-PoP en la bicapa es CoPoP. En una realización, el único metal en la bicapa es Co.

[0034] En una realización, el CoPoP está presente en las nanopartículas desde 0,1 hasta 10 % molar con el resto desde 99,9 hasta 90 % molar siendo constituido por lípidos adicionales, con el porcentaje que es de los lípidos de bicapa entera. Por ejemplo, la combinación de CoPoP puede estar presente desde 0,1 hasta 10 % molar, esteroles puede estar presente desde 0,1 hasta 50 % molar, opcionalmente, derivados de lípido A atenuados, tales como monofosforil lípido A o monofosforil lípido A desacetilado en posición 3 o un análogo relacionado puede estar presente desde 0 hasta 20 % molar o desde 0,1 hasta 20 % molar, y el resto puede constituirse por los fosfolípidos adicionales.

Los fosfolípidos son DOPC, DSPC, DMPC o combinaciones de los mismos, y esterol, si está presente, puede ser colesterol.

[0035] En una realización, la combinación de CoPoP y PoP puede estar presente en las nanopartículas desde 0,1 hasta 10 % molar con los 99,9 hasta 90 % molar restantes que se constituyen por los fosfolípidos adicionales. Por ejemplo, la combinación de CoPoP y PoP puede estar presente desde 0,1 hasta 10 % molar, esterol puede estar presente desde 0 hasta 50 % molar o desde 0,1 hasta 50 % molar, opcionalmente, PEG puede estar presente desde 0 hasta 20 % molar o desde 0,1 hasta 20 % molar, y el resto puede constituirse por los fosfolípidos. Los fosfolípidos pueden ser DOPC, DSPC, DMPC o combinaciones de los mismos, y esterol, si está presente, puede ser colesterol.

[0036] Como se usa en el presente documento, «fosfolípido» es un lípido que tiene un grupo principal hidrofílico que tiene un grupo fosfato conectado vía un eje central de glicerol a una cola lipídica hidrofóbica. El fosfolípido comprende una cadena lateral de acilo desde 6 hasta 22 carbonos, que incluye todos los números enteros de carbonos e intervalos entremedio. En determinadas realizaciones, el fosfolípido en el conjugado de porfirina es 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina. El fosfolípido del conjugado de porfirina puede comprender o consistir esencialmente en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y/o fosfatidilinositol.

[0037] En determinadas realizaciones, la porfirina se conjuga con el grupo glicerol sobre el fosfolípido a través de un enlazador de cadena de carbono de 1 hasta 20 carbonos, que incluye todos los números enteros de carbonos entremedio.

[0038] En diferentes realizaciones, además de los conjugados de porfirina divulgados en el presente documento, la bicapa de los liposomas comprende también otros lípidos fosfolípidos. Las cadenas de ácidos grasos de estos fosfolípidos pueden contener un número adecuado de átomos de carbono para formar una bicapa. Por ejemplo, la cadena de ácidos grasos puede contener 12, 14, 16, 18 o 20 átomos de carbono. En diferentes realizaciones la bicapa comprende fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y/o fosfatidilinositol.

[0039] Estas bicapas y monocapas presentes pueden comprender también esteroides. Los esteroides pueden ser esteroides de origen animal o esteroides de origen vegetal. Los ejemplos de esteroides incluyen colesterol, sitosterol, estigmasterol y colesterol. En las realizaciones, colesterol puede estar presente desde 0 % molar hasta 50 % molar, o desde 0,1 hasta 50 % molar. En otras realizaciones, colesterol puede estar presente desde 1 hasta 50 % molar, desde 5 hasta 45 % molar, desde 10 hasta 30 % molar.

[0040] En determinadas realizaciones, la bicapa o la monocapa comprende además un lípido PEG. El lípido PEG puede ser DSPE-PEG tal como DSPE-PEG-2000, DSPE-PEG-5000 u otros tamaños de DSPE-PEG. El lípido PEG está presente en una cantidad desde 0 hasta 20 % molar, que incluye todas las cantidades de porcentaje entremedio hasta el décimo punto decimal. El peso molecular promedio de la fracción PEG puede ser entre 500 y 5000 Dalton y todos los valores enteros e intervalos entremedio.

[0041] En determinadas realizaciones, la bicapa o la monocapa comprende además un adyuvante, tal como derivados de lípido A atenuados, tales como monofosforil lípido A o monofosforil lípido A desacetilado en posición 3.

[0042] La etiqueta de histidina (etiquetado con his) puede llevar una variedad de moléculas presentadoras de interés para diferentes usos. Como mínimo uno o ambos extremos de la etiqueta his pueden estar cerca de la superficie exterior del liposoma. En una realización, como mínimo un extremo de la etiqueta de polihistidina se acopla de manera covalente a una molécula presentadora. En una realización, la etiqueta his es una cadena de como mínimo 2 histidinas. En una realización, la etiqueta his es una cadena de 2-20 histidinas. En una realización, la etiqueta his es una cadena de desde 4-12 histidinas y todos los números enteros entremedio. En una realización, es desde 6-10 histidinas. En una realización, es de 6, 7, 8, 9 o 10 histidinas. En una realización, un extremo de la etiqueta his es libre y un péptido u otra molécula se acopla al otro extremo. Se considera que como mínimo una parte de la etiqueta his se encuentra dentro de la bicapa de tal modo que se coordina con el núcleo metálico de cobalto.

[0043] Los liposomas de la presente divulgación (sin las moléculas marcadas con his) pueden ser sustancialmente esféricas y tener un tamaño (por ejemplo, la dimensión más larga tal como, por ejemplo, un diámetro) desde 30 nm hasta 250 nm, que incluye todos los números enteros para el nm y rangos entremedio. En una realización, el tamaño de los liposomas es desde 100-175 nm. En una realización, como mínimo 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% de los liposomas en la composición tienen un tamaño desde 30 hasta 250 nm o desde 100 hasta 175 nm. Los liposomas o las nanoestructuras pueden ser mayores a 200 nm. En una realización, las nanoestructuras son superiores a 1000 nm. En una realización, las nanoestructuras son desde 200 hasta 1000 nm. Los liposomas o las nanoestructuras pueden ser esféricos o no esféricos. En una realización, las dimensiones más grandes de las nanoestructuras son inferiores a 200 nm, mientras se conserva la anchura de nanoestructura de la monocapa o la bicapa. En una realización, el tamaño la nanoestructura supera 200 nm en algunas dimensiones, mientras se conserva la anchura de nanoestructura de la monocapa o la bicapa. En una realización, el tamaño de la nanoestructura supera 1000 nm en algunas dimensiones, mientras se conserva la anchura de nanoestructura de la monocapa o la bicapa.

[0044] Se divulga pero no se reivindica propiamente dicho una composición que comprende liposomas u otras

estructuras de la presente divulgación o una mezcla de diferentes liposomas u otras estructuras. Las composiciones pueden comprender también un portador estéril adecuado para la administración a individuos que incluyen humanos, tal como, por ejemplo, un tampón fisiológico tal como sacarosa, dextrosa, solución salina, elemento que regula pH (tal como desde pH 5 a 9, desde pH 7 a 8, desde pH 7,2 a 7,6, (por ejemplo, 7,4)) tal como histidina, citrato o fosfato. En un ejemplo, la composición comprende como mínimo 0,1% (p/v) de liposomas CoPoP o liposomas CoPoP etiquetados con his u otras estructuras. En diferentes ejemplos, la composición comprende desde 0,1 hasta 100 % molar de liposomas CoPoP o liposomas CoPoP etiquetados con his u otras estructuras tales como nanopartículas recubiertas con bicapa. En un ejemplo, la composición comprende desde 0,1 hasta 99 % molar de liposomas CoPoP que tienen moléculas presentadoras marcadas con his asociadas a ellos.

[0045] En un ejemplo, las composiciones de la presente divulgación son libres de grupos reactivos a maleimida o éster succinimidilo. En un ejemplo, la molécula marcada puede acoplarse a la membrana que no tiene un aminoácido no natural.

[0046] La molécula presentadora que lleva la etiqueta his puede ser una molécula pequeña o una macromolécula. En una realización, la molécula es un péptido o un derivado de péptido. En una realización, la molécula es un polipéptido, polinucleótido, carbohidrato o polímero. La etiqueta his puede conjugarse químicamente con la molécula de interés. La etiqueta his puede incorporarse en la secuencia de aminoácidos primarios de un polipéptido. En una realización, la molécula es un antígeno, tal como un péptido (2-50 aminoácidos y todos los péptidos con longitudes de aminoácidos entre 2 y 50) o un polipéptido (50 -1.000 aminoácidos y todos los polipéptidos con longitudes de aminoácidos entre 50 -1.000) o una proteína (superior a 1.000 aminoácidos). El péptido, polipéptido o proteína pueden contener solamente aminoácidos de origen natural o pueden ser una mezcla de aminoácidos de origen natural y de origen no natural o pueden tener solamente aminoácidos de origen no natural.

[0047] Las moléculas presentadoras acopladas a la etiqueta his pueden ser una moléculas antigénicas, moléculas diana, moléculas terapéuticas, moléculas de diagnóstico o moléculas que proporcionan cualquier otro tipo de funcionalidad. Las moléculas marcadas pueden utilizarse para el direccionamiento, es decir, guiar las estructuras que llevan las monocapas o las bicapas a sus localizaciones diana. Por ejemplo, un ligando de péptido puede acoplarse a la etiqueta his de tal modo que el ligando guía a los liposomas (u otras estructuras) a las células que tienen receptores o moléculas de reconocimiento para los ligandos. En una realización, el péptido acoplado podría proporcionar funcionalidad alternativa o adicional tal como, por ejemplo, el péptido acoplado podría proporcionar funcionalidad terapéutica, diagnóstica o inmunogénica.

[0048] En determinadas realizaciones, la molécula presentadora puede ser una molécula diana tal como un anticuerpo, péptido, aptámero u otras moléculas tal como ácido fólico. El término «molécula diana» se utiliza para hacer referencia a cualquier molécula que puede dirigir la bicapa que contiene la estructura, tal como liposoma a una diana particular, por ejemplo, uniéndola a un receptor u otra molécula sobre la superficie de una célula diana. Las moléculas diana pueden ser proteínas, péptidos, moléculas de ácido nucleico, sacáridos o polisacáridos, ligandos de receptores u otras moléculas pequeñas. El nivel de especificidad se puede modular a través de la selección de la molécula diana. Por ejemplo, los anticuerpos muestran típicamente una alta especificidad. Estos pueden ser policlonales, monoclonales, fragmentos, recombinantes, de cadena única o nanocuerpos, muchos de los cuales son disponibles comercialmente u obtenidos fácilmente utilizando técnicas estándar.

[0049] La molécula presentadora puede ser una molécula antigénica - es decir, una molécula que lleva epítopos antigénicos. En una realización, la molécula es un péptido. En una realización, el péptido es una secuencia de péptidos que contiene RGD. Tales secuencias pueden ser de 7-20 aminoácidos o superiores que contienen un epítipo. El péptido puede ser un fragmento de, o puede comprender un epítipo de un polipéptido o proteína que es parte de un microorganismo, tal como un microorganismo patógeno. El péptido puede ser un fragmento de un polipéptido o proteína que generalmente es no inmunogénico, tal como, por ejemplo, una proteína vírica que se conoce por ser parcialmente inmunogénica. El péptido puede ser un fragmento de, o puede comprender un epítipo de, un antígeno VIH, tal como una proteína de la envoltura exterior VIH. En una realización, el antígeno VIH es gp41. Por ejemplo, el péptido puede ser la región externa próxima a membrana (MPER) de la envoltura gp41.

[0050] También se describen, pero no se reivindican de por sí las composiciones antigénicas. Las composiciones comprenden estructuras que contienen bicapa en la que un antígeno que tiene una cola de histidina se conjuga de manera no covalente con la porfirina de cobalto (o porfirina de cobalto fosfolípido) de tal modo que la etiqueta his se incrusta en la bicapa y uno o más epítopos del antígeno se exponen en la superficie. Las composiciones pueden comprender adyuvantes u otros portadores conocidos en la técnica. Los ejemplos de adyuvantes incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, monofosforil lípido A (MPL), fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre o saponina. Pueden utilizarse también otros portadores como agentes humidificantes, emulsionantes, rellenos, etc.

[0051] Se puede cargar una variedad de cargas en los liposomas u otras estructuras de la presente divulgación. La carga puede administrarse a localizaciones deseadas utilizando luz infrarroja cercana. Por ejemplo, agentes bioactivos o terapéuticos, sustancias farmacéuticas o fármacos pueden encapsularse dentro de la parte interior del liposoma CoPoP. Esto incluye fármacos solubles en agua y también fármacos que son ácidos débiles o bases que se pueden

cargar utilizando gradientes químicos y concentrados en el núcleo acuoso del liposoma. Por lo tanto, en diferentes realizaciones, el liposoma comprende un agente activo encapsulado en él, tal como un agente terapéutico y/o un agente de diagnóstico, que puede ser un agente quimioterapéutico tal como doxorubicina. El agente quimioterapéutico de doxorubicina podría cargarse activamente y liberarse con irradiación NIR, proporcionando liberación desencadenada por luz firme y directa utilizando liposomas CoPoP.

[0052] En una realización, el promedio de lípido a fármaco (o cualquier otro agente de carga) es desde 10:1 a 5:1. En diferentes realizaciones, el promedio de lípido a fármaco/carga es de 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1 o 5:1. El lípido utilizado para calcular los promedios incluye todos los lípidos que incluyen fosfolípido que es una parte del conjugado de porfirina fosfolípido, fosfolípidos adicionales o esteroles y lípido conjugado con PEG, si está presente. Aunque en ocasiones, la carga se describe como un fármaco en la divulgación, la descripción es igualmente aplicable a cualquier agente comprendido para tratamiento y/o administración en una localización deseada, y el término «fármaco» pretende hacer referencia a cualquier agente. El agente puede contenerse, en su totalidad o en parte, dentro o en los liposomas PoP si está presente en el compartimiento acuoso, la bicapa o ambos.

[0053] En una realización, la carga cargada dentro de los liposomas u otros portadores es un agente terapéutico. El término «agente terapéutico» se reconoce en la técnica y hace referencia a cualquier fracción química que es una sustancia biológicamente, fisiológicamente o farmacológicamente activa. Los ejemplos de agentes terapéuticos, a los que se refiere también como «fármacos», se describen en referencias literarias bien conocidas tales como El Índice Merck, the Physicians Desk Reference, y The Pharmacological Basis of Therapeutics, e incluyen, sin limitación, medicamentos; vitaminas; suplementos minerales; sustancias utilizadas para el tratamiento, prevención, diagnóstico, cura o mitigación de una enfermedad o trastorno; sustancias que afectan la estructura o la función del cuerpo; o profármacos, que se convierten en biológicamente activos o más activos después de su colocación en un entorno fisiológico. Se pueden usar varias formas de un agente terapéutico que son capaces de ser liberados de la composición de sujeto en tejidos o fluidos adyacentes al administrarlas a un sujeto. Los fármacos que se conocen que se pueden cargar utilizando gradientes activos incluyen doxorubicina, daunorubicina, gemcitabina, epirubicina, topotecan, vincristina, mitoxantrona, ciprofloxacino y cisplatino. La carga terapéutica incluye también diferentes antibióticos (tal como gentamicina) u otros agentes efectivos contra infecciones causadas por bacterias, hongos, parásitos u otros organismos. Estos fármacos se pueden cargar y liberarse en liposomas CoPoP.

[0054] En una realización, la carga cargada dentro del liposoma es un agente de diagnóstico. Un «diagnóstico» o «agente de diagnóstico» es cualquier porción química que se puede usar para el diagnóstico. Por ejemplo, los agentes de diagnóstico incluyen agentes de visualización, tal como, por ejemplo, aquellos que contienen radioisótopos tales como indio o tecnecio; agentes de contraste que contienen yodo o gadolinio; enzimas tales como, por ejemplo, peroxidasa de rábano, GFP, fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa; sustancias fluorescentes tales como, por ejemplo, derivados de europio; sustancias luminiscentes tales como, por ejemplo, derivados de N- metilacridio o similares.

[0055] La carga puede comprender más de un agente. Por ejemplo, la carga puede comprender combinaciones de agentes de diagnóstico, terapéuticos, inmunogénicos y/o de visualización y/o cualquier otro tipo de agentes. El mismo agente puede tener múltiples funcionalidades. Por ejemplo, un agente puede ser diagnóstico y terapéutico, o un agente puede ser de visualización e inmunogénico y similar.

[0056] Las estructuras formadas por las capas de la presente divulgación son estables en suero. Por ejemplo, *in vitro*, la estabilidad de unión de etiqueta his a las bicapas CoPoP es estable cuando se incuba en 50% de suero bovino a temperatura ambiente durante 24 horas. Por consiguiente, estas estructuras pueden ser estables bajo las condiciones de suero o suero concentrado o diluido.

[0057] La presente divulgación da a conocer también estructuras que contienen las bicapas tal como se describen en el presente documento para su uso en procedimientos. En una realización, el procedimiento provoca una respuesta inmune en un huésped. El procedimiento comprende administrar a un individuo una composición que comprende una estructura que contiene bicapas CoPoP con las que se conjuga un antígeno etiquetado con histidina. Las composiciones pueden administrarse utilizando cualquier vía estándar de inmunización que incluye vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intratumoral o cualquier otra. Las composiciones pueden administrarse en una única administración o pueden administrarse en administraciones múltiples que incluyen inyecciones de refuerzo. Los títulos de anticuerpos pueden medirse para controlar la respuesta inmune.

[0058] Las nanoestructuras actuales pueden utilizarse para reducir el título de anticuerpo frente a antígenos deseados. Por ejemplo, si se desea reducir inmunogenecidad, se puede utilizar nanoestructuras en las que están presentes fosfolípidos que contienen PS (u otros). Las composiciones que comprenden estas nanoestructuras pueden administrarse para inmunogenecidad reducida.

[0059] Se da a conocer, pero no se reivindica un procedimiento de administración de agentes comprendidos como carga en los liposomas u otras nanoestructuras en localizaciones deseadas. El agente puede contenerse, en su totalidad o en parte, dentro o en los liposomas CoPoP - si está presente en el compartimiento acuoso, la bicapa o ambos. El procedimiento comprende 1) proporcionar una composición que comprende liposomas u otras estructuras

que contienen las bicapas de la presente divulgación que comprenden opcionalmente carga (tal como un principio activo); 2) permitir que los liposomas lleguen a destino seleccionado o deseado 3) irradiar al liposoma con radiación que tiene una longitud de onda de infrarrojo cercano bajo las condiciones tales que como mínimo una parte de la carga se libera del liposoma. Alternativamente o adicionalmente, la carga puede alcanzar el interior de la célula al internalizar los liposomas y, a continuación, liberar la carga bajo la acción de procedimientos intracelulares.

[0060] Los liposomas pueden irradiarse con luz infrarroja cercana desde un láser con potencia de 50 hasta 1000 mW/cm², incluyendo todos los valores enteros hasta el mW/cm² y los intervalos entremedio, con una longitud de onda de desde 650 hasta 1000 nm, incluyendo todos los valores enteros para los nm y los intervalos entremedio. En otro ejemplo, la longitud de onda es desde 650 hasta 800 nm, incluyendo todos los valores enteros para los nm y los intervalos entremedio. Los liposomas pueden irradiarse hasta 30 minutos o menos. En diferentes ejemplos, los liposomas *in vitro* o *in vivo* pueden irradiarse desde 0,5 hasta 30 minutos y todos los valores enteros hasta el décimo punto decimal entremedio. Por ejemplo, los liposomas se irradian con un láser de diodo de 658 nm hasta 10 minutos. En otros ejemplos, los liposomas se irradian con longitudes de onda de 665 o 671 nm. La radiación infrarroja se puede administrar en el área deseada directamente proyectando luz láser en el área o se puede utilizar sondas de fibra óptica. En el caso de un tumor, la sonda de fibra óptica se puede insertar en el tumor (es decir, vía un catéter o un dispositivo endoscópico) para proporcionar irradiación a un área localizado.

[0061] Se da a conocer, pero no se reivindica un procedimiento de preparación de bicapas que comprenden CoPoPs. Se puede producir PoP de base libre esterificando una porfirina de ácido monocarboxílico tal como pirofeoforbida-a con 2-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3 fosfocolina (liso-C16-PC), Avanti #855675P) utilizando I-Etil-3-(3 dimetilaminopropil)carbodiimida y 4-dimetilaminopiridina en cloroformo con una concentración de proporción molar de 1:1:2:2 liso-C16-PC:Piro:EDC:DMAP agitando durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, el PoP se purifica utilizando cromatografía en gel de sílice. CoPoP puede generarse poniendo en contacto un conjugado de porfirina-fosfolípido con un exceso molar (por ejemplo, exceso molar de 10-veces) de una sal de cobalto (por ejemplo, tetrahidrato de acetato de cobalto (II)) en un disolvente (por ejemplo, metanol) en la oscuridad.

[0062] En un ejemplo, esta divulgación da a conocer un procedimiento de recubrimiento de una nanopartícula con una bicapa o monocapa de porfirina de cobalto (por ejemplo, CoPoP). Generalmente el procedimiento comprende la hidratación de nanopartículas con una solución lipídica para dispersar las partículas en agua.

[0063] Para administrar la carga a localizaciones deseadas o para la administración general, la composición que comprende los liposomas en un portador adecuado puede administrarse a individuos utilizando cualquier vía adecuada. En un ejemplo, se administra vía infusión intravenosa de tal modo que entrará en la vasculatura (sistema circulatorio). Se puede administrar la composición de manera sistémica o se puede administrar directamente en el riego sanguíneo para un órgano o tejido o tumor particulares. Cuando se irradia con NIR, los contenidos de los liposomas PoP se pueden liberar en el sistema circulatorio y, a continuación, pueden entrar en el tejido circundante.

[0064] Los ejemplos siguientes se presentan para ilustrar la presente divulgación. No pretenden ser limitantes de ningún modo.

EJEMPLO 1

[0065] Este ejemplo describe la síntesis y funcionalización de bicapas de porfirina de cobalto y fosfolípidos (CoPoP) con ligandos etiquetados con histidina y antígenos.

[0066] **Materiales y Procedimientos.** Los materiales se obtuvieron de Sigma, a menos que se indique lo contrario. Los péptidos se obtuvieron de proveedores comerciales que determinaron la purea mediante HPLC y confirmaron la identidad mediante espectrometría de masas;

Nombre	Secuencia	Masa esperada	Masa observada	Pureza	Fuente
RGD-His	5-FAM-GRGDSPKGA-GAKGHHHHHHH (SEQ ID NO:1)	2475,52	2475,60	99,1%	GenScript
RGD libre	GRGDSPK (SEQ ID NO:2)	715,76	715,8	99,3%	GenScript
RGD-palm	5-FAM- GRGDSPKGA-GAKG (lys (ácido palmítico) (SEQ ID NO:3)	1882,15	ND	96,7%	GenScript
cRGD-His	Cyclo(RGDY(D-)-K(-Suc-PRG 12-HHHHHH)) (SEQ ID NO:4)	2280,5	2280,1	94,7%	Anaspec
0-His	5-F AM-KKGGGG (SEQ ID NO:5)	860,9	861,68	95,3%	Biomatik
2-His	5-F AM-KKGGGGHH (SEQ ID NO:6)	1135,18	1135,63	96,8%	Biomatik
4-His	5-F AM-KKGGGGHHHH (SEQ ID NO: 7)	1409,46	1409,20	93,6%	Biomatik
6-His	5-FAM-KKGGGGHHHHHH (SEQ ID NO:8)	1683,75	1683,40	92,8%	Biomatik
8-His	5-FAM-KKGGGGHHHHHHHH (SEQ ID NO:9)	1958,03	1957,30	92,9%	Biomatik
10-His	5-FAM-KKGGGGHHHHHHHHHH (SEQ ID NO:10)	2232,32	2231,64	90,9%	Biomatik
MPER-His	NEQELLELDKWAS-LWNGGKGGHHHHHHH (SEQ ID NO:11)	3304,52	3304,75	93,6%	GenScript
MPER-Biotina	NEQELLELDKW ASL WNGGK-Biotina (SEQ ID NO:12)	2584,91	2285,55	90,1%	GenScript

[0067] Para la unión a proteínas, se produjo la proteína informadora de fusión cerúlea-venus recombinante etiquetada con heptahistidina en *Escherichia coli* y se purificó y caracterizó como se describió previamente. Las aproximaciones estequiométricas se basaron en la suposición de que cada liposoma de -100 nm contiene 80.000 lípidos.

5

[0068] *Generación de PoP-lípido, PoP-liposomas y PoP-oro.* PoP sn-1-palmitoil sn-2-pirofoforbido fosfatidilcolina de base libre (2H) se sintetizó como se describió previamente. El CoPoP se generó agitando 100 mg de 2H-PoP con un exceso molar de 10 veces de tetrahidrato de acetato de cobalto (II) en 4 ml de metanol durante 17 horas en la oscuridad. La finalización de la reacción y la pureza del producto se controlaron por TLC (>90 % de pureza). A continuación, el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria y el PoP se extrajo con cloroformo:metanol:agua (1:1,8:1) 3 veces. Se recogió la capa de cloroformo, se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria y se liofilizó el producto en agua al 20 % en terc-butanol para dar 81,5 mg (77 % de rendimiento) (la identidad se confirmó con espectrometría de masas). Se sintetizaron otros metalo-PoP utilizando el mismo método. Para Ni-PoP, Se utilizó tetrahidrato de acetato de Ni (II) y se incubó durante 17 horas. Para Zn-PoP, se utilizó acetato de Zn (II) deshidratado y se incubó durante 17 horas. Para Mn-PoP, se utilizó acetato de Mn (II) y se incubó durante 30 horas. Para Cu-PoP, se utilizó acetato de Cu (II) y se incubó en tetrahydrofurano durante 3 horas.

10

15

[0069] Los liposomas de PoP se formularon a una escala de 1 mg. Después de disolver los lípidos en cloroformo en un tubo de ensayo, se evaporó el disolvente y la película se secó posteriormente al vacío durante la noche. Los lípidos se rehidrataron con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), se sonicaron, se sometieron a 10 ciclos de congelación y descongelación y, a continuación, se extruyeron a través de membranas de policarbonato de 100 nm (VWR n.º 28157-790) con una extrusora manual (Avanti n.º 610000). Para el análisis de unión de proteínas y péptidos, se formaron liposomas con 10 % molar de PoP junto con 85 % molar de DOPC (Avanti # 850375P) y 5 % molar de PEG-lípido (Avanti # 880120P). Los liposomas de Ni NTA incluían 10 % molar de Ni-NTA lípido dioleoil-glicerol-Ni-NTA (Avanti # 790404P), así como 10 % molar de 2H-PoP. Los liposomas que incorporaban coporfirina libre incluían 10 % molar de copirofoforbido con 85 % molar de DOPC y 5 % molar de PEG-lípido. Se preparó co-NTA-liposoma usando liposomas que contenían 10 % molar de dioleoil-glicerol-NTA (Avanti # 790528P). Los liposomas se incubaron con 20 mg/ml de cloruro de cobalto (II) durante 2 horas y a continuación se dializaron en PBS. Los liposomas cargados con sulforodamina B contenían 10 % molar de PoP, 35 % molar de colesterol (Avanti # 700000P), 55 % molar de DOPC y PEG-lípido, tal como se indica. Se usó una solución de sulforodamina B (VWR# 89139-502) para hidratar la película

20

25

30

lipídica, que a continuación se congeló-descongeló y a continuación se sonicó. El colorante no atrapado se eliminó con una columna Sephadex G-75 de 10 ml (VWR# 95016-784), seguido de diálisis en PBS. Para la integridad de la bicapa y los estudios de unión celular cuantitativos, se utilizó colorante 50 mM, mientras que los estudios de microscopía utilizaron colorante 10 mM.

[0070] Para el recubrimiento de oro, se usaron nanoesferas de oro estabilizadas con citrato de 60 nm (Ted Pella n.º 15709-20) para hidratar una película de lípidos de 1 mg compuesta por 45 % molar de diestearoil fosfocolina (Avanti n.º 850365P), 45 % molar de diestearoil fosfoglicerol (Avanti # 840465X) y 10 % molar de PoP. Después de un breve vórtice y sonicación, las muestras se centrifugaron repetidamente a 1500 de fuerza centrífuga relativa (ref) durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento y se volvió a centrifugar 2 veces más. El oro PoP se resuspendió en agua para su posterior análisis.

[0071] *Unión de polipéptidos.* Se incubó 1 µg de proteína informadora fluorescente con 20 µg de liposomas en 200 µl de PBS en una placa de 96 pocillos. La fluorescencia en el canal FRET (ex: 430 nm, em: 525 nm) se midió periódicamente con un lector de microplacas de fluorescencia (Tecan Infinite II). Los datos se normalizaron a la señal FRET en la proteína sin adición de liposomas. Los experimentos EMSA se realizaron con 2,5 µg de proteína incubada con 50 µg de liposomas, seguidos de electroforesis en un gel de agarosa al 0,75 % con 50 V aplicados durante 90 minutos e imágenes con un sistema IVIS Lumina II con los filtros de excitación y emisión indicados. Para la prueba de estabilidad del suero, se preincubaron 3 mg de proteína con 60 mg de liposomas en 40 µl de PBS. Después de 24 horas de incubación, se añadieron 40 µl de FBS y se incubaron durante otras 8 h (horas). Para experimentos de desplazamiento de imidazol, se unió 1 µg de proteína informadora a 20 µg de liposomas en PBS. A continuación, se tituló el imidazol y se evaluó la unión con fluorescencia. Para la estabilidad del suero, se unió 1 µg de proteína informadora a 20 µg de liposomas en 100 µl de PBS y, a continuación, se agregó un volumen igual de suero bovino fetal (VWR# 82013-602) y se controló la unión con fluorescencia. La unión al péptido se evaluó con inactivación de fluoróforo RGD-His FAM después de la incubación de 500 ng de péptido con 20 µg de liposomas.

[0072] *Experimentos de direccionamiento.* Las líneas celulares U-87 y MCF-7 se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron según el protocolo del proveedor. Se sembraron 2 x 10⁴ células durante la noche en pocillos de placas de 96 pocillos. Se unieron 500 ng de péptido RGD-His con 20 µg de liposomas cargados con sulforodamina B y los liposomas se incubaron con células durante 2 h. Se eliminó el medio, las células se lavaron con PBS 3 veces y, a continuación, las células y los liposomas se lisaron con una solución de Triton X-100 al 1%. La captación liposomal se evaluó midiendo la fluorescencia de la sulforodamina B.

[0073] Para la formación de imágenes confocales, se sembraron 10⁴ células durante la noche en un portaobjetos de cámara Nunc (Nunc # 155411) en DMEM con suero bovino fetal al 10 % (FBS). Se añadieron 20 µg de liposomas al medio que contenía suero y se incubaron durante 2 horas. Se eliminó el medio y las células se lavaron con PBS 3 veces. Se añadió medio fresco y se tomaron imágenes de las células con microscopía utilizando un microscopio de fluorescencia confocal Zeiss LSM 710. Las imágenes de oro se llevaron a cabo de la misma manera, pero se utilizó luz de 633 nm tanto para la excitación como para la emisión de imágenes por retrodispersión. Después de la unión del péptido, se centrifugó el oro para eliminar cualquier péptido RGD no unido.

[0074] Para los experimentos *in vivo*, se realizaron procedimientos con animales de acuerdo con las políticas y la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Buffalo (IACUC). Se inocularon ratones desnudos atímicos hembra de 5 semanas de edad (Jackson Labs) en el flanco con células U87 y los ratones se trataron cuando el crecimiento del tumor alcanzó 4-5 mm de diámetro. A los ratones se les inyectaron por vía intravenosa 200 µl de liposomas cargados con sulforodamina B (1 mg/ml de lípido) dirigidos con o sin cRGD-his. 45 minutos después de la inyección, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los órganos, se pesaron, se homogeneizaron mecánicamente en una solución de Triton X-100 al 0,2 % y se evaluó la fluorescencia para determinar la biodistribución.

[0075] *Vacunas.* A menos que se indique lo contrario, los ratones BALB/c hembra de 8 semanas de edad (Harlan Laboratories) recibieron inyecciones en las patas ventrales posteriores los días 0 y 14 que contenían 25 µg de péptido MPER en 50 µL de PBS estéril. Cuando se indicó, las inyecciones también incluyeron 25 µg de MPL (Avanti # 699800P) o TDB (Avanti # 890808P) en liposomas que comprendían DOPC:colesterol:MPL:PoP en una relación molar de 50:30:5:5. Para el adyuvante de Freund, el péptido se mezcló directamente en el adyuvante completo de Freund (Fisher n.º PI-77140) y se inyectó. 4 semanas después de la primera inyección, o según se indique, se recogió sangre de la vena submandibular y se obtuvo suero después de la coagulación de la sangre y centrifugación a 2000 ref durante 15 min y se almacenó a -80 °C.

[0076] El título de anti-MPER se evaluó mediante ELISA en placas recubiertas con estreptavidina de 96 pocillos (GBiosciences #130804). Se incubó 1 µg de MPER-biotina sin etiqueta de His en 100 µl de PBS que contenía Tween 20 al 0,1% (PBS-T) en los pocillos durante 2 h a 37°C. A continuación, los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-T y el suero de ratón se diluyó en serie en PBS que contenía caseína al 0,1 % (PBS-C) y se incubó durante 30 min a 37 °C. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-T, a continuación, se añadieron a los pocillos 100 µl de IgG-HRP anti-ratón de cabra (GenScript # AOO160) diluidos en PBS-C para proporcionar una concentración final que contenía 1 µg/ml de anticuerpo secundario y se incubaron durante 30 min a 37°C. Los pocillos se lavaron 5 veces con PBS-T, a

continuación, se añadieron 100 µl de solución de sustrato de tetrametilbencidina (Amresco # J644) a cada pocillo y se incubaron durante 20 min a 37°C. La reacción se detuvo con 100 µl de HCl 1 M y la absorción se midió a 450 nm. Los títulos se definieron como la dilución recíproca a la que la absorbancia a 450 nm excedía la dilución idéntica de la base sin suero en más de 0,05 unidades de absorbancia. Cada muestra se promedió a partir de mediciones duplicadas.

[0077] *Experimentos de entrada viral.* Los experimentos de entrada viral se llevaron a cabo como se describió anteriormente. En resumen, el VIH-I se produjo por cotransfección de pHXB2-env y pNL4-3.HSA.RE- en células 293T. 2 días después de la transfección, el medio celular se pasó a través de un filtro de 0,45 µm y se centrifugó. El sedimento viral se secó, se resuspendió en 600 µL de PBS y se almacenó a -80 °C. El título infeccioso de la reserva de VIH-I se determinó mediante tinción con X-Gal, tal como se describió anteriormente.

[0078] Se agruparon los sueros de 3 ratones inmunizados con liposomas MPER y CoPoP y se aisló IgG utilizando perlas de proteína G inmovilizadas (VWR# PI20398) de acuerdo con el protocolo del proveedor. La concentración se determinó con absorción con el ensayo de Bradford. 2F5 se obtuvo del programa gratuito de reactivos de SIDA de NIH. Las células receptoras Ix104 TZM-bl por pocillo se sembraron en una placa de 96 pocillos el día antes de la infección. El VIH (multiplicidad de infección de 0,1) se incubó con anticuerpos durante 30 min a 37 °C, se añadió a las células y se espinoculó a 1000 rcf durante 1 h a 25 °C, seguido de una incubación adicional durante 2 días a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %. A continuación, se midió la viabilidad celular utilizando un ensayo CellTiter-Fluor (Promega) según el protocolo del fabricante. A continuación, se midió el nivel de entrada viral mediante un sistema de ensayo de luciferasa (ONE-Glo, Promega) según el protocolo del fabricante y se normalizó a la muestra de virus solamente. Los datos se normalizaron adicionalmente a la viabilidad celular (todos los grupos mostraron viabilidad dentro del 10% de las células de control no tratadas).

Resultados

[0079] *Unión de proteína etiquetada con His a liposomas CoPoP.* Se generó una serie de quelatos de fosfatidilcolina de sn-1-palmitoil sn-2-pirofeoforbido con los metales de transición Co, Cu, Zn, Ni y Mn (**Fig. 1e**). A continuación, se formaron bicapas de PoP con 10% molar de metalo-PoP junto con 85% molar de dioleoilfosfolina (DOPC) y 5% molar de diestearoilfosfoetanolamina conjugada con polietilenglicol (PEG-lípido) mediante extrusión en liposomas de 100 nm. La unión de la proteína etiquetada con His a las bicapas de PoP se evaluó con un indicador de proteína fluorescente. Tal como se muestra en la **Fig. 2a**, el sistema comprendía una proteína de fusión formada por dos proteínas fluorescentes unidas; ceruleano (emisión azul) y Venus (emisión verde). Debido a su proximidad vinculada y superposición espectral, ceruleano sirve como donante de transferencia de energía de resonancia Forster (FRET) para Venus, de modo que la excitación de cerúlea da como resultado la emisión FRET de Venus. Cerúlea se etiquetó en su extremo C con una etiqueta de heptahistidina. Sin embargo, si se une a una bicapa de PoP, la transferencia de energía cerúlea se desvía a la propia bicapa, que absorbe en el rango de emisión cerúlea y, por lo tanto, compete con FRET a Venus. Por otro lado, debido a que Venus no está unido directamente a la bicapa fotónica, no se inactiva por completo con la excitación directa, lo que permite el seguimiento de la proteína de fusión unida.

[0080] Se desarrolló un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética de 3 colores (EMSA) para evaluar la unión de la proteína de fusión indicadora a varios liposomas de PoP. Se incubaron 2,5 µg de proteína con 50 µg de varios liposomas de PoP durante 24 horas y, a continuación, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Tal como se muestra en la imagen superior de la **Fig. 2b**, cuando se tomaron imágenes de los liposomas de PoP, solo se visualizaron fácilmente los liposomas de base libre (2H), junto con los liposomas de Zn-PoP en menor grado. Esto demuestra que los metales tienen un efecto de inactivación en el PoP y confirma que se quelaron de manera estable en la bicapa. Como era de esperar, los liposomas exhibieron una movilidad electroforética mínima debido a su tamaño relativamente grande. A continuación, se tomaron imágenes del mismo gel usando excitación cerúlea y emisión de Venus para sondear la inhibición de FRET, lo que sería indicativo de la unión de la proteína de fusión a los liposomas de PoP. Todas las muestras exhibieron la misma cantidad de FRET y migraron la misma distancia que la proteína libre con la excepción de la proteína incubada con liposomas de CoPoP, en cuyo caso FRET desapareció por completo (imagen central). Para verificar la presencia de la proteína, Venus se excitó directamente y se tomaron imágenes. Sólo con los liposomas de CoPoP se co-localizó la proteína informadora con los liposomas. Juntas, estas imágenes demuestran que la proteína se unió cuantitativamente a los liposomas de CoPoP. Los estudios basados en soluciones confirmaron este hallazgo (**Fig. 2c**). De todos los tipos de liposomas de PoP examinados, solo los CoPoP indujeron una disminución drástica en la eficiencia de FRET entre Cerúleo y Venus, debido a la unión liposomal. La unión requirió aproximadamente un día para completarse por completo, aunque el tiempo para alcanzar el 50% de unión (el t_{1/2}) fue de tan solo 3 horas. Mediante simulaciones de dinámica molecular de una bicapa de 2H-PoP se demostró que el centro de las porfirinas (donde se produciría la quelación de metales) es inaccesible a la fase acuosa que rodea la bicapa. Por lo tanto, esta unión lenta se puede atribuir a una etiqueta de His que está parcialmente oscurecida por el resto de la proteína, además de tener que abrirse camino hacia la bicapa hidrofóbica protegida.

[0081] *Coordinación de polihistidina con CoPoP.* El mecanismo que subyace a la unión de la etiqueta de His a los metales inmovilizados implica la coordinación del metal con los grupos imidazol nitrogenados de los residuos de histidina. La ausencia de la unión de la etiqueta de His a los liposomas formados con PoP de Ni(II), Cu(II), Zn(II) y Mn(II) probablemente se relacione con la afinidad de unión del ligando axial o el número de coordinación dentro de la porfirina. Por ejemplo, se ha propuesto que los quelatos de porfirina de Ni(II) y Cu(II) pueden coordinarse

completamente con los 4 átomos de nitrógeno macrocíclicos circundantes sin ligandos axiales. Para las porfirinas de Zn (II) y Mn (III), la fuerza de unión del ligando probablemente sea insuficiente para conferir una unión estable a la polihistidina.

[0082] Para determinar el estado electrónico del CoPoP, se evaluó el paramagnetismo. Debido a que el Co(II) es paramagnético, pero las porfirinas de Co(III) son de espín bajo y diamagnéticas, se usó RMN para sondear el ensanchamiento de picos inducido por especies paramagnéticas. Tal como se muestra en la **Fig. 2d**, en función de los hidrógenos de cada carbono del grupo vinilo dentro del PoP, se observó un amplio ensanchamiento del pico solo para el CoPoP y solo en disolvente orgánico. Cuando se formó CoPoP en liposomas acuosos, los picos se estrecharon, lo que indica oxidación a Co (III) diamagnético dentro de la bicapa. Para verificar aún más este mecanismo, se agregó el agente reductor sulfito de sodio a los liposomas de CoPoP después de que se unieron cuantitativamente a un péptido con etiqueta de His marcado con fluorescencia. Tal como se muestra en la **Fig. 2e**, la liberación de péptido inducida por sulfito 2 M de liposomas de CoPoP. También se formaron liposomas con lípidos de Ni-NTA comercialmente disponibles. El péptido etiquetado con His no se unía con tanta avidéz a los liposomas de Ni-NTA. Tras la adición de sulfito al sistema, no se observó liberación del péptido, como cabría esperar con Ni (II) que no se puede reducir fácilmente. Juntos, estos datos sugieren que CoPoP pasa de Co (II) a Co (III) al formar liposomas de CoPoP y los grupos imidazol de polihistidina se coordinan en la bicapa con Co (III) quelado en PoP.

[0083] *Unión estable de etiqueta de His a liposomas CoPoP.* La proteína informadora de fluorescencia se usó a continuación para comparar la unión de las proteínas etiquetadas con His a los liposomas que incorporan CoPoP o Ni-NTA-lípido (**Fig. 3a**). Los liposomas de Ni-NTA incluían 2H-PoP al 10 % molar para permitir la determinación de la unión a proteínas basada en FRET. Mediante EMSA, la proteína migró sin impedimentos cuando se incubaba sin liposomas o cuando se incubaba con liposomas de 2H-PoP, tanto en el canal FRET como en el canal de proteína. Cuando se incubó con liposomas de Ni-NTA, la migración de la proteína solo se inhibió ligeramente, lo que indica que la unión de la proteína no soportó las condiciones de la electroforesis. El canal FRET no se inactivó, lo que confirma la falta de unión a los liposomas Ni-NTA. Por el contrario, cuando se incubó con los liposomas de CoPoP, la proteína se unió de manera estable con una desaparición completa del canal FRET y una disminución de la movilidad electroforética, lo cual era consistente con la proteína restante unida a liposomas.

[0084] Para aplicaciones biomédicas, un obstáculo intratable del uso de Ni-NTA-lípido es que no mantiene estable la unión de la etiqueta de His en medios biológicos, tales como el suero. Para examinar si los liposomas podían mantener la unión en presencia de suero, se añadió suero bovino fetal en una proporción de volumen de 1:1 a una solución de liposomas que se habían unido a la proteína etiquetada con His. Tal como se muestra en la **Fig. 3b**, los liposomas de Ni-NTA no secuestraron por completo toda la proteína, lo que es consistente con la unión débil exhibida en el resultado de EMSA. Además, después de la adición de suero, se anuló toda unión durante un período de 24 horas. En las mismas condiciones, los liposomas de CoPoP secuestraron de forma estable la proteína informadora etiquetada con His sin liberación sustancial de proteína.

[0085] Dado que la cadena lateral de histidina comprende un grupo imidazol, se usó un ensayo de competición de imidazol para comparar la estabilidad de unión de los liposomas de Ni-NTA y CoPoP con los polipéptidos etiquetados con His. Tal como se muestra en la **Fig. 3c**, los liposomas de CoPoP mantuvieron más del 75 % de unión a la proteína reportera incluso a una concentración cercana a 1 M de imidazol. Esto representa un exceso de imidazol de aproximadamente 10 millones de veces sobre la concentración de proteína 100 nM utilizada en el estudio de unión. Por el contrario, los liposomas de Ni-NTA liberaron más del 90% de la etiqueta de His en presencia de imidazol solo 30 mM. La unión drásticamente más fuerte del liposoma de CoPoP a la etiqueta de His puede atribuirse a al menos 2 factores; la quelación estable superior de Co(III) a grupos imidazol y el entorno hidrofóbico protegido de la bicapa de CoPoP que limita el acceso a moléculas externas competidoras.

[0086] Los liposomas formados con Ni-NTA-lípido, Co-NTA-lípido quelado con cobalto y CoPoP podrían unirse a un péptido fluorescente en solución (Figura 7a). Sin embargo, la unión de CoNTA y Ni-NTA no se mantuvo durante la cromatografía de filtración en gel (Figura 7b). Los liposomas formados con Co-NTA y Ni-NTA, pero no con CoPoP, liberaron el péptido cuando se incubaron en suero (Figura 7c). Esto demuestra la importancia de la unión de polihistidina confinada en bicapa. A continuación, examinamos si se requería o no CoPoP para la unión estable en el suero, o si una simple porfina de cobalto insertada en liposomas (Co-piro) podría ser suficiente. Después de la unión inicial, la incubación con suero hizo que el polipéptido se desplazara de los liposomas (Figura 8). Este resultado es consistente con demostraciones recientes de que las porfirinas insertadas en membrana, pero no el PoP, se intercambian rápidamente con los componentes del suero y salen del liposoma. Juntos, estos resultados apuntan al papel esencial de CoPoP para unirse de manera estable a los polipéptidos etiquetados con His.

Unión de péptidos a liposomas de CoPoP

[0087] El direccionamiento de péptidos ha atraído el interés por su uso como "zip 15 codes" específicos de enfermedades y tejidos. El tripéptido RGD corto, que se encuentra en la fibronectina y la vibronectina, es un ligando de direccionamiento prometedor por su unión eficaz a la integrina $\alpha_v\beta_3$ expresada en las células endoteliales tumorales. Se examinaron los liposomas de CoPoP para verificar si se pueden administrar a receptores moleculares en las células diana a través de un enfoque de ligando etiquetado con His con la secuencia de aminoácidos lineal

corta GRGDSPKGAGAKG-HHHHHHH (SEQ ID NO: 1). La carboxifluoresceína (FAM) se marcó en el extremo N para permitir la detección de la unión al liposoma de PoP a través de FRET. Se ha demostrado que los péptidos RGD lineales se pueden marcar con fluoróforos sin interrumpir la unión a la integrina. Tal como se muestra en la **Figura 4a**, cuando este péptido se incubó con varios liposomas de metalo-PoP, solo los CoPoP se unieron al péptido. En comparación con la unión a proteínas, la unión a péptidos fue aproximadamente cinco veces más rápida. Presumiblemente, el tamaño más pequeño, el movimiento molecular más rápido y la disminución del impedimento estérico del péptido permitieron una interdigitación más rápida en la bicapa para interactuar y unirse irreversiblemente al CoPoP. Basado en estimaciones previas de que cada liposoma de ~ 100 nm contiene aproximadamente 80 000 lípidos, esto equivale a 8000 CoPoP y 750 péptidos por liposoma. Dado que cada péptido contenía 7 residuos de histidina, la proporción de CoPoP a histidina en la bicapa fue de 1:0,66. Para la unión convencional de etiqueta de His a Ni-NTA, de todos los residuos en la etiqueta de His, se cree que solo los residuos de histidina i-ésima e i+2 o i+5 están involucrados en la coordinación con el metal. La densidad de porfirina y polihistidina dentro de la bicapa de CoPoP es probablemente más elevada y, por tanto, el mecanismo de coordinación puede ser diferente.

[0088] Se examinó el efecto de la longitud de la etiqueta de His sobre la unión del péptido al liposoma de CoPoP. Se sintetizó una serie de péptidos marcados con FAM en el extremo N con longitudes variables de etiquetas His unidas al extremo C. Tal como se demuestra en la **Figura 4b**, cuando se omitió la etiqueta de His del péptido, no se observó unión al péptido. Con 2 residuos de histidina, la unión fue lenta, con una $t_{1/2}$ de unión de casi 10 horas. A medida que aumentaba la longitud de la etiqueta de His, la velocidad de unión aumentaba rápidamente. Con 6 residuos, correspondientes a la etiqueta de hexahistidina común, el $t_{1/2}$ de unión fue inferior a una hora. Al aumentar la longitud de la etiqueta de His a 10 residuos, el $t_{1/2}$ de unión disminuyó a 20 minutos.

[0089] A continuación, se varió la composición de lípidos para determinar el efecto de la fluidez de la membrana sobre la unión de la etiqueta de His. Los liposomas se formaron con 90% en moles de DSPC, DMPC o DOPC junto con 10% en moles de CoPoP. Alternativamente, se incorporó 50% en moles de colesterol en la bicapa con la correspondiente reducción en la cantidad de lípido estándar usado. DSPC forma bicapas rígidas en fase de gel a temperatura ambiente, mientras que DMPC y DOPC tienen temperaturas de transición más bajas y se encuentran en la fase de cristal líquido. El colesterol ocupa espacio en la bicapa y puede tener un efecto moderador sobre la fluidez de la membrana. Curiosamente, no se observaron diferencias importantes en la tasa de unión del péptido a membranas de diferentes composiciones, con o sin colesterol (**Fig. 4c**). El proceso de unión del péptido puede ocurrir en un proceso de varios pasos y una vez que el péptido comienza a insertarse en la bicapa, los efectos cooperativos de la polihistidina no se ven afectados por la composición lipídica. Sin embargo, en 5 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA), se observaron diferencias drásticas entre las membranas con y sin colesterol (**Fig. 4d**). La unión más lenta en los liposomas sin colesterol probablemente se debió a una mayor interacción de BSA con la membrana que interfiere con la unión del péptido. No se alcanzaron los semitiempos de unión con BSA a 50 mg/ml y el suero inhibió completamente la unión (**Fig. 9 Fig.10**).

[0090] *Biodireccionalamiento de liposomas cargados con carga.* Dada la eficacia de unión del péptido etiquetado con His a los liposomas, se evaluó la integridad de la bicapa para determinar si la unión del péptido induce la desestabilización de la membrana. El núcleo acuoso de los liposomas se cargó con el fluoróforo sulforodamina B, un colorante soluble en agua, a concentraciones autoinactivantes para sondear la permeabilización de la membrana. Tal como se muestra en la **Fig. 5a**, los liposomas cargados con colorante no liberaron una cantidad sustancial de colorante durante el período de 8 horas en el que el péptido se había unido completamente a los liposomas. A las 24 horas, los liposomas de CoPoP con el péptido unido liberaron menos del 10 % del colorante. Por lo tanto, el proceso de inserción y unión de la etiqueta de His es lo suficientemente suave y no disruptivo para que la integridad de la bicapa y la carga atrapada permanezcan intactas. EL lipopéptido palmitoilado dio lugar a la permeabilización de los liposomas cargados con carga tras la incubación (**fig. 11**), demostrando adicionalmente la robustez de la estrategia de la etiqueta de His.

[0091] A continuación, se evaluó si los liposomas recubiertos con RGD podían unirse a sus dianas moleculares con el par de líneas celulares establecidas de células de glioblastoma U87 (unión a RGD) y células de cáncer de mama MCF7 (no unión a RGD). Después del atrapamiento de sulforodamina B, los liposomas se incubaron primero con el péptido RGD etiquetado con His y, a continuación, con ambas líneas celulares. Se unieron aproximadamente 550 péptidos a cada liposoma. La captación liposomal se evaluó examinando la fluorescencia en las células después del lavado y la lisis (para eliminar cualquier efecto de autoinactivación de la carga). Tal como se muestra en la **Fig. 5b**, se observó una alta captación de liposomas en células U87 incubadas con liposomas de CoPoP dirigidos, mientras que se produjo una unión insignificante con células MCF7. Tal como se esperaba, sin el ligando dirigido a RGD, no se produjo captación en ninguna de las líneas celulares. La inclusión de PEG-lípido en la formulación de liposomas dio como resultado liposomas que no se dirigían a ninguna línea celular. Es probable que la presencia del PEG tuviera el efecto de obstruir el péptido, que está directamente unido a la superficie de la bicapa. La unión podría inhibirse con la presencia de un exceso de péptido RGD libre, lo que confirma la especificidad de direccionamiento del enfoque. La microscopía confocal confirmó estos resultados de unión (**Fig. 5c**). Aunque el péptido marcado con FAM fue inactivado por los liposomas de PoP, permaneció suficiente señal para verificar la unión tanto del péptido dirigido como de la carga liposomal. Tanto la carga como el péptido se internalizaron y permanecieron colocalizados en células U87. Cuando los liposomas de CoPoP y el péptido dirigido se mezclaron inmediatamente antes de la incubación con células U87, el propio péptido dirigido se unió a las células U87, pero no tenía tiempo de unirse a los liposomas, que

permanecían sin ser reconocidos. Se observó el mismo resultado para los liposomas de 2H-PoP que no se unían al péptido. La unión al péptido se mantuvo cuando los liposomas se formaron con solo 1% molar de CoPoP (**Fig. 12a**) y se mantuvo la unión selectiva a las células U87 (**Fig. 12b**). Se inyectaron por vía intravenosa liposomas cargados con carga incubados en un resto cRGD etiquetado con His en ratones desnudos que portaban tumores U87. Tal como se muestra en la **figura 5d**, 45 minutos después de la inyección intravenosa, los liposomas dirigidos se acumularon en tumores con una actividad de 2,5 veces en comparación con los liposomas no dirigidos. Estos datos muestran que los liposomas de CoPoP se pueden cargar con carga en el núcleo del liposoma, se pueden marcar con un péptido dirigido etiquetado con His sin inducir fugas de carga, y se pueden dirigir a receptores moleculares expresados en células que expresan proteínas de la superficie específicas in vitro e in vivo.

[0092] Los liposomas representan solo un subconjunto de todos los tipos de nanomateriales utilizados en aplicaciones biomédicas. CoPoP se evaluó como un recubrimiento superficial generalizado con adhesión selectiva para etiquetas de His. Se utilizaron nanopartículas de oro como nanopartícula modelo, ya que se han utilizado en numerosas aplicaciones biológicas. Usando un protocolo establecido para cubrir con lípidos las nanoesferas de oro, se usó una dispersión de oro de 60 nm estabilizada con citrato para hidratar una película delgada de lípidos PoP. Tras la centrifugación y resuspensión repetidas, el citrato se desplazó, lo que provocó que las nanoesferas se agregaran (**Fig. 13a**). Sin embargo, en presencia de lípidos PoP, las nanoesferas se recubrieron y permanecieron dispersables. En comparación con el oro estabilizado con citrato, las nanoesferas recubiertas de PoP tenían un tamaño hidrodinámico ligeramente mayor, lo que corresponde a un recubrimiento bicapa sobre el oro (**Fig. 13b**). La presencia del recubrimiento después de la unión de la etiqueta de His no influyó en el pico plasmónico del oro a 540 nm, lo que demuestra la naturaleza suave de la unión del ligando (**Fig. 13c**). Tal como se muestra en la Figura 13d, solo las nanopartículas de oro recubiertas con CoPoP RGD-His se dirigieron a las células U87 y la RGD libre inhibió la unión según lo determinado por microscopía de retrodispersión. El oro con CoPoP solo, así como el oro recubierto con 2H-PoP con el péptido RGD His no fueron efectivos para dirigirse a las células U87.

[0093] *Desarrollo de liposomas antigénicos.* Muchos de los anticuerpos monoclonales que neutralizan ampliamente la entrada viral del VIH, tales como 2F5, Z13 y 4E10, se dirigen a un epítipo lineal conservado en la región externa proximal de la membrana (MPER) de la proteína de la envoltura gp41, lo que convierte a la MPER en una diana principal para las vacunas peptídicas contra el VIH. Sin embargo, se expone solo durante la entrada viral y los intentos de usar péptidos MPER para generar anticuerpos neutralizantes se han enfrentado a desafíos. Esto ha dado lugar al paradigma de que las estrategias de vacunación deben considerar la interacción de los anticuerpos con la bicapa lipídica en la que se presenta el MPER. Hemos utilizado liposomas que contienen el agonista monofosforil lípido A (MPL) del receptor tipo Toll 4 (TLR-4) combinado con secuencias peptídicas de MPER unidas a liposomas. Sin embargo, el uso de técnicas de anclaje simples basadas en la unión de polipéptidos MPER etiquetados con His a liposomas de NINTA generó títulos bajos de anticuerpos. Nos propusimos examinar si el mismo enfoque podría mejorarse con los liposomas de CoPoP.

[0094] Se utilizó un sistema de vacunación con péptidos liposomales con la secuencia de MPER-His NEQELLELDKW ASL WNGGKGG-HHHHHHHH (SEQ ID NO: 11). El péptido MPER-His se unió a liposomas de CoPoP que contenían MPL. Se administró una única inyección que contenía 25 µg de MPER-His y 25 µg de MPL a ratones BALB/c y a ratones desnudos atímicos. Esto provocó un título del orden de 10⁴ tanto en ratones BALB/c como en ratones desnudos, lo que demuestra una fuerte respuesta inmune humoral (**Fig. 6a**). Esto puede ser significativo ya que el VIH infecta a las poblaciones de células T auxiliares, lo que hace que las respuestas mediadas por células B sean importantes. Después de una inyección de refuerzo, el título anti-MPER en ratones desnudos atímicos no se vio afectado, pero en ratones sanos hubo un aumento del título en un orden de magnitud, lo que demuestra un efecto de memoria mediado por células T. Por lo tanto, el protocolo de vacunación dio como resultado inmunidad mediada por células B y células T.

[0095] A continuación, se examinaron varios componentes de la vacuna para determinar mejor la especificidad de la respuesta inmunitaria (**Fig. 6b**). El péptido MPER-His no provocó ningún anticuerpo cuando se inyectó solo, en adyuvante completo de Freund o junto con liposomas 2H-PoP que contenían MPL. Curiosamente, cuando el péptido se administró con liposomas CoPoP que carecían de MPL, no se generó ningún tipo de anticuerpo. Otro adyuvante de lípidos, el dibehenato de trehalosa (TDB), tampoco logró provocar la producción de anticuerpos. TDB no actúa sobre TLR-4, lo que subraya la importancia de MPL en la activación inmunitaria del sistema de vacuna liposomal. Cuando se utilizó MPER-His unido a liposomas de Ni-NTA, se logró un título de anticuerpos débil de menos de 10³, de acuerdo con informes anteriores. Sin embargo, cuando se usaron liposomas de CoPoP, se observó una respuesta más fuerte de 2 órdenes de magnitud. Presumiblemente, la unión estable del péptido a los liposomas in vivo es directamente responsable de este efecto. La estrategia de inmunización con CoPoP fue eficaz, con títulos de anticuerpos persistentes durante al menos 3 meses, mientras que no se detectaron anticuerpos con liposomas de Ni-NTA después de un mes (**Fig. 6c**).

[0096] Se agruparon los sueros posteriores a la vacunación de los ratones y se purificaron usando agarosa con proteína G para producir IgG purificada. Esto se usó a continuación para evaluar la inhibición de la entrada viral por parte del VIH (**Fig. 6d**). Cuando se utilizó la IgG purificada de ratones vacunados a una concentración final de 0,2 mg/ml, la entrada viral se inhibió en más del 75 %. Esta eficacia de inhibición es mayor que la del anticuerpo monoclonal ampliamente neutralizante 2F5 cuando se incubó a una concentración de 2 µg/ml, pero inferior a 20

µg/ml. Estos datos muestran el potencial de un enfoque de vacunación que utiliza liposomas CoPoP con péptidos derivados del VIH para inducir la generación de anticuerpos que pueden prevenir la entrada viral.

EJEMPLO 2

[0097] En este ejemplo, se desarrolló una vacuna que utilizó Pfs25 etiquetada con his, una proteína recombinante derivada de *Plasmodium falciparum* y liposomas que contienen CoPoP y MPLA.

[0098] Preparación de liposomas. Para la generación de liposomas CoPoP y 2H-PoP, se disolvieron en cloroformo 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), colesterol (CHOL), monofosforil lípido A (MPLA) y CoPoP (o 2H-PoP) en la relación molar indicada (Tabla 2). Se formó una película lipídica seca después de la corriente N1 y se aplicó vacío durante la noche y se rehidrató en PBS hasta una concentración final de lípidos de 3 mg/ml. La suspensión liposómica se sometió a 11 ciclos de congelación/descongelación utilizando CO2 enfriado con hielo/acetona y un baño de agua seguido de extrusión 10 veces a 60°C a través de membranas de policarbonato de 200 nm.

[0099] La proteína de insecto Pfs25 (subunidad recombinante Pfs25 purificada de células super sf9, concentración determinada mediante ensayo BCA como 1 mg/ml) se combinó con liposomas durante la noche (20 h) a 4 °C. Pfs25 incubado en H2O sirvió como control. BSA se combinó con liposomas como control negativo. La unión de la proteína Pfs25 y los liposomas se determinó mediante un procedimiento de filtración microcentrífuga.

Tabla 2. Formulación de liposomas Pfs25 CoPoP/MPLA para cada inyección de ratón

Cada dosis de inyección a ratón	DMPC	CHO L	CoPoP	MPLA	Psf25
Proporción molar	55	35	5	5	
µg/50 µg	84,6	30,7	12,1	20,0	5/0,5/0,05
nmol	127,75	79,39	11,34	11,34	0,25/0,025/0,0025

Filtración microcentrífuga para unión. La proteína Pfs25 con CoPoP, la proteína Pfs25 con PoP estándar (sin cobalto) y la proteína Pfs25 con agua se colocaron en dispositivos centrífugos Nanosep (LOOK, OMEGA). El dispositivo se enjuagó con QH2O y se centrifugó a 1100 rpm durante 3 min antes de su uso. Cada una de las muestras se añadió y se centrifugó durante 3 min a 1400 rpm. El dispositivo se lavó dos veces con QH2O y se centrifugó a 1400 rpm durante 3 min (minutos). Se recogió la muestra del filtrado inferior y se analizó la concentración de proteína mediante el ensayo BCA midiendo la absorbancia a 562 nm (Thermo cat. 23235).

[0101] Vacunaciones. Los días 0 y 21, los ratones CD-1 (hembras de 8 semanas, Envigo) recibieron inyecciones intramusculares (i.m.) de 5, 0,5 y 0,05 µg de proteína Pfs25. Donde se indique, las inyecciones también incluyeron 20 µg de MPLA incorporados en los liposomas (Avanti No. 699800P). También se usó ISA720 como adyuvante incubado con 5 µg de proteína Pfs25. Los grupos de tratamiento y el diagrama de flujo se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3. Grupos de tratamiento para título de IgG en suero (n = 10 ratones por grupo)

	CoPoP/MPLA	Psf25 (ug)	ISA720
Grupo 1 (G1)	+	5	-
Grupo 2 (G2)	+	0,5	-
Grupo 3 (G3)	+	0,05	-
Grupo 4 (G4)	+	0	-
Grupo 5 (G5)	-	5	-
Grupo 6 (G6)	-	5	-

[0102] Nivel de IgG anti-Psf25 en suero mediante ELISA. Se evaluó anti-Psf25 mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en placas de 96 pocillos (Thermo, Maxisorp). Psf25 etiquetada con His (0,1 µg) en 100 µl de tampón de recubrimiento (3,03 g de Na2CO3 y 6,0 g de NaHCO3/1 litro de agua destilada, pH 9,6) se incubó en los pocillos durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron con PBS que contenía Tween al 0,1 % (PBS-T) 3 veces y se bloquearon con PBS que contenía caseína al 0,1 % (PBS-C) y, a continuación, se incubaron durante 2 horas. Los pocillos se lavaron y a continuación se lavaron con PBS-T por tiempos y se diluyó IgG-HRP anti-ratón de cabra (GenScript No. A00160) en PBS-C para resultar en 1 µg/ml y se añadió a cada pocillo. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBS-T 6 veces antes de añadir tetrametilbencidina (Amresco No. J644).

Resultados.

[0103] Caracterización de liposomas y capacidad de unión a proteínas después del recubrimiento con proteína Psf25. El tamaño medio de los liposomas CoPoP antes y después de medir la unión a la proteína Psf25 mediante dispersión de luz dinámica fue de 122,9 y 139 nm, respectivamente (**Fig. 14A**), con índices de polidispersidad similares de alrededor de 0,05, mostrando un tamaño de liposoma favorable después de la unión con alta

monodispersidad. Además, para investigar si la proteína Pfs25 se unía con eficiencia y específicamente a los liposomas CoPoP, incubamos Pfs25 con liposomas CoPoP o liposomas 2H-PoP a 4 °C durante la noche, seguido de filtración microcentrífuga para determinar la unión de proteínas a los liposomas. Según la cantidad de Pfs25 en el filtrado detectada mediante el ensayo BCA, la mayoría de Pfs25 se unió a los liposomas CoPoP (99,27 %), pero no a los liposomas 2H-Pop (12,33 %). La unión de Pfs25 a los liposomas CoPoP fue del -99% (Figura 14A).

Niveles de IgG anti-Pfs25.

[0104] Se vacunaron ratones CD-I con los liposomas CoPoP/MPLA/Pfs25 conjugados con o sin Pfs25 (con concentración de 5, 0,5 y 0,05 µg); por vía i.m. o con Pfs25 libre (con o sin ISA70) el día 0 (sensibilización) y el día 21 (refuerzo). Los días 20 y 42, se recogió suero y se determinaron los títulos de IgG anti-Pfs25 mediante ELISA (**Fig. 15A y Fig. 15B**). Los ratones que recibieron el refuerzo previo con los liposomas CoPoP/MPLA/Pfs25 mostraron un nivel de IgG similar en el suero en los grupos conjugados con 5 µg y 0,5 µg de Pfs25. Se analizaron diferentes diluciones (a partir de 1/1000) de muestra de suero con IgG-anti-Pfs25 mediante ELISA de Pfs25 (planta) para cada grupo de tratamiento (Tabla 3). Aquí, el punto de corte se fijó en D.O. igual a 0,5. Los datos muestran que el título de IgG cambió de 1/5000 a 1/45000 después del refuerzo en G 1, así como en G2, que representan liposomas CoPoP/MPLA/Pfs25 conjugados con 5 o 0,5 µg de proteína Pfs25 (Tabla 3). Por otro lado, el título de IgG de los liposomas CoPoP/MPLA/Pfs25 conjugados con 0,05 µg de proteína Pfs25 cambia de 1/1000 a 1/15000 después del refuerzo, se mostraron resultados similares en G6, que representan los 5 µg de proteína Pfs25 incubados con ISA70. Estos datos también se reflejan en la **Fig. 16**, que muestra títulos de 0,05 ug de Pfs25 en liposomas CoPoP/MPLA que producen un título más alto que 5 µg de Pfs25 en ISA 720.

EJEMPLO 3

[0105] En este ejemplo, se desarrolló una vacuna liposomal que utilizó los péptidos etiquetados con his sintéticos que contenían secuencias NANP repetidas, que se derivan de la proteína circunsporozoite de *Plasmodium falciparum*. Los liposomas tenían la misma composición que el Ejemplo 1, pero se usaron péptidos en lugar de proteína. Los péptidos examinados se muestran en la **Fig. 17A**. El tamaño medio de los liposomas CoPoP antes y después de medir diferentes uniones de NANP mediante dispersión de luz dinámica fue de 122,9 y 139 nm, respectivamente (Figura 17B), con índices de polidispersidad similares de alrededor de 0,05, lo que muestra un tamaño de liposoma favorable después de la unión con alta monodispersidad. Además, para investigar si el péptido NANP se unía con eficiencia y específicamente a los liposomas CoPoP, incubamos el péptido NANP con liposomas CoPoP o liposomas 2H-PoP a 4 °C durante la noche, seguido de filtración microcentrífuga para determinar la unión del péptido a los liposomas. Según la cantidad de péptido en el filtrado detectado mediante el ensayo BCA, una gran cantidad de NANP se unieron a liposomas CoPoP (-80 % en diferentes longitudes de péptidos), pero no a los liposomas 2H-Pop (menos del 20 %). La unión de NANP a los liposomas CoPoP fue del -80% en todas las longitudes diferentes de péptidos. (**Figura 17C**)

EJEMPLO 4

En este ejemplo, se usaron liposomas CoPoP que contenían fosfatidilserina (PS) para reducir la respuesta de anticuerpos a moléculas de presentación etiquetadas con his. Los liposomas se formaron con CoPoP:fosfatidilserina:DOPC:colesterol 10:30:30:30 mediante hidratación y extrusión de películas delgadas. A continuación, el MPER etiquetado con His se unió a los liposomas. Estos liposomas de PS se inyectaron a través de la almohadilla de la pata a ratones 4 semanas y 2 semanas antes de la vacunación con liposomas CoPoP/MPLA recubiertos con MPER. Tal como se muestra en la Fig. 18, el pretratamiento con liposomas de PS dio como resultado una disminución de los títulos de IgG contra MPER.

EJEMPLO 5

En este ejemplo, los liposomas CoPoP se dirigieron a las células a través de péptidos de penetración celular etiquetados con his. Se obtuvieron los siguientes péptidos de penetración celular etiquetados con his: HHHHHHHGRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 13) (péptido TAT); HHHHHHHHRRRRRRRR (SEQ ID NO: 14) (péptido R8); HHHHHHHRQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 15) (péptido PEN). Tal como se muestra en la **Fig. 19**, después de una incubación acuosa directa con liposomas CoPoP que contenían [2:5:30:63] [PoP:CoP:CHOL:DMPC], estos liposomas podrían unirse y captarse después de 1 hora de incubación con células U87.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Research Foundation for the State University of New York

<120> NANOSTRUCTURAS QUE COMPRENDEN CONJUGADOS DE PORFIRINA DE COBALTO-FOSFOLÍPIDO Y ETIQUETAS DE POLIHISTIDINA

<130> P49924-EP-PCT

<140> EP16780996.1

<141> 2016-04-18
 <150> 62148292
 <151> 2015-04-16
 5 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.5
 10 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> péptido informador fluorescente
 <400> 1
 20 Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys Gly Ala Gly Ala Lys Gly His His His
 1 5 10 15
 25 His His His His
 20
 <210> 2
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido RGD
 35 <400> 2
 Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys
 1 5
 40 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido informador fluorescente
 50 <400> 3
 Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys Gly Ala Gly Ala Lys Gly
 1 5 10
 55 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Péptido etiquetado con his
 <400> 4
 65 Arg Gly Asp Tyr His His His His His His His
 1 5 10

5 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> péptido informador fluorescente

 <400> 5

 Lys Lys Gly Gly Gly Gly
 1 5
 15
 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> péptido informador fluorescente

 <400> 6
 25
 Lys Lys Gly Gly Gly Gly His His
 1 5
 30
 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> péptido informador fluorescente

 <400> 7
 40
 Lys Lys Gly Gly Gly Gly His His His His
 1 5 10
 45
 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> péptido informador fluorescente

 <400> 8
 55
 Lys Lys Gly Gly Gly Gly His His His His His His
 1 5 10
 60
 <210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>
 <223> péptido informador fluorescente

 <400> 9

Lys Lys Gly Gly Gly Gly His His His His His His His His
1 5 10

5
<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10
<220>
<223> péptido informador fluorescente

15
<400> 10

Lys Lys Gly Gly Gly Gly His His His His His His His His His His
1 5 10 15

20
<210> 11
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25
<220>
<223> Péptido MPER

<400> 11

30 Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn
1 5 10 15

Gly Gly Lys Gly Gly His His His His His His His
35 20 25

40
<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45
<220>
<223> Péptido MPER

<400> 12

50 Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn
1 5 10 15

Gly Gly Lys

55
<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60
<220>
<223> Péptido penetrador de células

<400> 13

65 His His His His His His His Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
1 5 10 15

Arg Pro Pro Gln
20

5

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrador de células

15 <400> 14

His His His His His His His Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

20

<210> 15
<211> 23
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido penetrador de células

30 <400> 15

His His His His His His His Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn
1 5 10 15

35 Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
20

REIVINDICACIONES

1. Liposoma que comprende:
 - a) una bicapa, en la que la bicapa comprende:
 - i) fosfolípido, y
 - ii) porfirina que tiene cobalto coordinado a la misma formando porfirina de cobalto, en la que la porfirina de cobalto se conjuga con un fosfolípido para formar un conjugado de porfirina de cobalto-fosfolípido; y
 - b) una molécula de presentación etiquetada con polihistidina, en la que al menos una parte de la etiqueta de polihistidina reside en la parte hidrófoba de la bicapa y una o más histidinas de la etiqueta de polihistidina están coordinadas de forma no covalente con el cobalto en porfirina de cobalto, en la que la molécula de presentación etiquetada con polihistidina se presenta en la superficie de la bicapa y, por tanto, se expone al exterior del liposoma, y en el que el liposoma encierra un compartimento acuoso.
2. Liposoma de la reivindicación 1, en el que el conjugado de porfirina de cobalto-fosfolípido constituye del 0,1 al 10 % en moles de la bicapa.
3. Liposoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la bicapa comprende además colesterol, fosfatidilserina o una combinación de los mismos.
4. Liposoma de la reivindicación 1, en el que la etiqueta de polihistidina comprende de 6 a 10 residuos de histidina.
5. Liposoma de la reivindicación 1, en el que el liposoma comprende una carga y en el que una parte de la carga reside en el compartimento acuoso.
6. Liposoma de la reivindicación 1, en el que la molécula de presentación es un péptido de 2 a 50 aminoácidos, sin incluir dicho número de aminoácidos las histidinas de la etiqueta de his.
7. Liposoma de cualquier reivindicación 1, en el que la molécula de presentación es una molécula antigénica.
8. Nanoestructura que comprende:
 - a) un núcleo de compartimento acuoso; y
 - b) una monocapa o una bicapa que encierra dicho núcleo, en la que la monocapa o bicapa comprende:
 - i) monómeros de fosfolípidos, y
 - ii) porfirina que tiene cobalto coordinado a la misma formando porfirina de cobalto, en la que la porfirina se conjuga con los monómeros de fosfolípidos; y
 - c) una molécula de presentación etiquetada con polihistidina, en la que al menos una parte de la etiqueta de polihistidina reside en la parte hidrófoba de la monocapa o la bicapa, una o más histidinas de la etiqueta de polihistidina están coordinadas al cobalto en la porfirina de cobalto, y la molécula de presentación etiquetada con polihistidina se presenta en la superficie de la bicapa o la monocapa y, por tanto, se expone al exterior de la nanoestructura.
9. Composición que comprende un liposoma según la reivindicación 1, en la que la composición es para uso en un procedimiento para generar una respuesta inmune en un individuo huésped que comprende administrar al individuo una composición que comprende los liposomas de la reivindicación 1, en la que la molécula de presentación comprende un epítipo inmunogénico.
10. Composición para su uso de la reivindicación 9, en la que la molécula de presentación es un péptido, polipéptido o proteína derivado de un microorganismo patógeno.
11. Composición para su uso de la reivindicación 10, en la que el individuo es un humano o animal no humano.
12. Composición para su uso de la reivindicación 9, que comprende además un adyuvante.
13. Composición para su uso de la reivindicación 12, en la que el adyuvante es monofosforil lípido A.
14. Nanoestructura que comprende:
 - a) una nanopartícula de oro; y
 - b) un recubrimiento monocapa o bicapa sobre la nanopartícula de oro, en la que la monocapa o la bicapa comprende:
 - i) monómeros de fosfolípidos, y
 - ii) porfirina que tiene cobalto coordinado a la misma formando porfirina de cobalto, en la que la porfirina está coordinada a los monómeros de fosfolípidos; y
 - c) una molécula de presentación etiquetada con polihistidina, en la que al menos una parte de la etiqueta de polihistidina reside en la parte hidrófoba de la monocapa o la bicapa, una o más histidinas de la etiqueta de polihistidina están coordinadas al cobalto en la porfirina de cobalto, y la molécula de presentación etiquetada con polihistidina se presenta en la superficie de la bicapa o la monocapa y, por tanto, se expone al exterior de la nanoestructura.

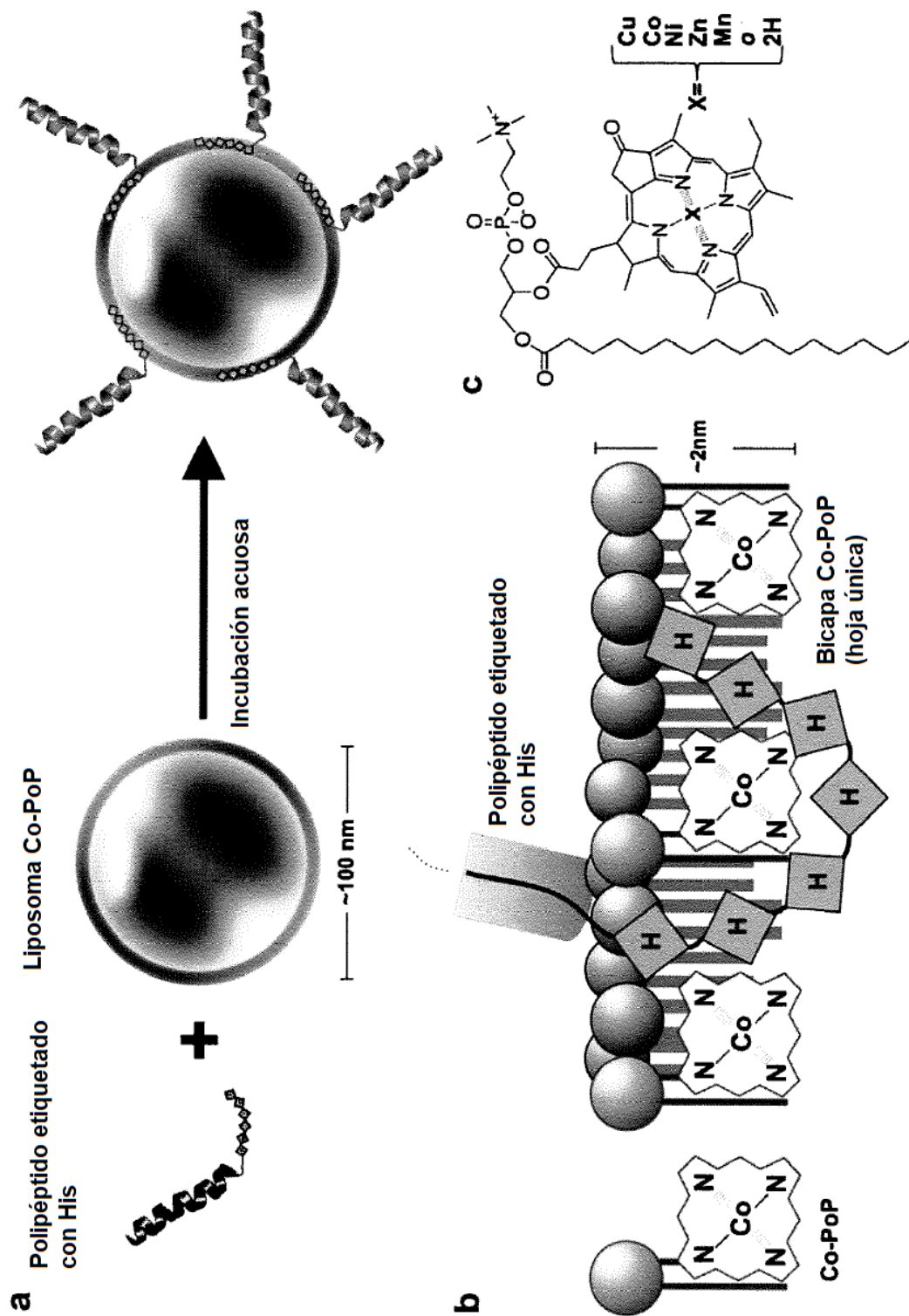
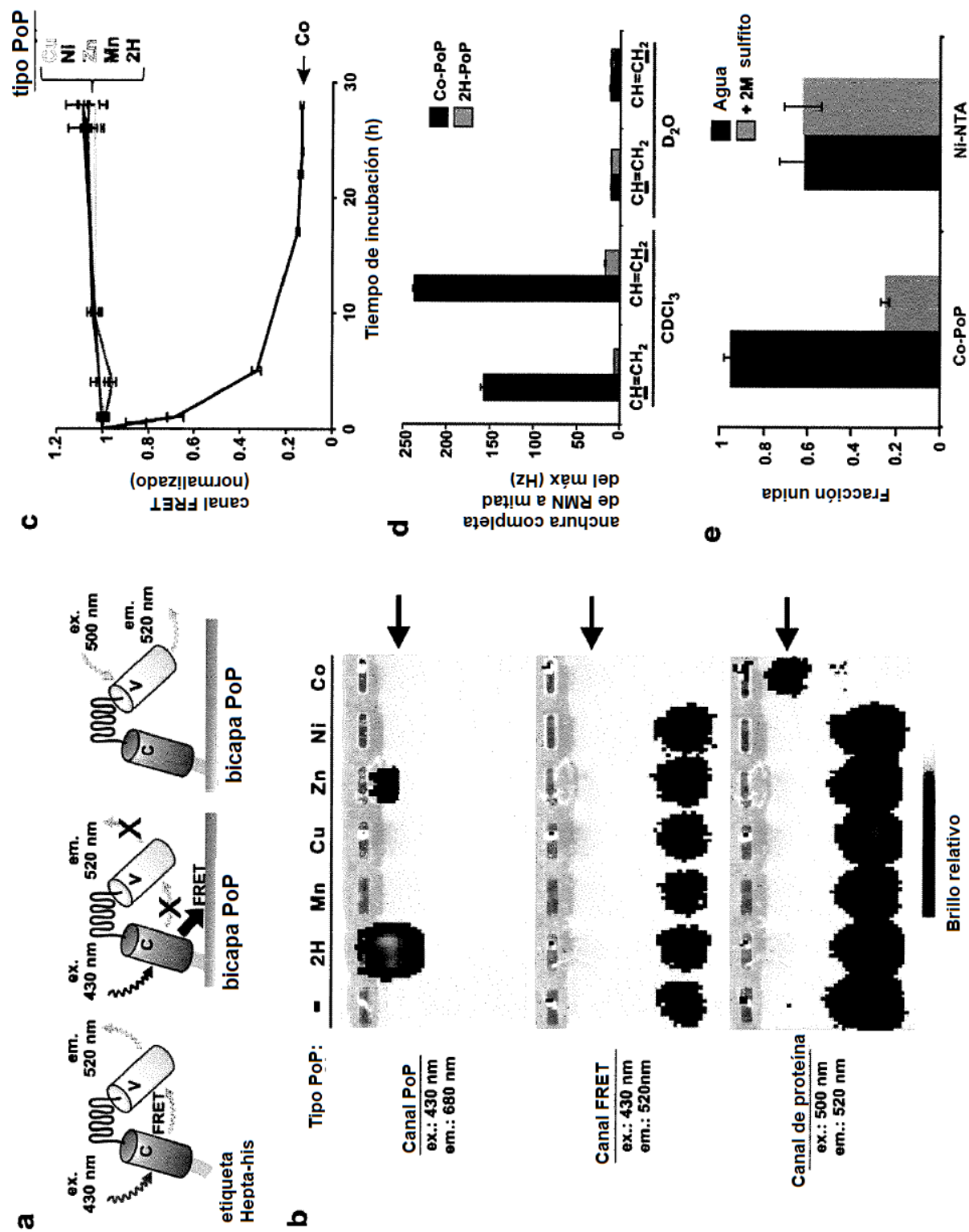


Figura 1

Figura 2



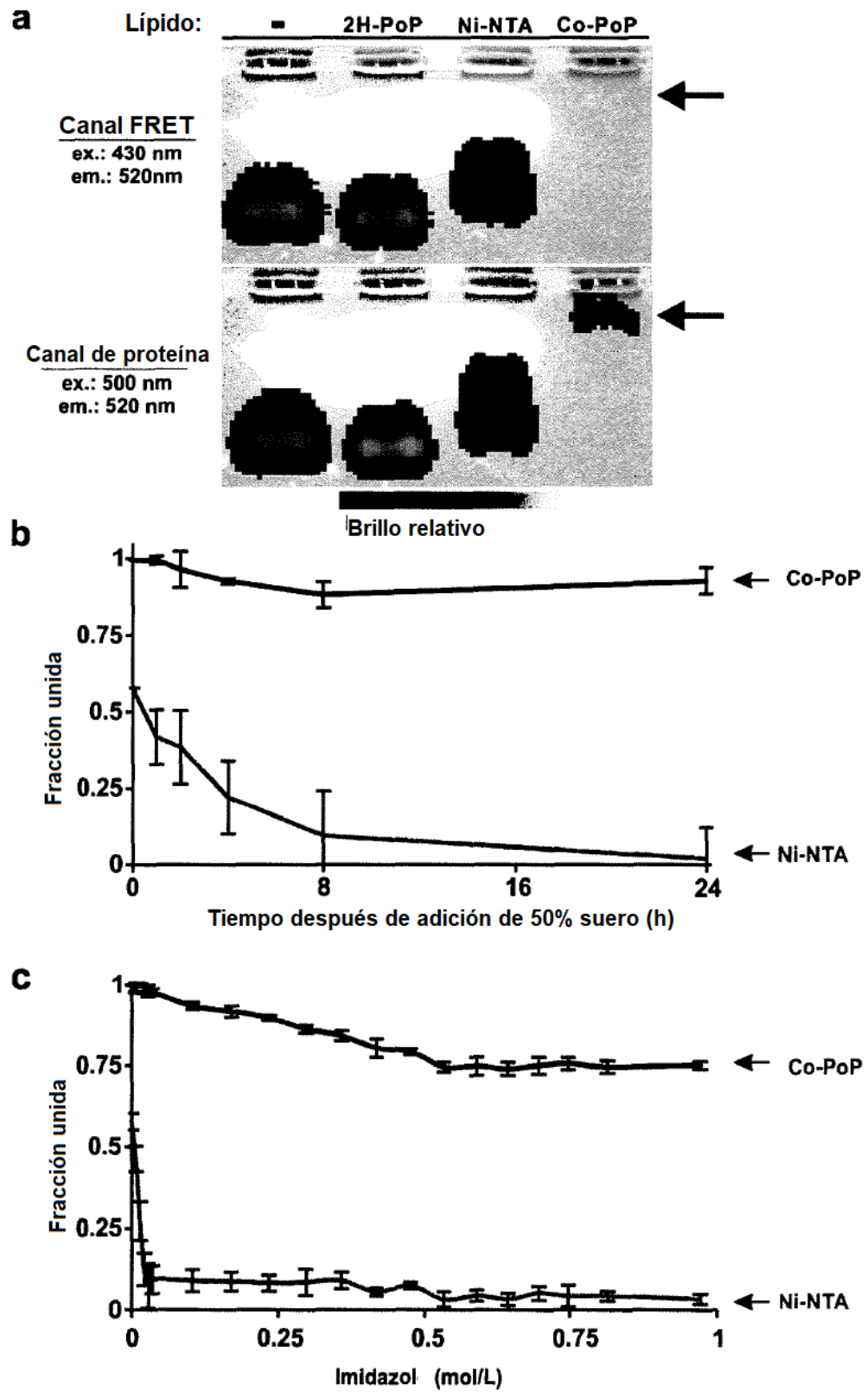


Figura 3

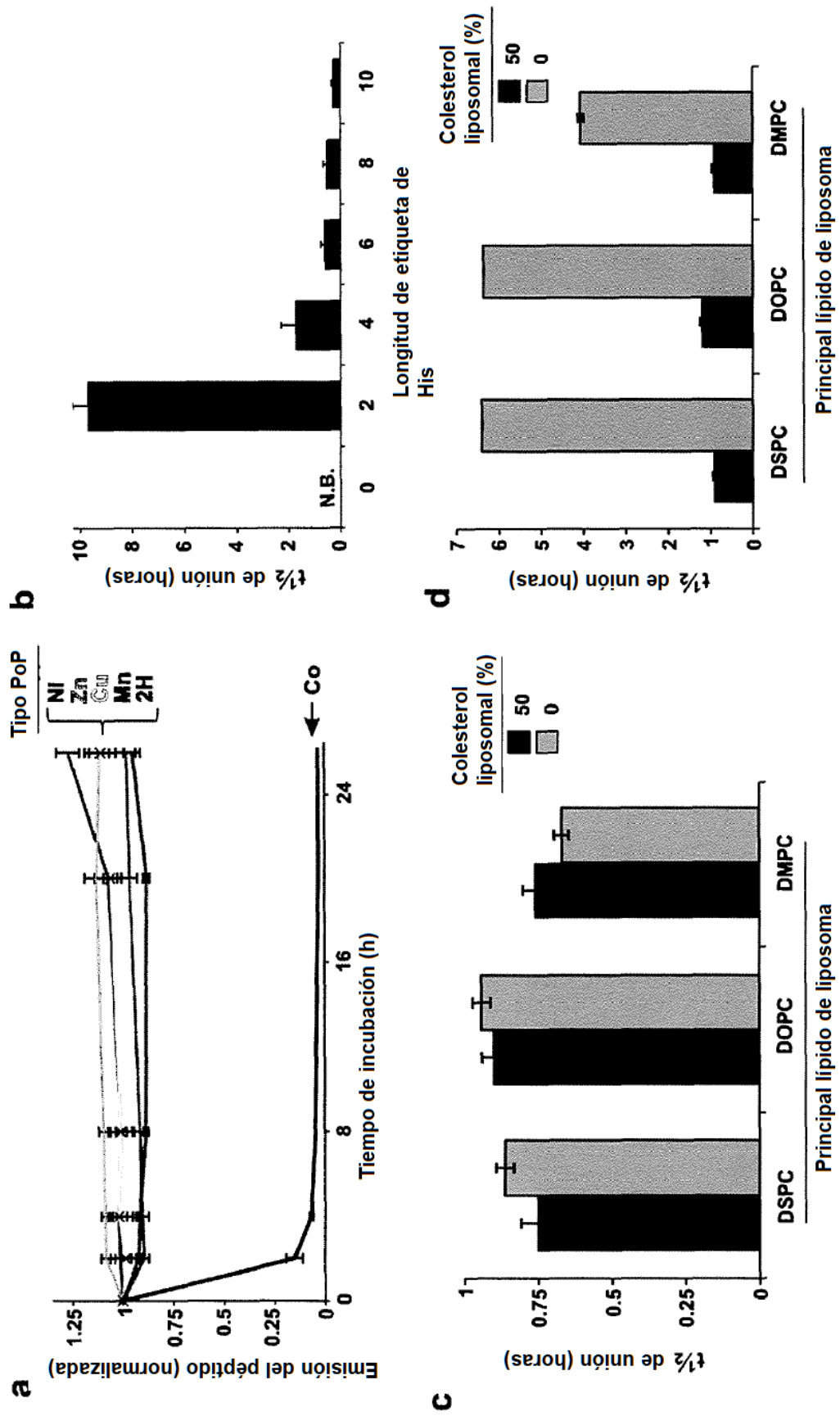
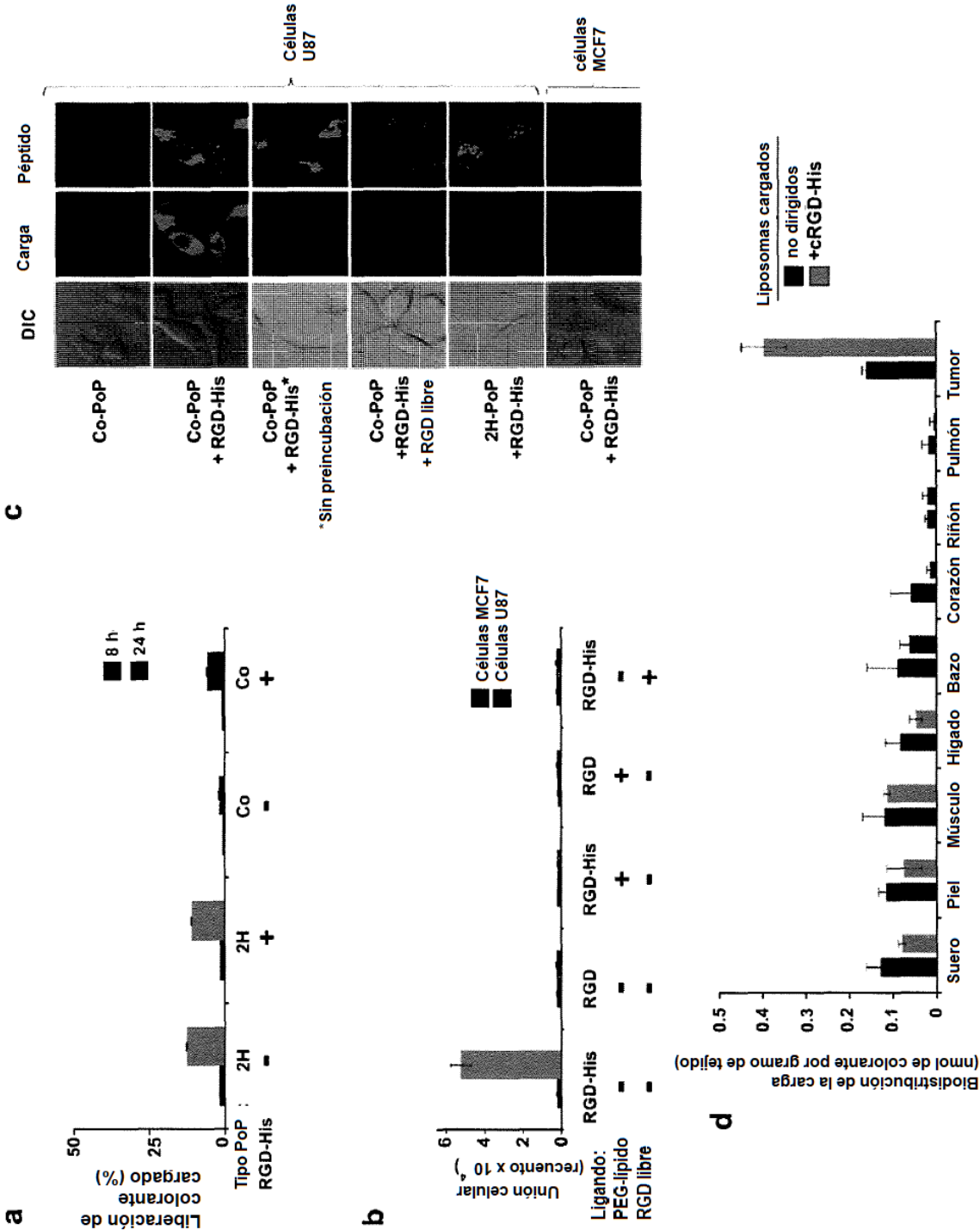


Figura 4

Figura 5



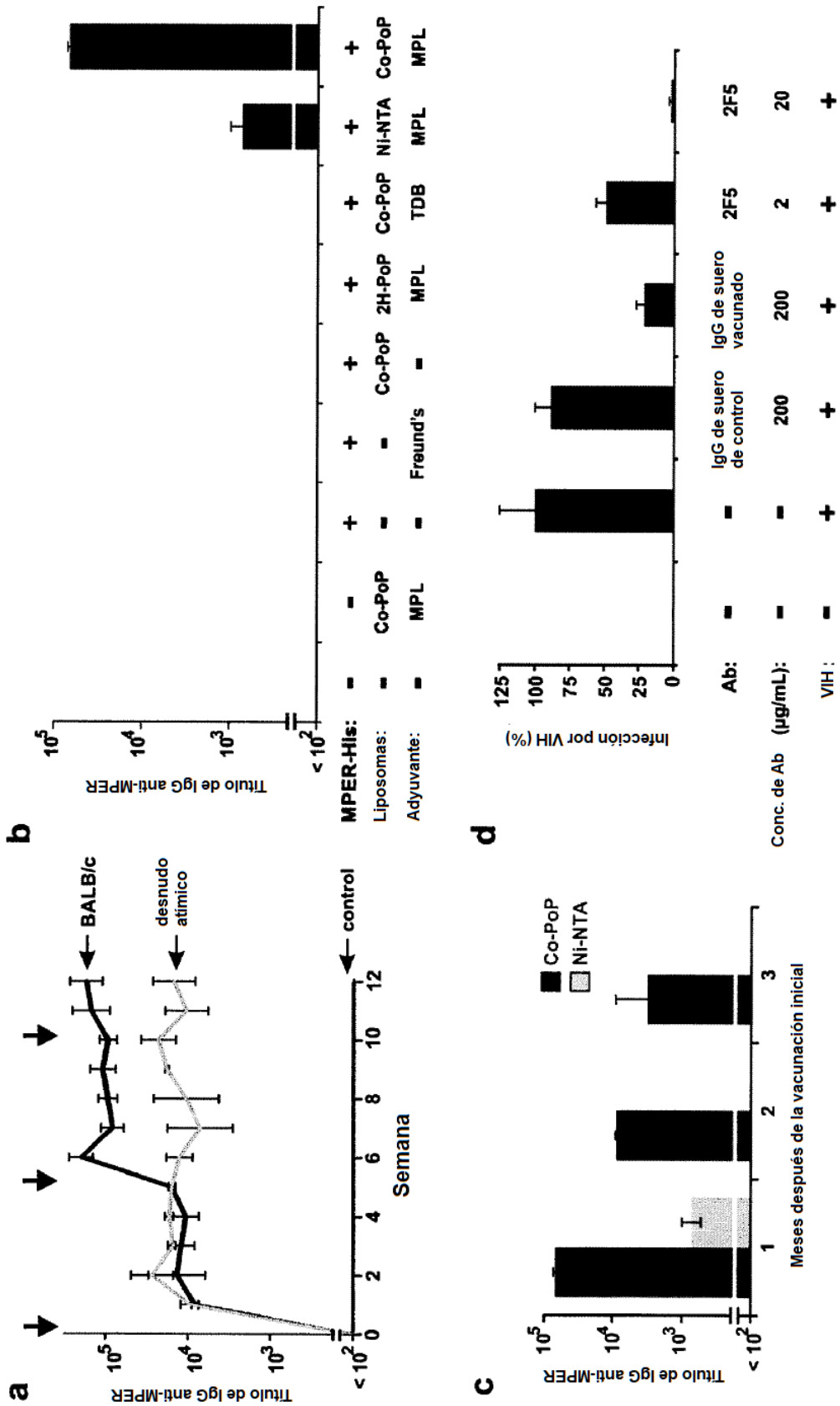
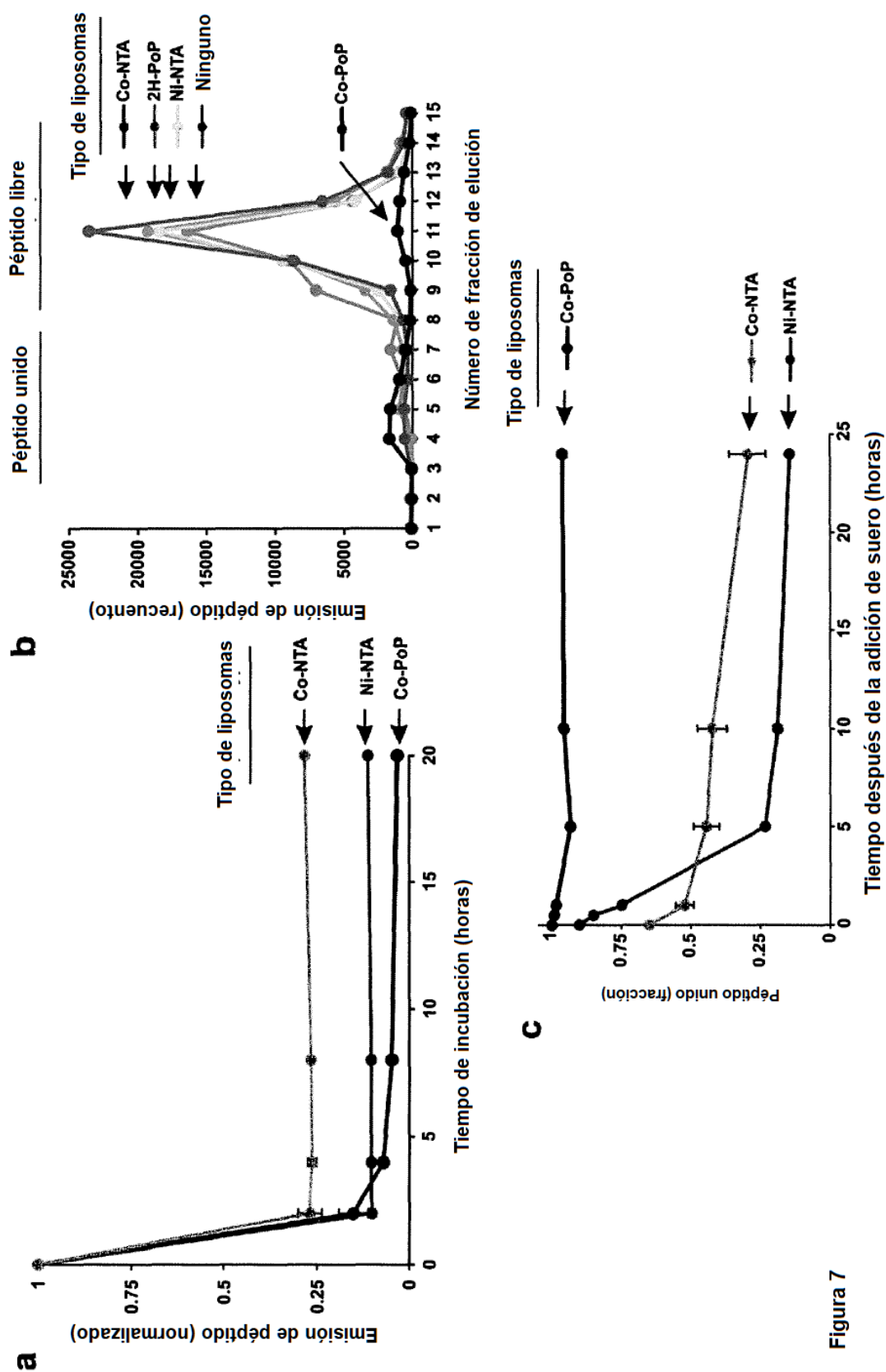


Figura 6



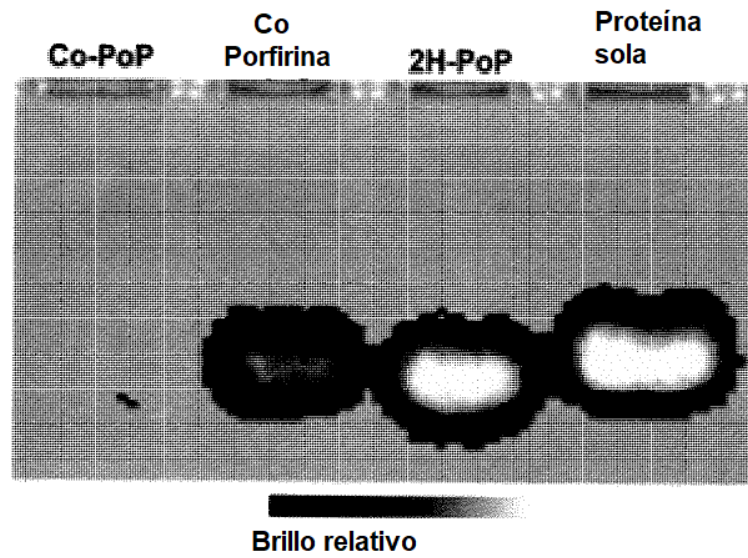


Figura 8

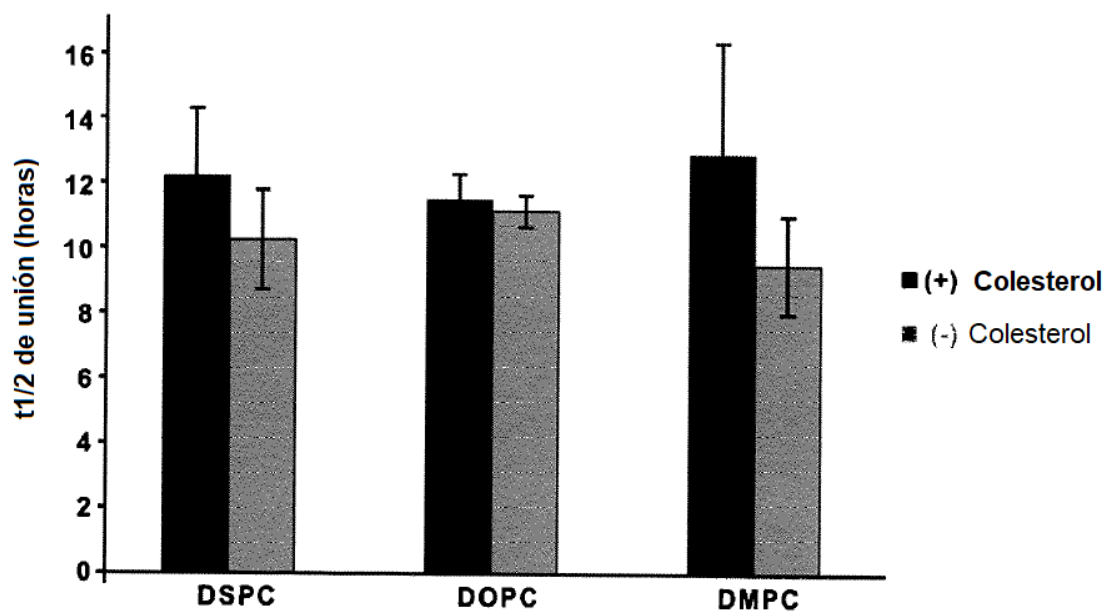


Figura 9

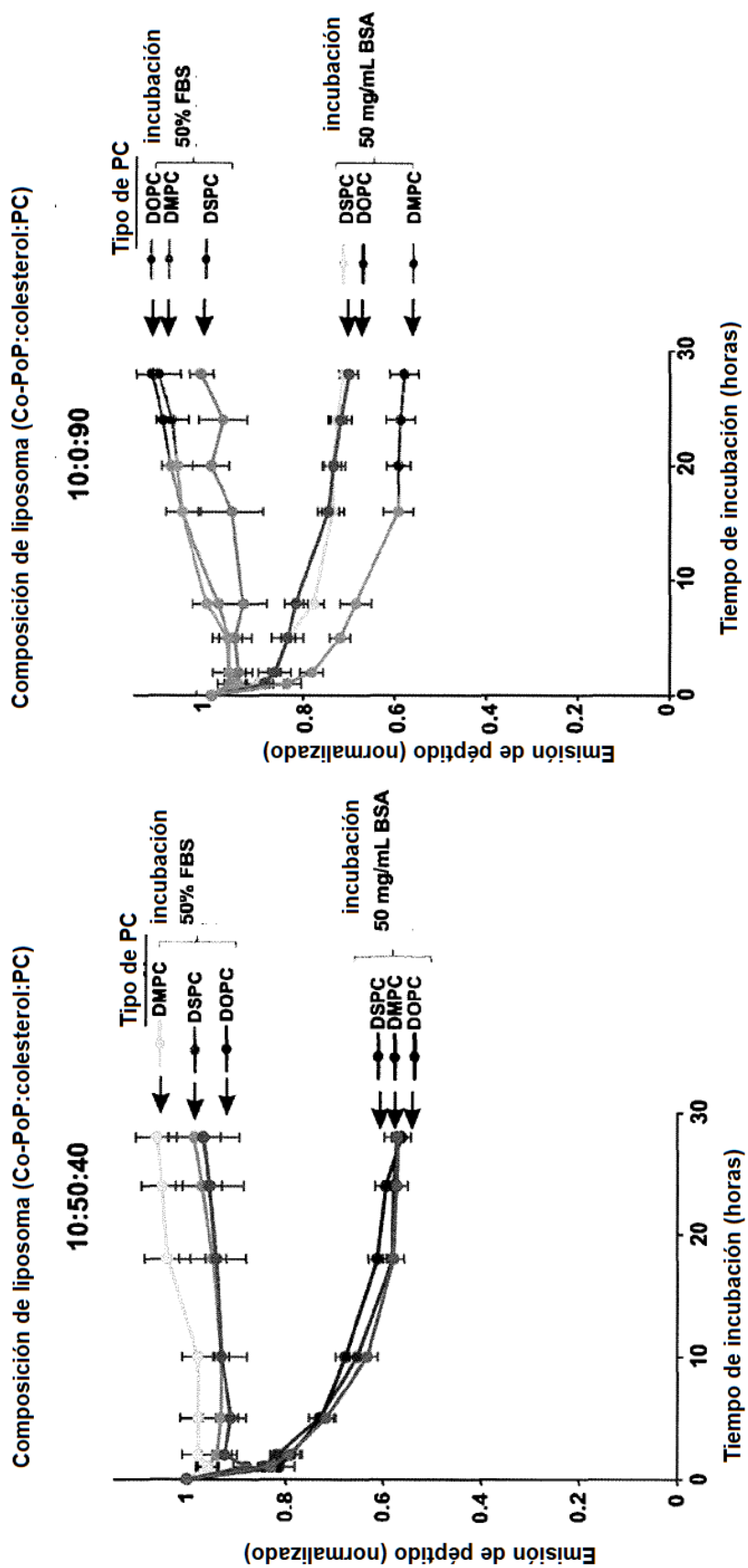


Figura 10

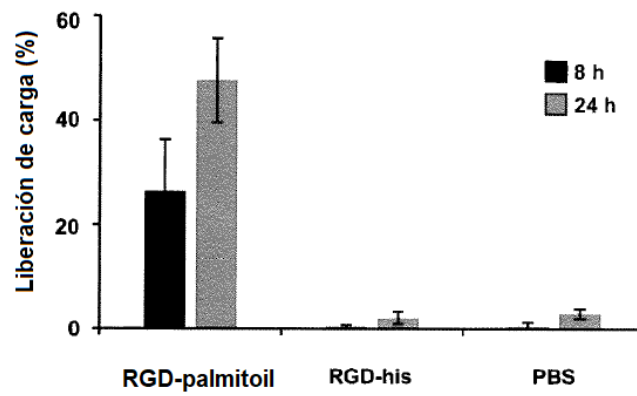


Figura 11

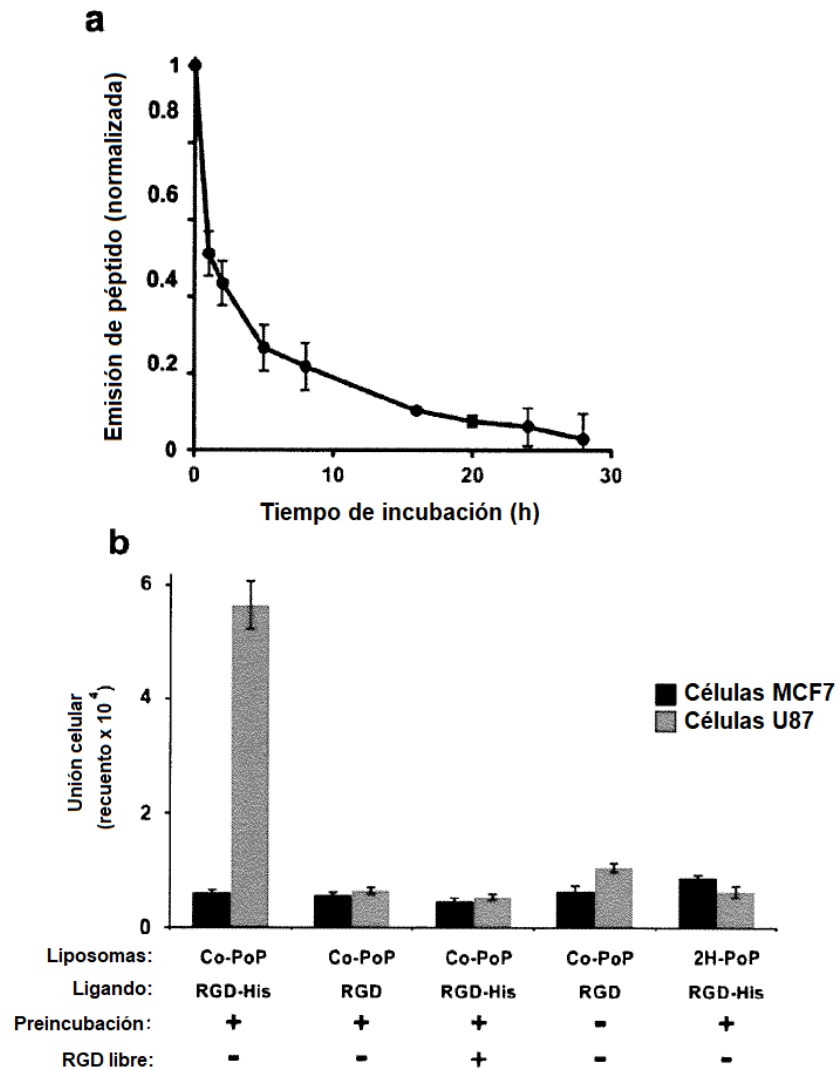


Figura 12

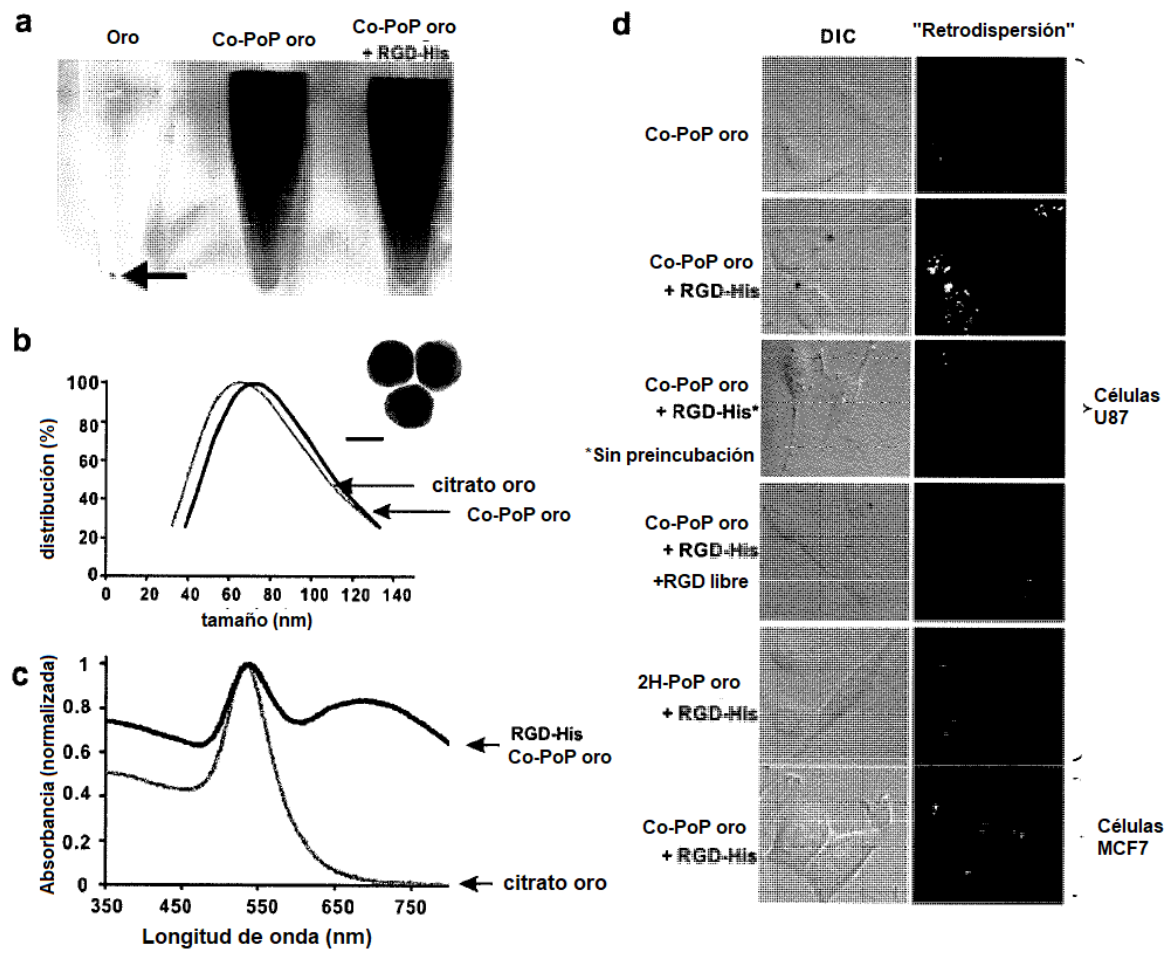


Figura 13

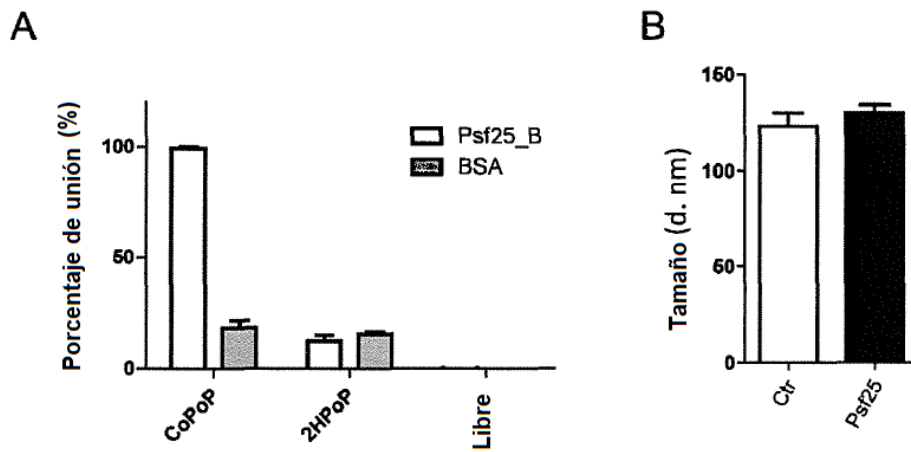


Figura 14

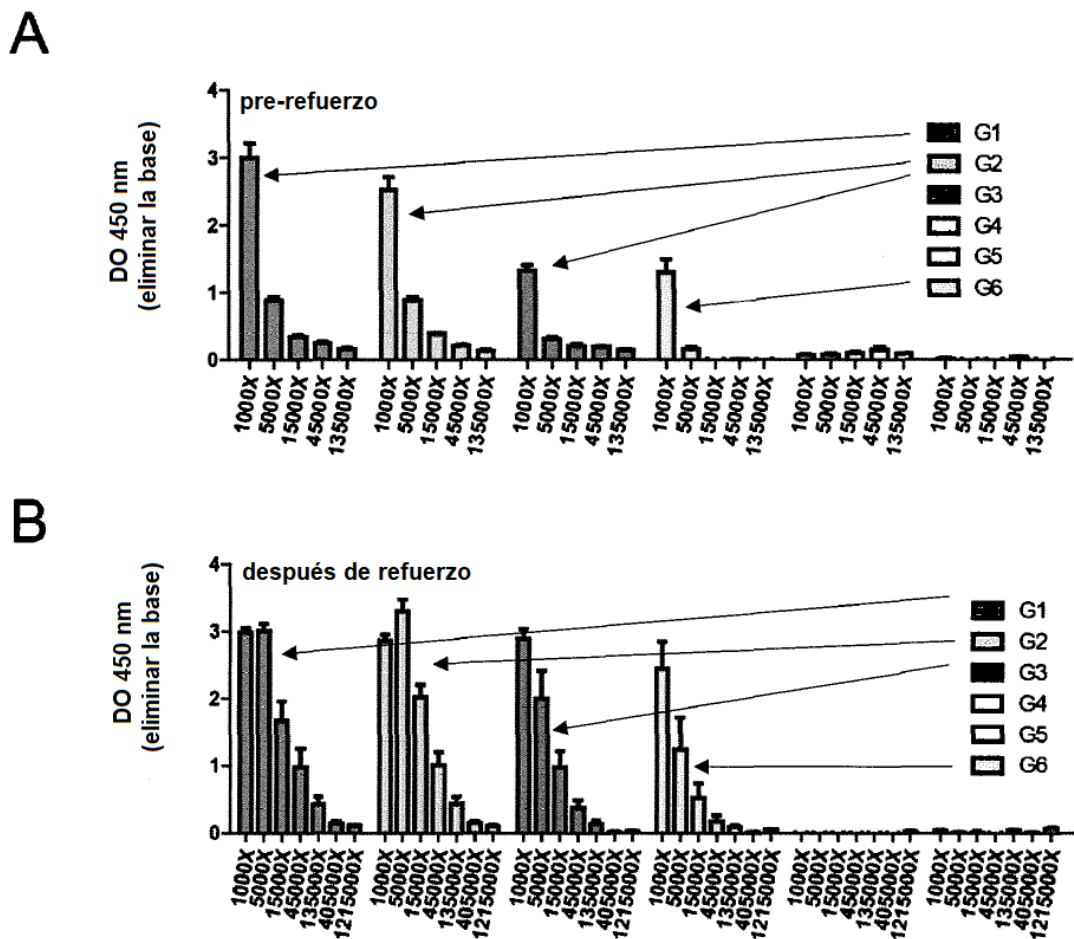


Figura 15

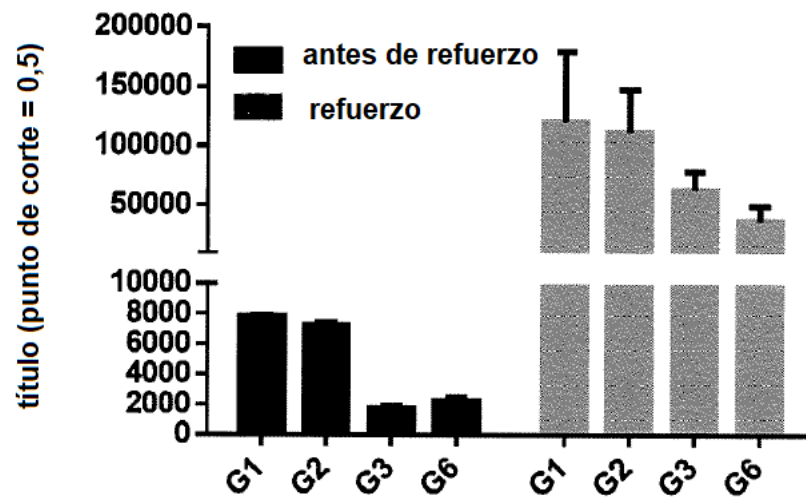


Figura 16

A

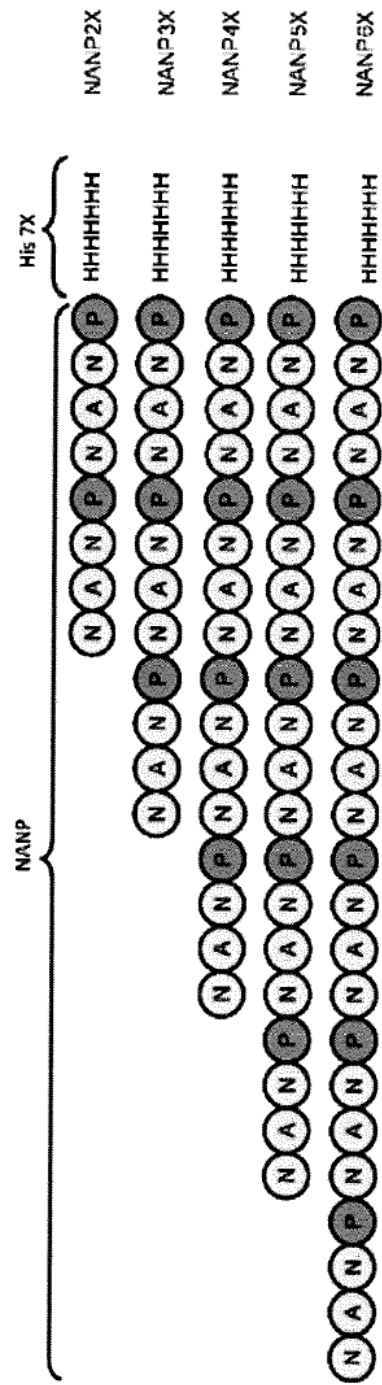
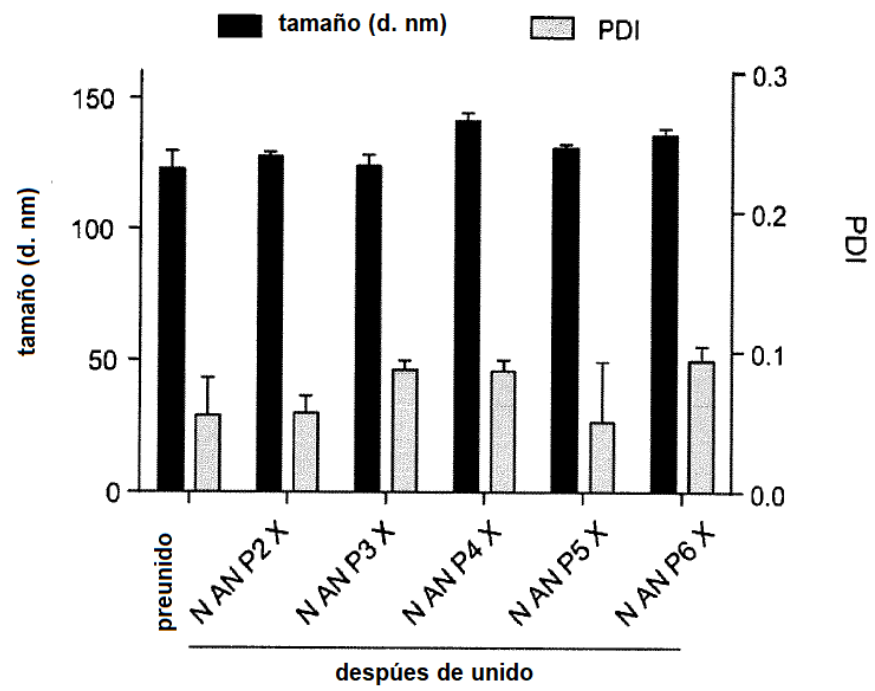


Figura 17

B



C

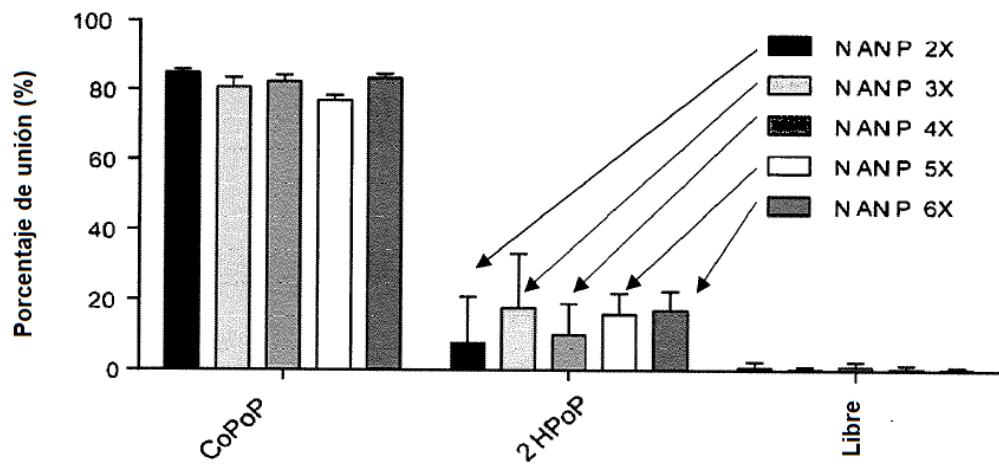


Figura 17 (continuación)

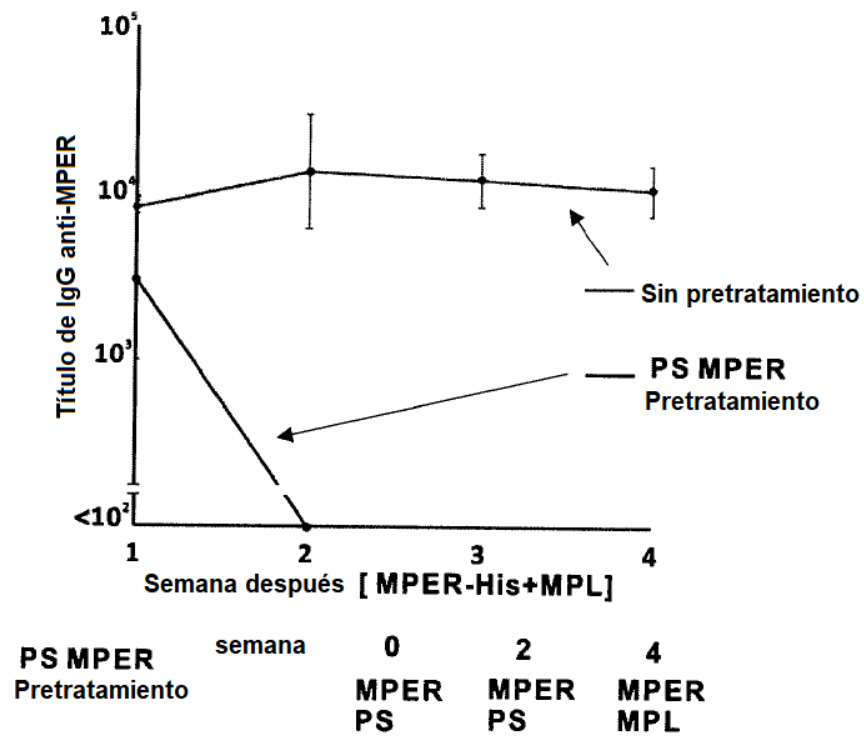


Figura 18

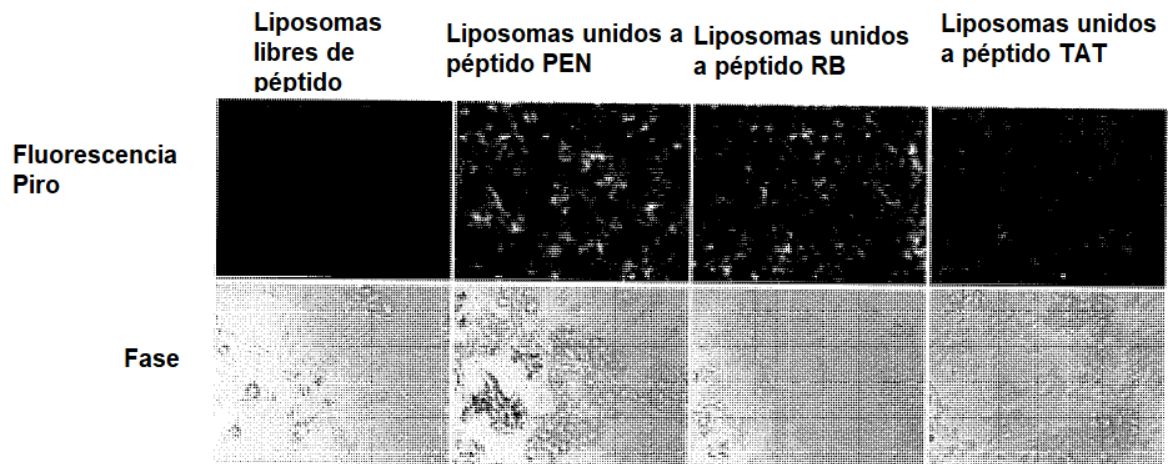


Figura 19