

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 038**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2017** **PCT/US2017/026200**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017** **WO17176916**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2017** **E 17779769 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3439636**

54 Título: **Composiciones que contienen fosfoserina para la inducción de la tolerancia inmune**

30 Prioridad:

05.04.2016 US 201662318375 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2023

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE
UNIVERSITY OF NEW YORK (100.0%)
University At Buffalo Office Of Science
Technology Transfer And Economic Outreach
Baird Research Park 1576 Sweet Home Road
Suite 111
Amherst, NY 14228-2567, US**

72 Inventor/es:

**BALU-IYER, SATHY;
BANKERT, RICHARD;
RAMAKRISHNAN, RADHA;
DINGMAN, ROBERT;
IYER, VANDANA;
SCHNEIDER, JENNIFER;
YAU, FIONA y
NGUYEN, NHAN, HANH**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 952 038 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que contienen fosfoserina para la inducción de la tolerancia inmune

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente Provisional de EE. UU. no. 63/318.375.

Declaración con relación a la investigación con financiación federal

10

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el no. de contrato HL-70227 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Antecedentes de la divulgación

15

La respuesta inmune no deseada frente a proteínas terapéuticas y autoantígenos es un problema clínico importante. De manera similar, las alergias alimentarias continúan siendo una gran preocupación. Por ejemplo, la respuesta inmune no deseada frente al Factor VIII, una terapia de reemplazo usada para tratar la Hemofilia A, un trastorno hemorrágico, incita una respuesta de anticuerpos que anula la eficacia de la terapia en aproximadamente el 30 % de los pacientes. La respuesta inmune no deseada frente a las proteínas propias da lugar a afecciones autoinmunes tales como la esclerosis múltiple, la diabetes, la artritis, etc. De manera similar, la respuesta inmune frente a alimentos tales como el trigo y el cacahuete da lugar a alergias alimentarias. Hay varios enfoques que se llevan a cabo para minimizar la inmunogenicidad, incluido el desarrollo de una formulación menos inmunogénica, la modificación de las opciones de tratamiento, el uso de esteroides y los enfoques de administración. US 2015/004218 divulga métodos para inducir tolerancia inmune o para reducir la inmunogenicidad de una proteína en un sujeto que implica liposomas asociados con dicha proteína.

20

25

Cada enfoque tiene limitaciones y no se ha logrado un enfoque efectivo para minimizar la inmunogenicidad.

30 Resumen de la divulgación

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden partículas lipídicas que comprenden fosfoserina o fosfatidilserina (PS). La PS está presente como lisofosfatidilserina (liso-PS), en donde la cadena de acilo de la liso-PS es ácido oleico. La presente divulgación también proporciona una combinación para su uso en métodos para inducir tolerancia inmune usando dichas composiciones. La divulgación se basa en la sorprendente observación de que la administración de proteínas diana en complejo con ciertas composiciones lipídicas da como resultado una capacidad de respuesta inmunológica baja frente a la proteína para la administración o exposición posterior.

35

40

Las composiciones de la presente divulgación comprenden complejos de proteínas diana y liposomas o estructuras lipídicas, en donde los liposomas o estructuras lipídicas comprenden liso-PS, en donde la cadena de acilo de la liso-PS es ácido oleico, y fosfatidilcolina (PC), y en donde la relación molar de PC a liso-PS es de 90:10 a 60:40. Los liposomas también pueden comprender fosfatidiletanolamina (PE) además de PS y PC. La proteína puede ser cualquier proteína diana.

45

La presente divulgación proporciona liposomas que comprenden fosfatidilcolina (PC) y lisofosfatidilserina (liso-PS), en donde la relación molar de PC a liso-PS es de 90:10 a 60:40. La cadena de acilo de la liso-PS es ácido oleico. Se observó que una longitud de cadena de 18 con un enlace doble (18:1, ácido oleico) era particularmente efectiva en la inducción de tolerancia inmune. La longitud de la cadena de acilo de las cadenas de PC puede ser de 12-22. Se observó que una longitud de cadena de acilo de 14 (DMPC) era particularmente efectiva en la inducción de tolerancia inmune.

50

En una realización, el tamaño de los liposomas que comprenden PC y liso-PS es de aproximadamente 50-150 nm. En una realización, aproximadamente el 90 % de los liposomas están dentro de un rango de 50 a 150 nm. En una realización, en la que se usó PC:liso-PS (PS es 18:1) en una relación molar de 70:30, se encontró que la distribución del tamaño de las partículas era: 99 % menos de 250 nm, 90 % menos de 160 nm, 75 % menos de 125 nm, 50 % menos de 100 nm, 25 % menos de 70 nm. El diámetro medio de las partículas puede ser de 90 a 120 nm. Por ejemplo, el diámetro medio puede ser de 95 a 110 nm, tal como, por ejemplo, aproximadamente 106 nm. El tamaño de los liposomas es para una población que se extruyó seis veces a través de un filtro de 0,2 micrómetros. Cuando una PC:PS (cadena doble, 18:1) se extruyó de manera similar seis veces a través de un filtro de 0,2 micrómetros, la distribución del tamaño fue: 99 % menos de 450 nm, 90 % menos de 280 nm, 75 % menos de 210 nm, 50 % menos de 160 nm y 25 % menos de 115 nm. Cuando una PC:PS (cadena doble, 16:0) se extruyó de manera similar seis veces a través de un filtro de 0,2 micrómetros, la distribución del tamaño fue: 99 % menos de 310 nm, 90 % menos de 260 nm, 75 % menos de 240 nm, 50 % menos de 215 nm y 25 % menos de 200 nm.

55

60

65

El potencial zeta de los liposomas de PS-liso al 30 % (es decir, liposomas que comprenden PC:liso-PS 70:30) fue de aproximadamente -10 a aproximadamente -17, mientras que el potencial zeta de los liposomas de PS al 30 % (es decir, liposomas que comprenden PC:PS 70:30) fue de aproximadamente -24 a aproximadamente -33. Si el tamaño de los liposomas de PS al 30 % coincidía con el tamaño de los liposomas de liso-PS al 30 % (p. ej., filtrando los liposomas de PS a través de un filtro de 100 nm para que ambas poblaciones tuvieran un tamaño promedio de aproximadamente 106 nm, se encontró que el potencial zeta de los liposomas de PS era de aproximadamente -17 a aproximadamente -26. Por lo tanto, los liposomas de PC:liso-PS son más pequeños y sorprendentemente menos negativos en comparación con los liposomas de PC:PS correspondientes.

Una estrategia de administración divulgada en la presente memoria se designa como estrategia de "vacunación inversa/reversa" en la que la exposición previa (p. ej., inmunización) a través de la ruta oral a composiciones liposomales particulares (designadas aquí como composiciones tolerogénicas o de cebado) en complejo con la proteína diana puede conducir a una capacidad de respuesta baja a la proteína en el pulso posterior con proteína libre o menos tolerogénica, o cualquier otra forma de la proteína (p. ej., en complejo con cualquier otro vehículo adecuado, tales como vehículos de proteínas o péptidos u otros vehículos tales como polietilenglicol (PEG), tensioactivos, microesferas, etc.) y expuesto al individuo a través de la ruta o por cualquier otra ruta. La inducción de tolerancia inmune se manifiesta como uno o más de los siguientes: expresión regulada a la baja de señales coestimuladoras en las células dendríticas, disminución de la proliferación de células T CD4+ y/o secreción inducida de citoquinas inmunorreguladoras tales como TGF- β e IL-10, y/o reducción en la titulación de anticuerpos.

Una estrategia de administración divulgada en la presente memoria se designa como "estrategia de administración continua" o "modo continuo" cuando se administran una o más dosis de una composición de cebado de forma continua durante un período de tiempo. Por lo tanto, el régimen de administración puede implicar una administración sustancialmente regular, cuya administración puede ser, por ejemplo, diaria o semanal, o puede ser más o menos frecuente, y puede administrarse por cualquier ruta. Dicho régimen de administración puede llevarse a cabo durante semanas, meses o años. Los intervalos entre las administraciones consecutivas pueden ser iguales o diferentes, pero generalmente mantendrán la periodicidad de la administración.

Las composiciones de esta divulgación pueden denominarse composiciones de cebado. Por consiguiente, el método de la presente invención para proporcionar una proteína terapéutica a un individuo sin incitar una reacción inmune o incitando una respuesta inmune mínima comprende administrar una composición de cebado a un individuo, que comprende la proteína en complejo con liposomas que comprenden PS, en donde la PS está presente como liso-PS, y administrar al individuo una segunda composición que comprende: i) solo la proteína (es decir, sin liposomas ni fosfolípidos), ii) que comprende la proteína y los liposomas o fosfolípidos, pero no en forma de complejo, iii) que comprende la proteína en complejo con liposomas en los que la composición de fosfolípidos es diferente de la composición de fosfolípidos de la composición de cebado, tal como, por ejemplo, la composición de los liposomas en la segunda composición puede estar libre de liso-PS y, opcionalmente, también libre de PS, o iv) que comprende la proteína en complejo con algún otro vehículo que está libre de liso-PS y, opcionalmente, también libre de PS.

La composición de cebado se puede administrar una vez o múltiples veces, y se puede administrar de forma continua (administración continua). De manera similar, la segunda composición se puede administrar una vez o múltiples veces, o de forma continua (administración continua), o se puede administrar de forma intermitente según sea necesario. La segunda composición se puede administrar después de permitir una ventaja inicial con la primera composición, tal como después de 4-6 semanas del inicio de la primera composición, o se puede administrar o iniciar al mismo tiempo o dentro de las 4-6 semanas del inicio de la primera composición.

En una realización, la composición de cebado (también denominada primera composición) se puede administrar en un programa continuo y la segunda composición (también denominada en la presente memoria composición terapéutica) se puede administrar después de un lapso de tiempo después del inicio de la administración de la composición de cebado, pero superponiéndose al programa de administración de la primera composición. Por tanto, la administración de la segunda composición puede ocurrir simultáneamente con la administración de la primera, solo después de un período de administración inicial de la primera composición.

Al usar el método de la presente divulgación, en el caso de un autoantígeno o un alérgeno, el individuo habrá desarrollado tolerancia inmune y no se espera que genere una respuesta inmune cuando se exponga al autoantígeno o alérgeno.

Las presentes composiciones y métodos son útiles para la inducción de tolerancia inmune frente a la proteína administrada, particularmente a través de la ruta oral. Las presentes composiciones y métodos también son útiles para reducir las titulaciones de anticuerpos existentes.

El método de la presente invención se puede usar para individuos que se sabe que tienen intolerancia inmunológica a la proteína diana o para aquellos cuyo estado inmunológico hacia una proteína diana es desconocido. Por ejemplo, en el caso de una proteína terapéutica, las presentes composiciones se pueden usar para individuos a los que se les está administrando la proteína terapéutica, pero que no han mostrado previamente una intolerancia

inmune a la proteína, o para individuos sin tratamiento previo (es decir, aquellos a los que no se ha administrado previamente el péptido o la proteína). Se considera que los individuos no han exhibido intolerancia inmune a una proteína si no hay titulaciones detectables de anticuerpos frente a la proteína. En el caso de una proteína de diagnóstico, las presentes composiciones se pueden administrar a individuos que se sabe que han tenido una reacción previa, o a aquellos individuos a los que no se les ha administrado previamente la proteína diana o que no han mostrado una reacción inmunológica previamente. De manera similar, para autoantígenos o alérgenos, las presentes composiciones se pueden administrar a aquellos individuos que se sabe que son inmunológicamente intolerantes a la proteína o a aquellos cuyo estado inmunológico es desconocido o que se considera que corren el riesgo de desarrollar una alergia a la proteína. proteína (tal como debido a que porta un determinado gen, etc.).

En la presente divulgación, se observó que las composiciones que comprenden complejos de proteínas con liposomas que comprenden PC y liso-PS fueron efectivos para inducir tolerancia inmunológica y reducir las titulaciones de anticuerpos existentes en relación con complejos de proteínas con liposomas que comprenden PC y PS. En particular, se encontró que una composición que comprende liposomas en complejo con un antígeno es particularmente efectiva, donde los liposomas comprenden PC presente como DMPC y PS presente como liso-PS. La eficacia fue más pronunciada cuando los liposomas en complejo con proteínas (primera composición) se administran a un individuo durante un período de al menos 4 semanas, y, sin interrumpir el programa de administración de la composición del complejo liposoma-proteína de la primera composición, se administra una segunda composición que comprende la proteína sin formar complejos con los liposomas de la primera composición.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación del modo de administración continua y muestra la inducción de tolerancia a FVIII. Se usaron ratones machos y hembras con inactivación génica (n=7 por grupo). Se usaron 0,4 µg de FVIII en tampón Tris (NaCl 150 mM, TRIS 25 mM, pH 7,0), libre de endotoxinas. La relación de proteína a lípido fue de 1:10.000. Las inmunizaciones se realizaron por sonda oral o por ruta subcutánea. El nuevo pulso (es decir, la administración de una segunda composición) se realizó por la ruta iv, 24 horas después de las inmunizaciones. Los diferentes grupos de tratamiento fueron: FVIII libre, FVIII PS, FVIII liso-PS al 15 % (liso-PS:PS:PC 15:15:70), FVIII liso-PS al 30 % (liso-PS:PC 30:70).

La Figura 2 muestra en A) y B) los resultados de la administración oral descritos en la figura 1. Solo la liso-PS induce tolerancia cuando se administra oralmente.

La Figura 3 muestra en A) y B) los resultados de la administración subcutánea descritos en la figura 1. Tanto PS como liso-PS son capaces de inducir tolerancia cuando se administran subcutáneamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas.

La Figura 4 es una representación de la tolerancia oral. Se usaron ratones machos y hembras con inactivación génica para FVIII (n=7 por grupo). Se usaron 0,4 µg de FVIII en tampón Tris (NaCl 150 mM, TRIS 25 mM, pH 7,0), libre de endotoxinas. La relación de proteína a lípido fue de 1:10.000. Las inmunizaciones se realizaron por sonda oral. El nuevo pulso se realizó a través de la vena de la cola. Los diversos grupos de tratamiento fueron: tampón, FVIII libre, FVIII PS y FVIII Liso-PS al 30 %.

La Figura 5 muestra en A) y B) los resultados de tolerancia oral de la administración descrita en la figura 4.

La Figura 6 muestra la reversión de las titulaciones establecidas a través de la tolerancia oral. Se usaron ratones machos y hembras con inactivación génica (n=7 por grupo). Se usaron 0,4 µg de FVIII en tampón Tris (NaCl 150 mM, TRIS 25 mM, pH 7,0), libre de endotoxinas. La relación de proteína a lípido fue de 1:10.000. Las inducciones se realizaron a través de la ruta subcutánea. Las inmunizaciones se realizaron por sonda oral. Los diversos grupos de tratamiento fueron: tampón, FVIII libre, FVIII PS y FVIII Liso-PS.

La Figura 7 muestra los resultados de la reversión de las titulaciones establecidas mediante la tolerancia oral descrita en la figura 6.

La Figura 8 muestra la especificidad del antígeno liso-PS mediante administración subcutánea. Se usaron ratones machos y hembras GFP-FoxP3 HA (n=18 por grupo). Se usaron 0,4 µg de FVIII en tampón Tris (NaCl 150 mM, TRIS 25 mM, pH 7,0), libre de endotoxinas. La relación de proteína a lípido fue de 1:10.000. Las inmunizaciones y el nuevo pulso se realizaron mediante administración subcutánea. Se sacrificaron 6 animales por grupo en la línea base. 6 animales por grupo recibieron un nuevo pulso con FVIII, mientras que los 6 animales restantes recibieron un nuevo pulso con ovoalbúmina. Los diversos grupos de tratamiento fueron FVIII libre y FVIII Liso-PS.

La Figura 9 muestra los resultados de la especificidad del antígeno liso-PS de la administración subcutánea descrita en la figura 8. A) muestra los datos de titulación en la línea base. B) muestra datos de titulación anti-FVIII terminales. C) muestra datos de IgG anti-OVA terminal.

La Figura 10 muestra la especificidad del antígeno liso-PS por sonda oral. Se usaron ratones machos y hembras GFP-FoxP3 HA (n=12 por grupo). Se usaron 0,4 µg de FVIII en tampón Tris (NaCl 150 mM, TRIS 25 mM, pH 7,0), libre de endotoxinas. La relación de proteína a lípido fue de 1:10.000. Las inmunizaciones se realizaron por sonda oral. El nuevo pulso se realizó mediante administración intravenosa. 6 animales por grupo recibieron un nuevo pulso con FVIII, mientras que otros 6 animales por grupo recibieron un nuevo pulso con ovoalbúmina. Los diversos grupos de tratamiento fueron; FVIII libre, FVIII liso-PS, y tampón.

La Figura 11 muestra los resultados de la especificidad del antígeno liso-PS mediante sonda oral descrita en la figura 10. A) muestra datos de titulación de anti-FVIII terminales. B) muestra datos de IgG anti-OVA terminal.

La Figura 12 muestra el potencial zeta de DMPC, PS (200 nm), PS (80 nm) y liso-PS.

La Figura 13 muestra el potencial zeta de Liso-PS y PS. El potencial zeta se determinó usando el modo de Smoluchowski y el modo de Huckle.

La Figura 14 muestra A) un termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de DMPC, Liso-PS al 10 %, Liso-PS al 20 % y Liso-PS al 30 %. B) Anisotropía de fluorescencia dependiente de la temperatura de DMPC, liso-PS al 10 %, liso-PS al 20 % y liso-PS al 30 %.

La Figura 15 muestra A) anisotropía de fluorescencia dependiente de la temperatura de DMPC, liso-PS y PS 18:1. B) Un termograma de DSC de DMPC, liso-PS y PS 18:1.

La Figura 16 muestra A) un termograma de DSC de liso:RA. B) Polarización de fluorescencia de liposomas que contienen RA al 5 %. C) Termograma de DSC de rapamicina cargada en liso-PS.

La Figura 17 muestra la eficiencia de asociación de liso-colágeno (liposomas de liso-PS en complejo con colágeno) a través de un ensayo BCA. La eficiencia fue ~62 %.

La Figura 18 muestra A) fluorescencia de liposomas de liso-PS en complejo con gliadina. B) Primera derivada del espectro mostrado en A).

Descripción detallada de la divulgación

La presente invención proporciona composiciones y su uso en métodos para inducir tolerancia inmune frente a una proteína. La proteína puede ser una proteína terapéutica, una proteína de diagnóstico, un autoantígeno o un alérgeno. Por ejemplo, el método se puede usar para individuos que están en una terapia de proteína terapéutica y pueden o no haber mostrado previamente una intolerancia inmune. También se puede administrar a individuos que van a comenzar un régimen terapéutico para una proteína terapéutica particular. De manera similar, el método se puede usar para individuos que pueden haber presentado una reacción alérgica frente a una proteína de diagnóstico o para un individuo como medida profiláctica antes de que se administre la proteína de diagnóstico a un individuo que nunca se ha encontrado con la proteína. Además, se puede administrar a un individuo que haya presentado una reacción inmunológica frente a un autoantígeno o alérgeno o que pueda estar en riesgo de presentar una reacción frente a dichas proteínas.

Las presentes composiciones comprenden proteínas en complejo con liposomas. Los liposomas pueden referirse como [antígeno]-PS. Tal y como se usa en la presente memoria, el término proteína-PS significa que la proteína forma complejos con liposomas que contienen PS y PC. Por ejemplo, los complejos de FVIII con liposomas que comprenden PS y PC pueden referirse en la presente memoria como FVIII-PS y los complejos de FVIII con liposomas que comprenden liso-PS y PC pueden referirse en la presente memoria como FVIII-liso-PS y así sucesivamente. Según la invención, PS se define como liso-PS, en donde la cadena de acilo de liso-PS es ácido oleico.

El término "proteína diana", tal y como se usa en la presente memoria, significa cualquier proteína frente a la que se desea una capacidad de respuesta inmunológica baja. Por ejemplo, una proteína diana puede ser una proteína terapéutica, una proteína de diagnóstico, un autoantígeno, un neoantígeno, un alérgeno o similares.

Por respuesta inmunológica "específica" se entiende que una respuesta inmune frente a proteínas no relevantes (proteínas que no formaron complejos con los liposomas de la composición de cebado) no se ve afectada.

Por "administrado" o "administración" se entiende que la proteína o el péptido se administran al individuo o se introducen en el cuerpo del individuo por cualquier medio o ruta de administración.

Por titulaciones o anticuerpos "inhibidores" en referencia a una proteína o antígeno se entiende anticuerpos específicos que inhiben la actividad biológica de la proteína o antígeno. Por ejemplo, las titulaciones inhibitoras con referencia a FVIII pueden determinarse midiendo la interferencia con el tiempo de coagulación de la sangre. Las titulaciones totales, por el contrario, se refieren a todos los anticuerpos (tales como IgG, IgM, etc.)

Por "estructuras lipídicas" se entiende liposomas y otras estructuras tales como estructuras micelares, liposomas, coccleatos, ensamblajes moleculares y similares.

- 5 El término "liso", cuando se usa en la presente memoria junto con un fosfolípido, significa que la parte de glicerol de la molécula solo tiene una cadena acilo en lugar de dos. Por ejemplo, liso-PS solo tiene una cadena acilo en comparación con PS que tiene dos cadenas acilo.

- 10 Por referencia a proteína en complejo con liposomas o liposomas en complejo con proteína se entiende que la proteína puede asociarse con la partícula en una o más de las siguientes configuraciones, incluida la localización en el lumen de la partícula, parcial o totalmente intercalada en la bicapa o unida o adsorbida a la superficie de la partícula. Como ejemplos, en la presente memoria se proporcionan datos para complejos liposomas-proteínas para varias proteínas que incluyen FVIII, insulina, alfa glucosidasa ácida (GAA), péptido de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) (35-55), ovoalbúmina (OVA), gliadina, colágeno, proteína de la cápside del virus adeno asociado (AAV).

- 15 Los liposomas también se refieren en la presente memoria como nanopartículas lipídicas o nanopartículas. Los fosfolípidos para preparar los liposomas se pueden obtener de cualquier fuente disponible, tal como plantas o animales. Los fosfolípidos están disponibles comercialmente o pueden sintetizarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, PS se puede obtener a partir de PS de cerebro porcino o PS de soja de origen vegetal (p. ej., planta de soja). La liso-PS también está disponible comercialmente. Para los fines de esta descripción, mientras que los ejemplos de complejos proteicos o la inducción de tolerancia inmune pueden referirse a proteínas específicas, es igualmente aplicable a otras proteínas.

- 25 Los liposomas y otras estructuras lipídicas comprenden PC y PS, que, según la invención, están en la forma de liso-PS, en donde la cadena acilo de la liso-PS es ácido oleico. Los liposomas u otras estructuras lipídicas pueden contener dichas liso-PS y PC como únicos fosfolípidos. La liso-PS puede estar en un rango del 10 % al 50 % de los fosfolípidos totales en la bicapa. Por ejemplo, los liposomas pueden tener relaciones molares de PC:liso-PS de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40. En un ejemplo, la liso-PS puede ser del 15 al 50 % molar, siendo PC los fosfolípidos restantes. Por ejemplo, la liso-PS puede ser del 15 al 30 %. Siempre que se menciona un rango en esta divulgación, también se incluyen todos los valores dentro de ese rango. Según la invención, la relación molar de PC a liso-PS es de 90:10 a 60:40. En un ejemplo, solo la PS (parte o toda) está en forma de liso-PS, mientras que toda la PC tiene dos cadenas acilo. Todas las relaciones de fosfolípidos en esta divulgación son relaciones molares.

- 35 En un ejemplo, las estructuras lipídicas, tales como los liposomas, comprenden además ácido retinoide y/o rapamicina. Así, las estructuras lipídicas pueden comprender liso-PS, PC y ácido retinoide y/o rapamicina. La cantidad de ácido retinoico puede ser del 0,1 % en moles al 10 % en moles y todos los valores porcentuales hasta el décimo lugar decimal entre ellos. La cantidad de rapamicina puede ser del 0,1 % en moles al 10 % en moles y todos los valores porcentuales hasta el décimo lugar decimal entre ellos.

- 40 La PS y PC pueden tener independientemente de 1-22 átomos de carbono en cada una de las cadenas acilo. Por ejemplo, cuando el átomo de carbono es 0 para PS, la molécula es O-Fosfo-L-Serina (OPLS). Las cadenas acilo tienen de 1 a 22, de 2 a 22, de 6 a 22 o de 14 a 22 carbonos (y todos los números enteros de carbonos y rangos entre ellos). Las cadenas acilo pueden ser saturadas o insaturadas. La PC o PS pueden tener una o dos cadenas acilo. Así, la PS o PC puede ser liso-PS o liso-PC. Según la invención, PS es liso-PS, en donde la cadena acilo de liso-PS es ácido oleico.

- 50 En un ejemplo, al menos parte de la PS es liso PS, pero la PC no es liso-PC. En este ejemplo, todas las PC tienen dos cadenas acilo y al menos algunas PS tienen solo una cadena acilo. Por ejemplo, la relación PC:PS es de 90:10 a 60:40, y toda la PS es liso-PS. Por ejemplo, PC:liso PS puede ser de 85:15 a 65:35. En un ejemplo, la relación de PC:liso-PS puede ser 70:30. En un ejemplo, la liso-PS es del 15 al 50 % o del 15 al 35 %, siendo PC los fosfolípidos restantes. La liso-PS y PC pueden ser los únicos fosfolípidos presentes en la bicapa de los liposomas. El liso-fosfolípido total en los liposomas es preferiblemente inferior al 50 % del total de fosfolípidos porque si el porcentaje de liso-fosfolípidos es superior al 50 %, los liposomas no son estables. Los ejemplos en los que PS no es liso-PS que tiene ácido oleico como la cadena acilo no son según la invención.

- 55 La cadena acilo de liso PS está insaturada. Puede ser de 14 a 22 carbonos. Debe tener al menos un enlace doble. Según la invención, es 18:1. Puede tener 2 o 3 enlaces dobles, aunque se encontró que la estabilidad de los liposomas es mejor con un solo enlace doble que con 2 o 3 enlaces dobles. Sin embargo, se encontró que al menos un enlace doble era necesario para mejorar la efectividad.

- 60 Las cadenas acilo de la PC pueden tener de 12 a 22 carbonos. Las cadenas acilo tienen preferiblemente ambas la misma longitud y son saturadas. Se observó que una longitud de cadena de 14 (C14:0, dimiristoil-sn-glicero-3 fosfatidilcolina (DMPC)) era particularmente efectiva para proporcionar estabilidad a los liposomas. Cuando se usó una longitud de cadena de 18 (1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC)), se encontró que no era tan efectiva como DMPC.

Los presentes liposomas pueden comprender además fosfolípidos adicionales. Por ejemplo, cualquiera de los liposomas descritos en la presente memoria puede tener fosfatidiletanolamina. La cantidad de PS, parte o todo de la cual puede ser liso-PS, puede ser del 0 al 30 % en moles, la cantidad de PC puede ser del 0-30 % en moles y el resto puede ser PE. Por ejemplo, PS, parte o todo de la cual puede ser liso-PS, puede ser del 1 al 30 % en moles, PC puede ser del 1 al 30 % en moles y el resto puede ser PE.

Se encontró que los liposomas que comprenden liso PS como se describe en la presente memoria son más pequeños que los liposomas que comprenden solo PS (sin ninguna liso PS). Por ejemplo, después de la filtración a través de un filtro con un punto de corte de 0,2 micrómetros, el tamaño de los liposomas que contenían liso-PS (liposomas que contenían liso PS y PC) fue de aproximadamente 50-150 nm (aproximadamente el 90 % de los liposomas), mientras que el tamaño de los liposomas que contenían PS (PS + PC) fue de aproximadamente 200-400 nm (aproximadamente el 90 % de la población). Fue sorprendente que a pesar de que los liposomas liso PS son más pequeños que los liposomas PS, la carga no es tan negativa. El potencial zeta para los liposomas liso PS es de -10 a -17 en comparación con un potencial zeta de -24 a -33 para los liposomas PS, y de -17 a -26 para los liposomas de tamaño concordante. La carga menos negativa en los liposomas liso-PS puede permitir una mayor carga de proteínas. Por ejemplo, para los liposomas PS, una relación proteína:lipido típica es una relación molar de 1:10.000, pero para los liposomas liso-PS, la proteína podría cargarse y usarse en una relación molar de al menos hasta 1:5.000. Las proteínas se pueden cargar en los liso-liposomas en relaciones molares de 1:1.000 a 1:10.000 (y todas las relaciones intermedias).

Según la invención, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden liposomas. Por ejemplo, la composición puede comprender una pluralidad de liposomas descritos en la presente memoria en un vehículo adecuado. Un vehículo adecuado puede ser un tampón u otros vehículos o aditivos farmacéuticos, excipientes, estabilizadores o una combinación de los mismos. Por ejemplo, los liposomas se pueden formular en azúcares, almidones, alcohol cetílico, celulosa, tragacanto en polvo, malta, gelatina, talco, aceites, glicoles, monooleato de glicerol, polioles, polietilenglicol, alcohol etílico, emulsionantes adicionales y similares. Se pueden encontrar ejemplos de vehículos, excipientes y estabilizadores farmacéuticamente aceptables en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2005) 21ª Edición, Filadelfia, PA. Lippincott Williams & Wilkins.

La presente composición de cebado se puede formular para administración oral. La composición puede administrarse directamente en la localización deseada del tracto gastrointestinal usando una sonda. O puede formularse en forma de líquido, suspensiones, comprimidos (incluidos los comprimidos con recubrimiento entérico), geles, cápsulas, polvo o cualquier otra forma que pueda ingerirse. Las formulaciones pueden incluir vehículos farmacéuticos que se sabe que se usan para formulaciones orales. Las formulaciones pueden ser formulaciones pediátricas, que pueden incluir varios sabores y similares.

Las presentes composiciones son útiles no solo para inducir la tolerancia inmune, sino que también son útiles para reducir las titulaciones de anticuerpos de los anticuerpos existentes. Se observó que mientras los liposomas de PS (donde PS contenía dos cadenas acilo) eran efectivos cuando se administraban subcutáneamente en la inducción de tolerancia inmune, no eran efectivos si se administraban oralmente. Sin embargo, los liposomas que contenían liso PS fueron efectivos cuando se usaron oralmente. Esto fue sorprendente.

En un aspecto, esta divulgación proporciona una combinación para su uso en un método para inducir tolerancia inmune, en donde una primera composición (composición de cebado) se administra de forma continua, donde una o más dosis de una composición de cebado se administran de forma continua durante un período de tiempo, y se administra una segunda composición (terapéutica) de forma continua o según sea necesario superponiendo el régimen de administración de la primera composición. Por lo tanto, el régimen de administración de la primera composición puede implicar una administración sustancialmente regular, cuya administración puede ser, por ejemplo, diaria o semanal, u otra frecuencia, y puede administrarse por cualquier ruta. En una realización, la administración es a través de la ruta oral. Dicho régimen de administración puede llevarse a cabo durante semanas, meses o años. Los intervalos entre las administraciones consecutivas pueden ser iguales o diferentes, pero generalmente mantendrán la periodicidad de la administración.

En un aspecto, esta divulgación proporciona una combinación para su uso en un método para inducir tolerancia inmune frente a una proteína diana en un individuo que comprende proporcionar al individuo un primer régimen de administraciones múltiples de una composición de cebado (primera composición) durante un período de tiempo, por ejemplo, que se extiende más allá de al menos 4 semanas, en donde la composición de cebado comprende liposomas u otras partículas lipídicas que comprenden PC (tal como DMPC) y PS, en donde parte o la totalidad de la PS está presente como liso-PS. Esta divulgación también proporciona una combinación para su uso en un método de administración de una proteína terapéutica a un individuo que comprende proporcionar al individuo un primer régimen de administraciones múltiples de una composición de cebado (primera composición) durante un período de tiempo, por ejemplo, que se extiende más allá de al menos 4 semanas, en donde la composición de cebado comprende liposomas u otras partículas lipídicas que comprenden PC (tal como DMPC) y PS, en donde parte o la totalidad de la PS está presente como liso-PS, y en cualquier momento, mientras se continúa con el primer régimen, se proporciona al individuo un segundo régimen de una o más administraciones de una segunda

composición que comprende la proteína (en una cantidad terapéuticamente efectiva) libre de liposomas, o que comprende la proteína y los liposomas pero no en forma de complejo, o que comprende la proteína en complejo con liposomas que no contienen PS o liso-PS, o que comprende la proteína en complejo con algunos otros vehículos que no contienen PS ni liso-PS, por lo que no hay una respuesta inmunológica significativa, o la respuesta inmunológica frente a la proteína es menor que con una composición de cebado que comprende PS-liposomas (sin liso-PS) o con proteína libre. La segunda composición se puede iniciar después de 4-6 semanas de la primera composición o se puede iniciar antes de eso. La respuesta inmunológica puede medirse como titulaciones de anticuerpos específicos. Por lo tanto, ausencia de respuesta inmunológica significativa significa que no se detectan anticuerpos frente a la proteína en la sangre. Cuando la composición de cebado se administra regularmente y se inicia la administración de una segunda composición sin detener o interrumpir el régimen de administración de la composición de cebado, el programa general puede denominarse programa de administración continua. Por ejemplo, la primera composición se puede administrar durante aproximadamente 6 semanas (semanalmente) y continuar después durante semanas, meses o años, y la administración de la segunda composición se puede iniciar aproximadamente 4 a 6 semanas después del inicio del primer régimen y puede continuarse según sea necesario durante semanas, meses o años. El régimen de administración de la segunda composición se superpone con el régimen de la primera composición. Por superposición se entiende que los regímenes de administración se superponen; sin embargo, no es necesario administrar las dos composiciones al mismo tiempo. La administración de la segunda composición en esta divulgación puede denominarse "pulso o nuevo pulso". Una vez que se inicia la segunda composición, tanto la primera como la segunda composición pueden continuar administrándose siempre que se requiera la segunda composición terapéutica. Las administraciones de la primera composición y la segunda composición pueden realizarse con frecuencias adecuadas. Por ejemplo, diariamente, semanalmente, quincenalmente, etc., o cualquier frecuencia intermedia o superior.

La divulgación también proporciona una combinación para su uso en un método para proporcionar una proteína terapéutica a un individuo sin incitar una reacción inmune o incitando una respuesta inmune mínima, o incitando una respuesta inmune que sea inferior a la respuesta para liposomas PC:PS, comprendiendo dicho método administrar a un individuo una composición de cebado, que comprende la proteína en complejo con liposomas que comprenden liso-PS, y mientras continúa el régimen de administración de la primera composición, administrar al individuo una segunda composición que comprende solo la proteína (es decir, sin liposomas o fosfolípidos) o que comprende la proteína y los liposomas o fosfolípidos, pero no en forma de complejo, o que comprende la proteína en complejo con liposomas en los que la composición de fosfolípidos es diferente de la composición de fosfolípidos de la composición de cebado. Por ejemplo, la composición de los liposomas en la segunda composición puede estar libre de liso-PS y, opcionalmente, también libre de PS.

En una realización, la presente combinación para su uso en un método comprende administrar a un individuo una primera composición (también denominada en la presente memoria composición de cebado) que puede comprender una o más administraciones o dosis que comprenden una proteína diana (tal como una proteína terapéutica o de diagnóstico, un autoantígeno o un alérgeno) en complejo con liposomas que comprenden PS y PC (denominados en la presente memoria liposomas PS). Al menos parte de la PS puede estar presente como liso-PS. Por ejemplo, toda la PS puede estar presente como liso-PS. La primera administración puede continuar con una o más administraciones de la composición de cebado. Las composiciones de cebado se pueden administrar 1 vez por semana o más veces por semana. Por ejemplo, la composición de cebado se puede administrar una vez por semana o de dos a seis veces por semana o se puede administrar diariamente. La administración puede llevarse a cabo durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas y luego detenerse. Después de un período de tiempo adecuado que permite que se desarrolle la tolerancia inmune (tal como, por ejemplo, al menos 4 días después del último cebador), se puede administrar al individuo una segunda composición (una o más administraciones) que comprende la proteína o el péptido en forma libre, en complejo con liposomas o estructuras lipídicas que tienen una composición diferente a la composición primaria, o en complejo (covalente o no covalentemente) con PEG, o tensioactivos o microesferas y similares.

Por ejemplo, al individuo se le puede administrar la segunda composición después de 4 a 30 días, incluidos todos los números enteros de días y los intervalos entre ellos, de la última administración de la composición de cebado. Por ejemplo, al individuo se le administra la segunda composición después de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 días de la última administración de la última composición de cebado. Se divulgan formulaciones menos inmunogénicas en las patentes y solicitudes de patente de EE. UU. no. 7.351.688; 7.875.288; 7.875.289; 7.625.584; 20090053297; PCT/US2010/041196.

Esta invención se puede usar para cualquier individuo (p. ej., un ser humano o un mamífero no humano). Por ejemplo, las presentes composiciones se pueden administrar a un individuo al que se le haya administrado previamente la proteína o el péptido, pero que no ha desarrollado previamente intolerancia inmune. El individuo puede o no mostrar indicios de una intolerancia inmune reciente. También es útil para la administración a individuos sin exposición previa (es decir, aquellos individuos a los que no se les ha administrado previamente la proteína o el péptido). La intolerancia inmune, tal y como se usa en la presente memoria, significa que el individuo debe tener una producción de anticuerpos mensurable (mediante métodos estándar tales como ELISA o ensayos de actividad). Por el contrario, una falta de intolerancia inmune significa que el individuo no tiene anticuerpos mensurables. Los

anticuerpos pueden medirse después de la exposición a o administración de la forma libre de la proteína después de que un individuo haya sido "tolerizado". El término tolerizado tal y como se usa en la presente memoria significa la administración de una o más dosis de la composición de cebado y un período de tiempo adecuado (tal como de 4 a 30 días) para que un individuo desarrolle tolerancia inmune. El desarrollo de tolerancia inmune frente a la proteína diana también puede identificarse determinando la expresión regulada a la baja de señales coestimuladoras en las células dendríticas, la disminución de la proliferación de células T CD4+ y la secreción inducida de citoquinas inmunorreguladoras, TGF- β e IL-10. Uno o más de estos identificadores pueden evaluarse en condiciones de cultivo. El desarrollo de la tolerancia inmune es específico de la proteína frente a la que se induce la tolerancia (es decir, la proteína en complejo con los liposomas de la composición de cebado).

La composición de cebado se puede administrar durante hasta varias semanas. Como ejemplo, la composición de cebado se puede administrar durante 4 semanas. La frecuencia de la administración oral de la composición de cebado (tal como los liposomas proteína-liso PS) puede ser una vez por semana o más durante cuatro semanas. También se pueden usar más dosis de proteína-liso PS.

Las composiciones de cebado y la segunda composición pueden administrarse independientemente por cualquier ruta estándar, tal como intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, mucosal, subcutánea, transdérmica, intradérmica, oral y similares.

La composición de fosfolípidos de los liposomas o estructuras lipídicas en la segunda composición (que puede ser una composición terapéutica) puede ser igual o diferente de la composición de fosfolípidos de los liposomas de la primera composición (que es una composición de cebado).

Las presentes composiciones pueden usarse no solo para inducir tolerancia inmunológica específica frente a un antígeno, sino también para revertir anticuerpos establecidos. Por ejemplo, si un individuo muestra titulaciones elevadas frente a un antígeno, la administración de los presentes liposomas de liso-PS puede llevarse a cabo para reducir las titulaciones de anticuerpos. La reversión de los anticuerpos establecidos se observó sólo con liposomas de liso-PS y no con liposomas de PS. Esto fue sorprendente. El grupo tratado con tampón recibió cuatro inyecciones de FVIII de manera similar a otros grupos, pero durante la inmunización recibieron tampón. Observamos una reducción en las titulaciones para el grupo Liso PS que es menor que este grupo de control de tampón, lo que sugiere que el grupo Liso no solo evitó la formación de nuevos anticuerpos, sino que redujo los anticuerpos existentes. Preferiblemente, la liso PS oral con tratamiento con antígeno continuaría cuando se reanude el nuevo pulso con antígeno libre.

Las presentes composiciones se pueden administrar a individuos que necesitan inducir tolerancia inmunológica. Estos pueden ser individuos que nunca han estado expuestos al antígeno, o pueden administrarse a individuos que exhiben anticuerpos frente al antígeno. Por ejemplo, los individuos pueden exhibir titulaciones elevadas de anticuerpos frente al antígeno. Las presentes composiciones no solo pueden inducir tolerancia inmunológica, sino que también pueden reducir los anticuerpos existentes. En una realización, se puede ensayar primero a un individuo para determinar la presencia de anticuerpos específicos frente a un antígeno (tal como mediante un inmunoensayo, tal como ELISA), y si se encuentra que el individuo exhibe titulaciones de anticuerpos, entonces se puede administrar al individuo un régimen del antígeno incorporado en liposomas liso-PS.

Un régimen adecuado de un antígeno en complejo con liposomas liso-PS comprende típicamente administraciones múltiples (tales como administraciones semanales, p. ej., una por semana durante 4 semanas) de los liposomas de antígeno-liso-PS, que luego puede ser seguido por la administración del antígeno no en complejo con los liposomas liso-PS. Una composición en la que el antígeno no forma complejos con liposomas liso-PS puede estar libre de liposomas, o puede comprender el antígeno en complejo con liposomas que no contienen liso-PS, o puede comprender liposomas, pero no en complejo con el antígeno.

En los presentes estudios, solo PS, pero no PG o PC de carga concordante, indujo una capacidad de respuesta baja después de su preexposición y reexposición con proteína libre. Por lo tanto, la presencia de PS es crítica para la capacidad de las nanopartículas basadas en lípidos para inducir tolerancia. También mostramos que la administración de anticuerpos anti-TIM-4 en presencia de FVIII revirtió el efecto tolerizante de PS, lo que sugiere que el receptor de TIM-4 está implicado en la tolerancia. Además, se encontró que un fosfolípido de cadena única era útil solo con respecto a PS. La liso PC no aumentó la producción de citoquinas reguladoras y, por lo tanto, preferiblemente no se usa liso-PC. Encontramos que solo la presencia de liso-PS 18:1, pero no de 16:0, reducía el tamaño de los liposomas y, por lo tanto, la longitud de la cadena y la insaturación son críticas para la reducción del tamaño. Debido a que el tamaño de las nanopartículas que contenían liso 18:1 era más pequeño, esperábamos que la liso 18:1 aumentaría la densidad de carga de las nanopartículas en comparación con los liposomas de PS convencionales. Sorprendentemente, las nanopartículas que contenían liso PS 18:1 mostraron menos carga negativa en comparación con otros controles y no aumentaron la densidad de carga. Los presentes datos también muestran que la preexposición a través de la ruta oral de proteína en complejo con liposomas de liso-PS 18:1 indujo una mejor tolerancia inmunológica en comparación con las proteínas en complejo con liposomas de PS 18:1 (dos cadenas en PS), y en comparación con la composición natural de PS. (p. ej., del cerebro, que es principalmente una mezcla de 18:1 y 18:0). Por lo tanto, una sola cadena con insaturación parece ser crítica, pero

no está dirigida por la densidad de carga como se esperaba. Las características biofísicas incluyen un tamaño en el rango de 50-150 nm, con un potencial zeta de aproximadamente -10 a -15 mV. Los liposomas de PS convencionales que contenían PS de doble cadena mostraron un tamaño medio de 200 nm con un potencial zeta de -30 mV, mientras que los liposomas convencionales de doble cadena extruidos a un tamaño en el rango de 50-150 nm mostraron un potencial zeta de aproximadamente -20 mV. Se ensayaron comparaciones adicionales de PS de cadena doble con liso PS, dos rutas diferentes de administración de la primera composición, ruta sc y oral. Tanto los liposomas de liso-PS como de PS indujeron tolerancia cuando se administraron a través de la ruta sc, pero la liso-PS fue más efectiva a través de la ruta oral en comparación con los liposomas de PS convencionales.

Además, también se intentó la duración de la administración oral continua en comparación con la administración de cuatro semanas. Después de la administración sc, cuatro inyecciones semanales fueron suficientes para inducir una capacidad de respuesta baja, pero después de la ruta oral, cuatro inyecciones semanales fueron inefectivas. La alimentación oral continua fue muy efectiva para las nanopartículas de liso PS 18:1 y la mayoría de los animales no mostraron ninguna titulación mensurable.

A continuación, se proporcionan algunos ejemplos de realizaciones específicas.

Una composición que comprende una pluralidad de liposomas, en donde los liposomas comprenden fosfatidilcolina (PC) y lisofosfatidilserina (liso-PS), en donde la relación de PC a liso-PS es de 90:10 a 60:40. La cadena acilo de la liso-PS es ácido oleico (18:1). La relación de PC a liso-PS puede ser de 85:15 a 70:30. La PC puede estar presente como dimiristoil-sn-glicero-3 fosfatidilcolina (DMPC). El tamaño de los liposomas es de 80 a 150 nm (90 % de la población). El potencial zeta de los liposomas es de -10 a -15. Los liposomas pueden formar complejos con un polipéptido antigénico, tal como, por ejemplo, FVIII, GAA, péptido MOG, gliadina, insulina, proteína de la cápside de AAV, otras proteínas de la cápside, colágeno y similares. La PC y liso-PS pueden ser los únicos fosfolípidos presentes en la bicapa del liposoma. La composición puede comprender además ácido retinoico en donde la relación de PC, PS y ácido retinoico es de 70:20:10 a 70:29:1, o rapamicina en donde la relación de PC, PS y rapamicina es de 70:20:10 a 70: 29:1.

Una combinación para su uso en un método para inducir tolerancia inmune frente a una proteína diana en un individuo que comprende: a) proporcionar al individuo un primer régimen de administraciones múltiples durante un período de al menos 6 semanas de una primera composición que comprende los liposomas de la reivindicación 1 en complejo con una proteína diana; y b) mientras se continúa con el primer régimen, proporcionar al individuo un segundo régimen de una o más administraciones de una segunda composición que comprende el antígeno libre de liposomas. El segundo régimen puede iniciarse al menos 4 semanas después del inicio del primer régimen. Los liposomas de la primera composición pueden comprender PC:liso-PS en una relación de 85:15 a 70:30. Toda la PC puede ser dimiristoil-sn-glicero-3 fosfatidilcolina (DMPC). La cadena acilo de la liso-PS es ácido oleico. La proteína diana puede ser una proteína terapéutica, una proteína de diagnóstico, un autoantígeno, un neoantígeno o un alérgeno. El régimen de administración de la primera composición puede continuar durante al menos 9 semanas antes del inicio del segundo régimen. La administración múltiple de la primera composición se puede realizar semanalmente.

Una combinación para su uso en un método para inducir tolerancia inmune frente a una proteína diana en un individuo que comprende: a) proporcionar al individuo un primer régimen de administraciones múltiples durante un período de al menos 6 semanas de una primera composición que comprende los liposomas de la reivindicación 1 en complejo con una proteína diana; y b) mientras se continúa con el primer régimen, proporcionar al individuo un segundo régimen de una o más administraciones de una segunda composición que comprende el antígeno y liposomas que no contienen liso-PS, en donde el segundo régimen se inicia al menos 4 semanas después del inicio del primer régimen.

El siguiente ejemplo se proporciona con fines ilustrativos y no pretende ser limitativo.

Ejemplo 1 (los ejemplos en los que PS es liso-PS de cadena única 18:1 son según la invención)

Este ejemplo describe liposomas que contienen PS con fosfatidiletanolamina. Los liposomas PS/PC reducen la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas como resultado de la exposición del grupo PS al exterior. En este estudio, se incorpora PE en la formulación de los liposomas para determinar si aumenta la exposición de PS.

La PC y PE tienen una carga neta neutra en sus grupos de cabeza, mientras que PS tiene una carga neta negativa. Por lo tanto, si hay más grupos de cabeza PS expuestos en el exterior de los liposomas, su exterior estaría más cargado negativamente. Para determinar la carga en la superficie de los liposomas PS/PC/PE, se realizó un estudio de potencial zeta. Los datos muestran que la carga en la superficie de los liposomas PS/PC/PE disminuye en función de la PE (Tabla 1).

Tabla 1

	30PS - 70PC - 0PE	29PS - 68PC - 3PE	26PS - 62PC - 12PE
--	-------------------	-------------------	--------------------

Potencial Zeta Promedio (mV)	-17,1	-20,4	-27,4
------------------------------	-------	-------	-------

La tabla muestra que las partículas son estables. La exposición de PS en el velo de la membrana externa es importante para la inducción de la tolerancia inmune.

- 5 Dado que PS tiene carga negativa, proporciona una carga a la partícula lipídica. El rango de potencial zeta para las presentes partículas puede ser de -1 a -35. Por ejemplo, el potencial zeta puede ser de -15 a -30.

Ejemplo 2

- 10 Este ejemplo proporciona una descripción de los métodos usados en los siguientes ejemplos.

Métodos

- 15 **Materiales.** La dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), la fosfatidilserina de cerebro porcino (PS) y la lisofosfatidilserina (Liso-PS) se adquirieron en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). El factor VIII (FVIII) humano recombinante de longitud completa fue una generosa donación del Hemophilia Center of Western New York (Búfalo, NY). La alfa-glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) fue proporcionada por Genzyme Corporation (Cambridge, Massachusetts). La MOG₃₅₋₅₅ de ratón se adquirió en AnaSpec Inc. (Fremont, CA). Todos los disolventes y sales tampón, así como el adyuvante incompleto de Freund y H37RA de Mycobacterium tuberculosis se obtuvieron de Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). La toxina pertussis (PTX) se adquirió en List Biological Laboratories Inc. (Campbell, CA). El anticuerpo frente a TIM-4 murino se adquirió en BioLegend (San Diego, CA). El anticuerpo monoclonal anti-FVIII ESH8 se obtuvo en American Diagnostica Inc. (Greenwich, CT). Los reactivos para el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) se adquirieron en Diagnostica Stago (Parsippany, NJ). El plasma humano normal combinado y deficiente se adquirió en Precision Biologic (Dartmouth, Canadá). El anticuerpo Ig anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina se adquirió en Southern Biotech (Birmingham, AL). El sistema de sustrato p-nitrofenilfosfato (pNPP) se adquirió en KPL Inc. (Gaithersburg, MD). El anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante y el sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) se adquirieron en Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri). El Kit Endosafe Endochrome-K® se adquirió en Charles River Laboratories (Charleston, SC). Las placas NUNC MaxiSorp de 96 pocillos se adquirieron en Thermo Scientific (Waltham, MA).

- 20 **Animales.** Ratones con inactivación génica de FVIII: Una colonia de ratones hemofílicos con una delección dirigida en el exón 16 del gen del Factor VIII, así como proteína fluorescente verde (GFP) incorporada al gen FoxP3 (denominados ratones GFP-FoxP3 HA) se mantuvo en el sitio. Este modelo animal permite rastrear fácilmente la expresión de las células T reguladoras FoxP3⁺ (T_{reg}) debido a que la GFP se introduce en el gen FoxP3 en el modelo de la enfermedad. Todos los experimentos con animales se realizaron bajo la aprobación y siguiendo las pautas del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de la Universidad de Búfalo.

- 25 **Preparación de Liposomas.** Se prepararon liposomas de PS y Liso-PS en una relación molar de 30:70 de PS o Liso-PS a DMPC. Después de la rehidratación con tampón Tris, los liposomas se extruyeron varias veces a través de membranas de policarbonato de 200 nm de doble apilamiento usando un extrusor de alta presión. El tamaño de los liposomas se confirmó usando un analizador de tamaño de partículas NICOMP Modelo CW380 de Particle Sizing Systems (Port Richey, FL). El contenido de lípidos se confirmó usando un ensayo de fosfato. La relación de proteína a lípido usada fue de 1:10.000 para experimentos que usan antígenos proteicos. Los antígenos se asociaron con los liposomas mediante incubación a 37 °C durante 30 minutos. Se ensayó el nivel de endotoxinas de todas las formulaciones usando un ensayo de amebocitos de Limulus de Charles River Laboratories (Charleston, SC) y se confirmó que eran negativas para endotoxinas antes de la inyección.

- 30 **Determinación de anticuerpos antifármaco.** Las titulaciones de anticuerpos antiproteína totales se determinaron mediante ELISA. Las titulaciones inhibitoras de anti-FVIII se analizaron mediante un ensayo aPTT siguiendo el ensayo Bethesda modificado de Nijmegen y se expresaron en unidades Bethesda (BU/mL). Las titulaciones totales de IgG anti-Ova se determinaron mediante ELISA. Las placas de 96 pocillos se recubrieron con 2 µg/mL de Ova en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron y bloquearon con albúmina de suero bovino al 5 % en PBS durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se lavaron las placas y se añadieron a la placa diluciones en serie de 3 veces de muestra de plasma y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las titulaciones se determinaron usando un punto de corte estadísticamente significativo de animales tratados de forma simulada.

- 35 **Análisis Estadístico.** Se realizó ANOVA unidireccional seguido del análisis post-hoc de Tukey o la prueba t de dos muestras no pareadas como se indica usando GraphPad Prism (La Jolla, CA). Se consideraron estadísticamente significativos los valores $P < 0,05$.

Tolerancia Oral. Se usaron ratones HA con edad concordante y sexo concordante con $n = 7$ por grupo de tratamiento. Cada animal recibió 0,4 µg de FVIII en tampón Tris (NaCl 150 mM, Tris 25 mM, pH 7,0). Se usó una

relación molar proteína:lipido de 1:10.000. Los animales recibieron la administración oral de 0,4 µg de FVIII en presencia y ausencia de varias formulaciones de liposomas desde las semanas 1-9, y recibieron una inyección IV a través de la vena de la cola de 0,4 µg de FVIII 24 horas después de la administración oral en las semanas 6-9. Las formulaciones de liposomas incluyen una relación molar 30:70 de PS:PC, una relación molar 15:15:70 de PS:Liso-PS:PC y una relación molar 30:70 de Liso-PS:PC. Un grupo de animales recibió tampón como control de inmunización. Después de un periodo de descanso de dos semanas, todos los animales se sacrificaron y se recogió el plasma para su análisis.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe la inducción continua de tolerancia frente a un antígeno. Se usaron ratones machos y hembras con inactivación génica (n=7) por grupo. Se usaron 0,4 µg de FVIII en tampón Tris (NaCl 150 mM, TRIS 25 mM, pH 7,0), libre de endotoxinas. La relación de proteína a lipido fue de 1:10.000. Las inmunizaciones se realizaron por sonda oral o por ruta subcutánea. El nuevo pulso (es decir, la administración de una segunda composición) se realizó por la ruta iv, 24 horas después de las inmunizaciones. Los diferentes grupos de tratamiento fueron: FVIII libre, FVIII PS, FVIII liso-PS al 15 % (liso-PS:PS:PC 15:15:70), FVIII liso-PS al 30 % (liso-PS:PC 30:70). El esquema se muestra en la Figura 1.

Los resultados se muestran en las Figuras 2 y 3. La Figura 2 muestra la administración oral de la primera composición, mientras que la Figura 3 muestra la administración subcutánea de la primera composición. Como puede verse en las figuras, mientras que tanto PS como liso-PS pudieron inducir tolerancia cuando las composiciones se administraron a través de la ruta subcutánea (Figura 3), solo liso-PS pudo inducir tolerancia a través de la ruta oral (Figura 2). Además, liso-PS al 30 % fue más efectiva para inducir tolerancia que al 15 %.

Cuando las composiciones de PS y liso-PS se administraron a través de la ruta oral para la primera composición, pero no de forma continua y se volvieron a pulsar a través de la ruta iv, no se observó la ventaja observada con liso-PS con administración continua. El esquema de este experimento se muestra en la Figura 4 y los resultados se muestran en la Figura 5. Al comparar los resultados de la Figura 5 con los resultados de la Figura 2, se puede ver que para aprovechar todas las ventajas vistas con liso-PS, las composiciones de cebado se administran preferiblemente de forma continua, mientras se superponen con la administración de la segunda composición.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe la reversión de las titulaciones de anticuerpos establecidos tras la administración de composiciones de liso-PS.

Estudio de Reversión. Se usaron ratones HA con edad concordante y sexo concordante con n = 14 por grupo de tratamiento. Cada animal recibió 0,4 µg de FVIII en tampón Tris (NaCl 150 mM, Tris 25 mM, pH 7,0) que estaba libre de endotoxinas. Se usó una relación molar proteína:lipido de 1:10.000. Los animales recibieron 0,4 µg de FVIII subcutáneamente una vez por semana durante 4 semanas para inducir las titulaciones. Una semana después de la última inyección, todos los animales recibieron 0,4 µg de FVIII en presencia o ausencia de liposomas PS y Liso-PS mediante inmunización oral una vez por semana durante cuatro semanas. Un grupo de animales fue inmunizado con tampón solo como control. Se sacrificó un grupo de animales (n=6) en la semana 5 para obtener titulaciones en la línea base. Una semana después de la última alimentación forzada oral, se sacrificó la mitad de los animales de cada tratamiento (n=7) y se recogió el plasma para su análisis. Todos los animales restantes reciben 0,4 µg de FVIII IV a través de la vena de la cola una vez por semana durante cuatro semanas para la reexposición. Después de un periodo de descanso de dos semanas, se sacrificaron todos los animales; el plasma se recogió el para análisis de titulaciones anti-FVIII totales y titulaciones neutralizantes.

El esquema para este ejemplo se ilustra en la Figura 6 y los resultados se muestran en la Figura 7. Mientras que los liposomas de PS no pudieron dar como resultado ninguna reducción estadísticamente significativa en los anticuerpos establecidos, los liposomas de liso-PS pudieron reducir significativamente la titulación de los anticuerpos establecidos.

Ejemplo 5

Este ejemplo describe la especificidad para la inducción de la tolerancia inmune.

Estudio de Inmunogenicidad. La inmunogenicidad relativa de liso-PS-FVIII y su capacidad para inducir tolerancia se evaluó en ratones HA. Se pretrataron ratones HA (n= 8/grupo) con una dosis subterapéutica de 1 µg de antígeno por la ruta subcutánea (SC) u oral en presencia y ausencia de PS una vez por semana durante cuatro semanas. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones se volvieron a pulsar con 1 µg de antígeno libre SC o iv una vez por semana durante siete semanas. Se tomó una muestra de sangre para seguir el desarrollo de anticuerpos. Dos semanas después del último nuevo pulso, se sacrificaron todos los ratones y se recogió el plasma mediante punción cardíaca en una solución de dextrosa de citrato ácido al 10 % v/v. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta el análisis adicional.

Estudio de Inmunogenicidad de Especificidad del Antígeno FVIII

Se realizaron estudios en animales en ratones GFP-FoxP3 HA. Se inmunizaron ratones (n=21/grupo) con cuatro inyecciones SC semanales de 0,4 µg de FVIII en presencia y ausencia de Liso-PS. Dos semanas después de la última inyección, se sacrificaron 7 animales por grupo y se recogieron muestras de plasma como muestras de línea base para el análisis de la inmunogenicidad relativa de las titulaciones de anticuerpos. A la mitad de los animales restantes en cada grupo de tratamiento se les volvió a pulsar con dos inyecciones SC semanales de 0,4 µg de FVIII libre, mientras que a los otros animales se les volvió a pulsar con dos inyecciones SC semanales de 0,4 µg de Ovalbúmina (Ova). Dos semanas después del último nuevo pulso, se sacrificaron todos los ratones y se recogió el plasma mediante punción cardíaca en una solución de dextrosa de citrato ácido al 10 % v/v. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta el análisis adicional.

Los esquemas para estos experimentos se muestran en las Figuras 8 y 10, y los resultados se muestran en las Figuras 9 y 11. Estos resultados muestran que la especificidad para la tolerancia inmune para la proteína se observa con liso-PS tanto para la ruta subcutánea como para la ruta oral.

Ejemplo 6

Papel del Estudio de Inmunogenicidad de TIM-4. Se realizaron estudios en animales en ratones GFP-FoxP3 HA. Se inmunizaron ratones (n=12-14/grupo) con cuatro inyecciones SC semanales de 0,4 µg de FVIII en presencia y ausencia de PS y liso-PS. El grupo de ratones que recibió PS y liso-PS recibió inmunización SC con 15 µg de un anticuerpo anti-TIM-4 que bloquea la función. Treinta minutos después de la administración del anticuerpo anti-TIM-4, los ratones de estos grupos recibieron una inyección SC de PS-FVIII (0,4 µg) y liso-PS Factor VIII muy cerca del anticuerpo anti-TIM-4 administrado. Después de un período de descanso de dos semanas, se sacrificó la mitad de los animales de cada grupo y se recogieron muestras de plasma como muestras de línea base para el análisis de la inmunogenicidad relativa de las titulaciones de anticuerpos. Todos los animales restantes se volvieron a pulsar con dos inyecciones SC semanales de 0,4 µg de FVIII libre solo. Dos semanas después del último nuevo pulso, se sacrificaron todos los ratones y se recogió el plasma mediante punción cardíaca en una solución de dextrosa de citrato ácido al 10 % v/v. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta el análisis adicional. Los animales que recibieron PS o liso PS exhibieron titulaciones de anticuerpos más bajas en comparación con los animales que recibieron FVIII libre. Sin embargo, la administración del anticuerpo frente a TIM-4 revirtió el efecto de los efectos mediados por PS/Liso, lo que sugiere la implicación de este receptor. También son posibles receptores adicionales y receptores únicos para PS y Liso.

Ejemplo 7

Este ejemplo describe las características biofísicas de los liposomas que contienen Liso-PS en comparación con los liposomas de PS convencionales. La respuesta inmune indeseable frente a las proteínas terapéuticas es una de las principales complicaciones clínicas de la terapia basada en proteínas. Se investigaron diferentes estructuras de la cadena acilo de la PS, tales como la longitud de la cadena, el grado de saturación y el número de cadenas, para determinar las contribuciones al efecto tolerogénico de la PS. Se encontró que los liposomas de liso-PS eran de un tamaño mucho más pequeño en comparación con los liposomas de PS, a pesar del procedimiento de preparación similar. Debido al pequeño tamaño, se esperaba que los liposomas de liso PS tuvieran una mayor densidad de carga superficial en comparación con los liposomas de PS. Por lo tanto, se investigó la carga superficial de los liposomas PS y Liso PS mediante la medición del potencial zeta. Incluso cuando se extruyeron a través de una membrana de filtro de 200 nm, los liposomas de liso-PS tenían un tamaño medio de partícula mucho más pequeño (106,9 nm) en comparación con los liposomas de DMPC y PS preparados con la misma membrana de filtro (194,4 y 162,4 nm, respectivamente) (Tabla 2 y Figura 12). Con el fin de tener una mejor caracterización y comparación en términos de carga superficial entre los liposomas PS y Liso PS con respecto al tamaño, el tamaño de los liposomas PS se comparó con Liso-PS usando una membrana de filtro de 80 nm. Se informó que el tamaño medio de partícula de estos liposomas PS era de 117,2 nm. Se observó que el liposoma PS extruido a través de una membrana de filtro de 200 nm tenía la mayor magnitud de potencial zeta, $-28,9 \pm 3,0$ mV. Sin embargo, sorprendentemente, el potencial zeta del liposoma PS de 80 nm y del liposoma Liso PS de 200 nm fue significativamente menor ($-19,5 \pm 4,6$ mV y $-12,4 \pm 2,7$ mV, respectivamente). Como el potencial zeta mide el potencial electrostático entre las cargas de la capa difusa en lugar de la carga superficial real de la partícula, la presencia de una alta concentración de sal en el disolvente tampón puede ocultar posiblemente la orientación de los iones dentro de la capa difusa, enmascarando así la verdadera carga superficial de las vesículas. Se realizó un intento de eliminar los iones del disolvente reemplazando el tampón Tris con agua desionizada. No obstante, todavía se observó que el potencial zeta del liposoma Liso PS era menor que el del liposoma PS con tamaño concordante ($-40,3 \pm 2,2$ mV frente a $-75,7 \pm 5,2$ mV) (Figura 13). Esto sugiere que la reducción del tamaño de las partículas puede no conducir directamente a una mayor carga superficial y que el efecto tolerogénico de Liso PS puede no deberse a la elevada carga superficial de la vesícula.

Tabla 2

Muestras	Tamaño de la membrana del filtro (nm)	Tamaño medio de partícula (nm)	SD
DMPC (100 %)	200	194,4	26,59
PS al 30 % (PC:PS 70:30) PS del cerebro (principalmente 18:1 y 18:0)	200	162,4	4,383
PS al 30 % (PC:PS 70:30) PS del cerebro (principalmente 18:1 y 18:0)	80	117,2	18,80
Liso al 30 % (PC: liso-PS 70:30) (liso PS es 18:1 de cadena única)	200	106,9	6,945
18:1 al 30 % (PC:PS 70:30), PS es 18:1 purificado, cadena doble	200	202	7,1
Liso al 30 % (PC: liso-PS 70:30) (liso PS es 16:0 de cadena única)	200	213,8	4,02

Ejemplo 8

Este ejemplo describe partículas que contienen Liso PS. Además del tamaño y el potencial zeta, se investigó la estabilidad, así como las propiedades de fase del liposoma Liso-PS y otras partículas lipídicas tolerogénicas novedosas que contienen Liso-PS usando calorimetría de barrido diferencial (DSC) y mediciones de anisotropía de fluorescencia dependientes de la temperatura. Para el liposoma DMPC-Liso PS, se prepararon cuatro grupos de liposomas que contenían DMPC y Liso PS con la composición porcentual en moles de DMPC:Liso PS como 100:0, 90:10, 80:20 y 70:30 usando el método de la película seca. Estas películas lipídicas se rehidrataron luego en PBS a la temperatura de 37 °C. Dado que DMPC era el lípido base, el grupo con la composición de 100:0 se usó como control positivo. La concentración de lípidos totales de todos los grupos se mantuvo a 40 mM. Para la medición de DSC, se empaquetaron 15 µL de cada preparación de liposomas en una bandeja de aluminio y se sellaron con una cubierta usando un corrugador. Se usó una bandeja de referencia con la misma cantidad de agua. Las muestras se escanearon de 5 a 40 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min bajo un flujo de N₂ de 20 ml/min, y el tiempo de equilibrado de las muestras se fijó en 3 minutos a 5 °C antes de cada escaneo.

Para la observación visual, a medida que aumentaba el porcentaje molar de liso Ps en el liposoma, disminuía la turbidez de la muestra. Esto podría deberse a la reducción del tamaño de las vesículas a medida que los fosfolípidos se asemejan a sí mismos en la estructura de bicapa. Como se muestra en la Figura 14A, el liposoma de DMPC de control mostró un pico de transición principal a 23 °C y un pico de pretransición amplio a 15 °C. A medida que aumentaba el porcentaje molar de liso PS en la composición, disminuía el área del pico y también desaparecía la fase de pretransición. Además, el pico se desplazó a una temperatura más baja. En la composición de 70:30, solo se observó una pequeña protuberancia en la curva de DSC. Esto sugiere que DMPC y liso PS son miscibles a este 70:30 por ciento en moles y la separación de fases es mínima.

Esta observación se confirmó además mediante estudios de polarización de fluorescencia. La composición liposomal se marcó con difenilhexatrieno DPH y se midió la polarización de la fluorescencia en función de la temperatura. Para DMPC, la polarización/anisotropía fue mayor a temperaturas más bajas, tales como 15 °C, cuando la formulación existe en fase de gel, pero disminuye a medida que experimenta la transición (Figura 14B). El punto medio de transición se centra alrededor de 23 °C similar al observado con DSC. Pero la adición de liso-PS mostró un desplazamiento en la transición a temperaturas más bajas similar al observado en los estudios de DSC. Estas observaciones muestran que DMPC y liso PS son estables donde los dos componentes son miscibles.

Ejemplo 9

Este ejemplo proporciona una comparación entre liposomas que contienen PS de doble cadena y de cadena única. Las medidas de anisotropía y DSC se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 8 anterior. Los resultados se muestran en la Figura 15A y 15B. Como está claro sobre la base de los estudios de DSC, el análisis de tamaño y potencial zeta y los estudios de anisotropía, el efecto de doble cadena 18:1 es más pronunciado en términos de propiedades de fase de 18:1, pero la liso induce una curvatura que probablemente conduce a un tamaño pequeño.

Ejemplo 10

Este ejemplo describe liposomas que contienen DMPC-liso PS-ácido retinoico o rapamicina. Las propiedades de fase de los liposomas que contienen DMPC-liso PS-Ácido retinoico (RA) o rapamicina se investigaron usando DSC.

Método:

Para el liposoma de DMPC-Liso PS-Ácido retinoico, se prepararon cuatro grupos de liposomas que contenían DMPC, Liso PS y RA con la composición de porcentaje en moles de DMPC:Liso PS:RA como 70:30:0, 70:29:1, 70:27:3 y 70:25:5. Además, también se preparó una muestra de liposomas que contenía solo DMPC y RA con una

composición de porcentaje en moles de 95:5 para investigar más a fondo las propiedades de fase, así como la intercalación de RA en la estructura de bicapa de DMPC. Todas las muestras se prepararon usando el método de película seca y estas películas lipídicas luego se rehidrataron en PBS a la temperatura de 37 °C. Se usó DMPC como lípido base y el grupo DMPC:Liso PS:RA con la composición de 70:30:0 se usó como control positivo. La concentración de lípidos totales de todos los grupos se mantuvo a 40 mM. También se incluyó una muestra antigua de DMPC 40 mM del estudio de DSC anterior sobre DMPC: Liso PS con fines de referencia y comparación. Para la medición de DSC, se empaquetaron 15 µL de cada preparación de liposomas en una bandeja de aluminio y se sellaron con una cubierta usando un corrugador. Se usó una bandeja de referencia con la misma cantidad de agua. De manera similar al estudio de DSC anterior sobre DMPC y Liso PS, dado que el lípido base era DMPC, las muestras se escanearon de 5 a 40 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min bajo un flujo de N₂ de 20 ml/min. El tiempo de equilibrado de las muestras se fijó en 3 minutos a 5 °C antes de cada escaneo.

El termograma de DSC para liposomas que comprenden tanto Liso-PS como RA muestra que el pico de transición principal de las vesículas de DMPC puro se produjo a alrededor de 23 °C, cuando la estructura lipídica lamelar experimentó una transición de fase de gel a cristalino líquido. La inclusión de 10, 20 y 30 % en moles de Liso-PS en la bicapa dio como resultado la ampliación y el desplazamiento del pico de transición de DMPC a una temperatura más baja. Esto sugiere que Liso-PS se dividió en la bicapa e indujo cambios en las propiedades lamelares de DMPC. En presencia de 30 % en moles de liso-PS, el pico se eliminó casi por completo, lo que indica la cooperación del sistema mixto ya que no se produjo separación de fases. Esto indica además que la estabilidad de la vesícula DMPC:Liso-PS era ideal en una relación molar de 70:30. De manera consistente con los datos obtenidos de DSC, los valores de anisotropía de los liposomas marcados con DPH también mostraron que la adición de una concentración creciente de Liso-PS en la bicapa de DMPC introdujo un desplazamiento y una ligera ampliación de la fase de transición a una temperatura más baja. Esto sugiere que Liso-PS se dividió en la bicapa de DMPC e indujo la formación de fase fluida de la vesícula a una temperatura más baja (Figura 16A). De manera similar a la adición de Liso-PS en la bicapa de DMPC, la adición de RA solo también dio como resultado la ampliación y el desplazamiento del perfil de fusión de DMPC a una temperatura más baja en el termograma de DSC y la curva de valor de anisotropía. Esto indica que RA se dividió en la región de la cadena acilo e indujo la formación de fase fluida cuando se introdujo en la bicapa de DMPC (Figura 16A). Aunque la inclusión de Liso-PS o RA produjo una ampliación y un desplazamiento de la transición de fase de DMPC a una temperatura más baja, la mezcla de Liso-PS y RA en una relación molar de 70:30:5 (DMPC:Liso-PS:RA) juntos suprimió por completo la transición de fase de DMPC tanto en el termograma de DSC (Figura 16A) como en la curva de valor de anisotropía (Figura 16B). Esto ilustra que ambos componentes se dividieron en la bicapa de DMPC, cambios inducidos sinérgicamente pero no se produjo separación de fases. La reducción de la intensidad de la anisotropía de fluorescencia en presencia de PS, Liso-PS y RA en comparación con el liposoma de DMPC de control también representó la rotación libre de la sonda DPH a medida que aumentaba el movimiento de la cadena acilo y disminuía el empaquetamiento de la cadena. Esta es una característica del defecto de empaquetamiento de las vesículas, que puede permitir más espacio para una carga eficiente de una proteína o penetración de agua para la interacción proteína-disolvente. Como resultado, la mezcla de Liso-PS y RA en la bicapa de DMPC crea una partícula lipídica estable que puede potenciar una mejor eficiencia de carga y administración de proteínas terapéuticas con menor inmunogenicidad. Se hicieron observaciones similares para rapamicina cargada en partículas que contenían Liso PS (Figura 16C).

Ejemplo 11

Este ejemplo demuestra que los liposomas de liso-PS pueden formar complejos con una variedad de proteínas. Por ejemplo, se prepararon complejos de liposomas liso-PS con alfa glucosidasa (GAA), colágeno, gliadina, péptidos MOG, Ova y colágeno. La preparación de partículas lipídicas implicó la carga y separación de liposomas cargados con antígenos de antígenos libres usando la columna sephadex y el antígeno asociado con LisoPS se estimó usando el análisis de cuantificación de proteínas y el análisis de espectroscopia de fluorescencia. Se observó que la eficiencia de asociación para GAA era del 44 %, para la gliadina del 90 % y para el colágeno del 62 %. Se muestra un ejemplo de separación y espectro de fluorescencia para el colágeno.

Se prepararon liposomas en una relación de 30:69:1 de LisoPS:PC:rodamina PE. Luego, la preparación se puso en el evaporador rotatorio para formar la película de lípidos, luego se rehidrató con tampón TRIS y se extruyó (x6) para lograr un tamaño final de aproximadamente 100 nm. La cantidad de liposomas se confirmó por ensayo de fosfato.

La columna de exclusión por tamaño se preparó el día anterior a la operación en la columna hidratando un gramo de perlas de sephadex G-200 en 35-40 mL de tampón TRIS; luego, se agitó la preparación hasta que se formó un gel, luego se cargó en la columna. Se usaron 2,5 µl de colágeno y 497,5 µl de tampón TRIS para preparar 500 µl de muestra de colágeno libre. Se usaron 2,5 µl de colágeno, 401,2 µl de tampón TRIS y 96,3 µl de preparación de lisoPS para preparar 500 µl de la muestra de liso-colágeno.

La muestra de colágeno libre se pasó a través de la columna; se recogieron treinta fracciones. Después de lavar la columna con tampón TRIS, se corrieron cien microlitros de muestra de liso-colágeno al 30 % a través de la columna y se recogieron treinta fracciones. A continuación, se leyeron las treinta fracciones de liso-colágeno

- 5 mediante espectrofotometría de fluorescencia (longitud de onda de emisión = 580 nm, excitación = 560 nm). El ensayo BCA se usó para cuantificar la cantidad de proteína en la muestra de Liso-colágeno y en la muestra de colágeno libre. (Figura 17). Los cálculos de asociación fueron los siguientes. La relación proteína:lípido usada es de 1:10.000. El peso molecular del colágeno es de 300.000 g/mol. La dosis de colágeno usada para este experimento es de 5 µg. La concentración de la alícuota de colágeno usada para este experimento es de 2 µg/µL. La concentración real de la preparación de LisoPS (confirmada por ensayo de fosfato) fue de 1,731 µmoles/µL.

Ejemplo 12

- 10 Este ejemplo describe la fluorescencia para liposomas liso-PS en complejo con gliadina. Fluorescencia de gliadina y sus espectros de primera derivada: Como se muestra en la Figura 18A y 18B, la gliadina cargada en liso PS muestra un desplazamiento de aproximadamente 7 nm en los máximos de emisión, lo que sugiere que la gliadina está intercalada en la bicapa.
- 15 La descripción anterior proporciona ejemplos específicos de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una pluralidad de liposomas, en donde los liposomas comprenden fosfatidilcolina (PC) y lisofosfatidilserina (liso-PS), en donde la relación molar de PC a liso-PS es de 90:10 a 60:40, y en donde la cadena acilo de la liso-PS es ácido oleico.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la relación molar de PC a liso-PS es de 85:15 a 70:30.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la PC está presente como dimiristoil-sn-glicero-3 fosfatidilcolina (DMPC).
4. La composición de la reivindicación 1, en donde el tamaño de los liposomas es de 80 a 150 nm, como se mide usando un analizador de tamaño de partículas NICOMP Modelo CW380.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde el potencial zeta de los liposomas es de -10 a -15, según se determina usando el modo de Smoluchowski y el modo de Huckle.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde los liposomas están en complejo con un polipéptido antigénico.
7. La composición de la reivindicación 1, en donde PC y liso-PS son los únicos fosfolípidos presentes en la bicapa del liposoma.
8. La composición de la reivindicación 1 que comprende además ácido retinoico en donde la relación molar de PC, liso-PS y ácido retinoico es de 70:20:10 a 70:29:1; o
- que comprende además rapamicina en donde la relación molar de PC, liso-PS y rapamicina es de 70:20:10 a 70:29:1.
9. Una combinación para su uso en un método para inducir tolerancia inmune frente a una proteína diana en un individuo que comprende:
 - a) proporcionar al individuo un primer régimen de administraciones múltiples de una primera composición que comprende los liposomas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 7 u 8 en complejo con una proteína diana; y
 - b) mientras se continúa con el primer régimen, proporcionar al individuo un segundo régimen de una o más administraciones de, bienuna segunda composición que comprende la proteína diana libre de liposomas; o
- una segunda composición que comprende la proteína diana y liposomas que no contienen liso-PS, en donde el segundo régimen se inicia al menos 4 semanas después del inicio del primer régimen.
10. La combinación para su uso de la reivindicación 9, en donde la segunda composición comprende la proteína diana libre de liposomas y el segundo régimen se inicia al menos 4 semanas después del inicio del primer régimen.
11. La combinación para su uso de la reivindicación 9, en donde la segunda composición comprende la proteína diana libre de liposomas y los liposomas de la primera composición comprenden PC:liso-PS en una relación molar de 85:15 a 70:30; o
- en donde la PC es dimiristoil-sn-glicero-3 fosfatidilcolina (DMPC).
12. La combinación para su uso de la reivindicación 9, en donde la segunda composición comprende la proteína diana libre de liposomas y la proteína diana es una proteína terapéutica, una proteína de diagnóstico, un autoantígeno, un neoantígeno o un alérgeno.
13. La combinación para su uso de la reivindicación 9, en donde la segunda composición comprende la proteína diana libre de liposomas y el régimen de administración de la primera composición continúa durante al menos 9 semanas antes del inicio del segundo régimen.
14. La combinación para su uso de la reivindicación 9, en donde la segunda composición comprende la proteína diana libre de liposomas y la administración múltiple de la primera composición se lleva a cabo semanalmente.
15. La combinación para su uso de la reivindicación 9 que comprende proporcionar al individuo el primer régimen de administraciones múltiples de la primera composición durante un período de al menos 6 semanas.



Figura 1

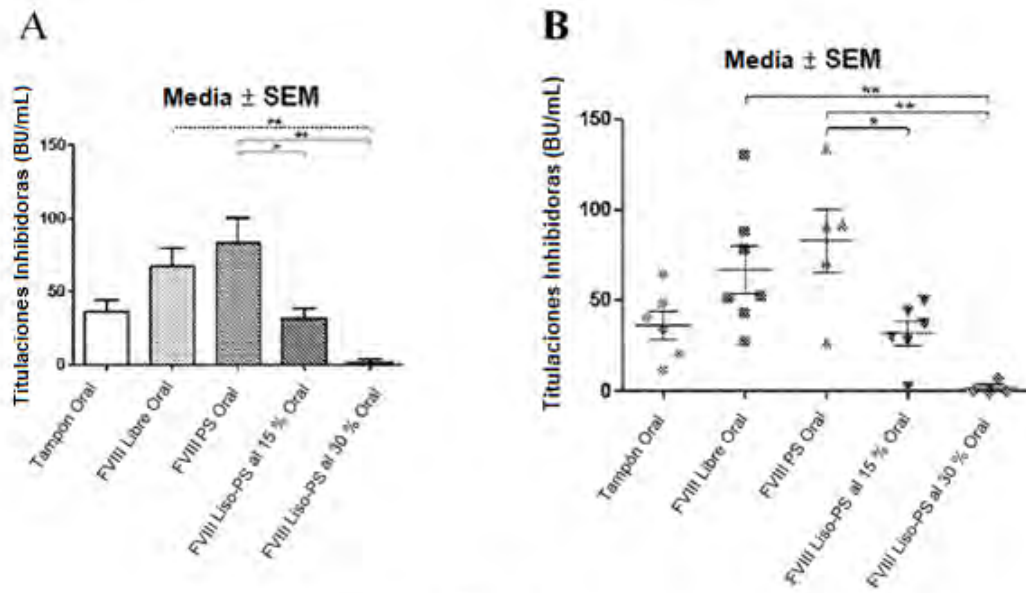
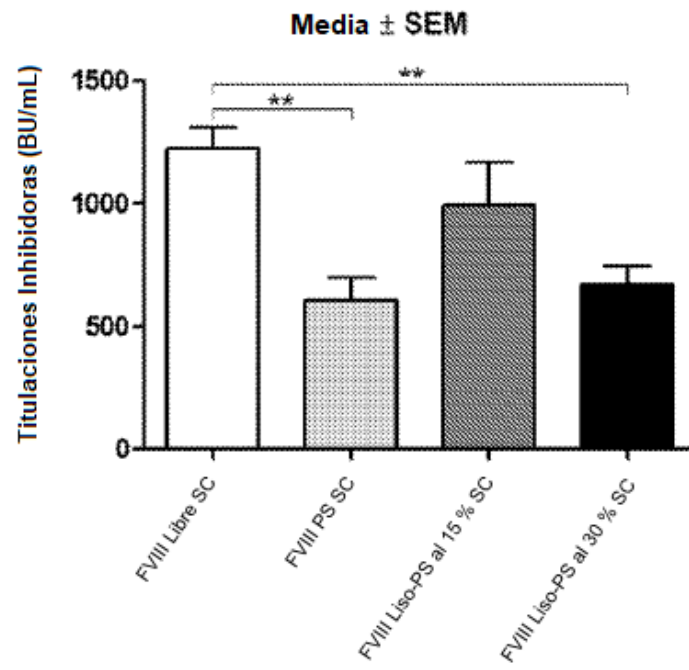


Figura 2

A



B

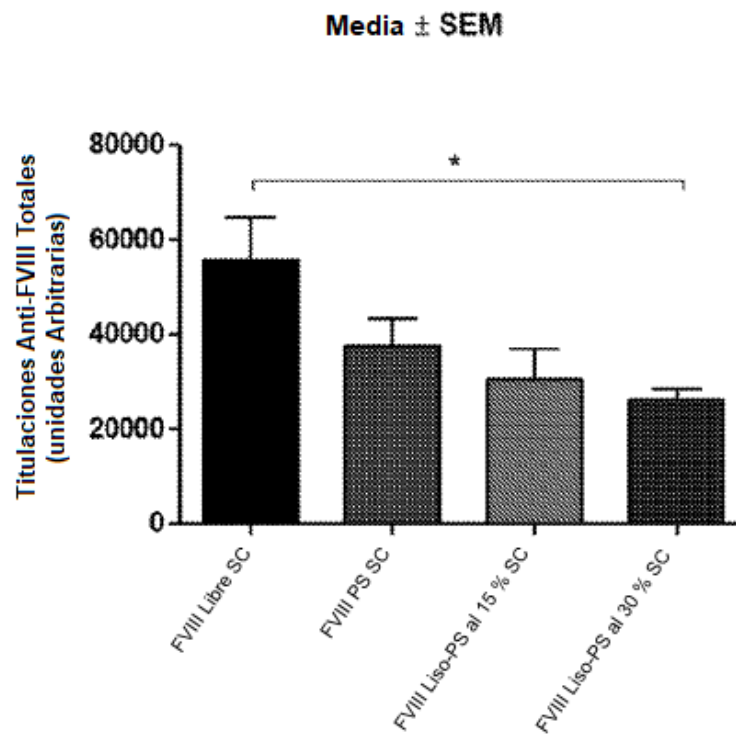


Figura 3

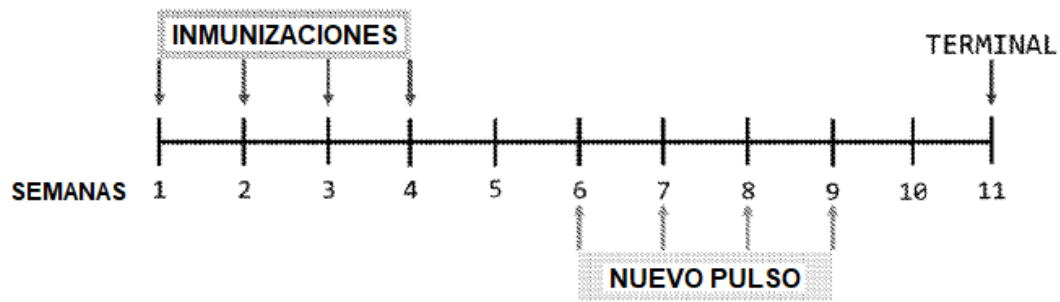


Figura 4

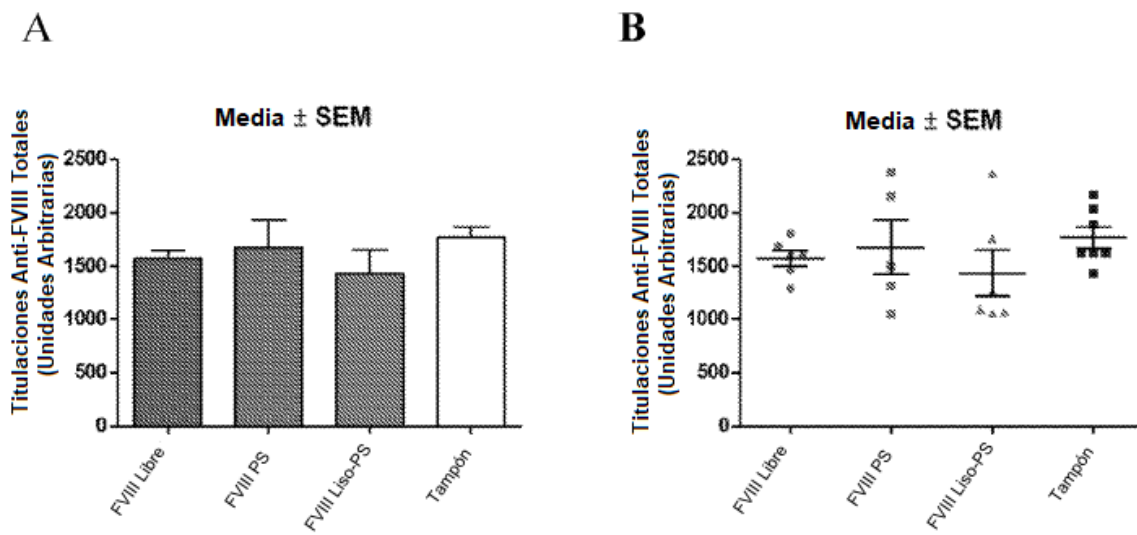


Figura 5

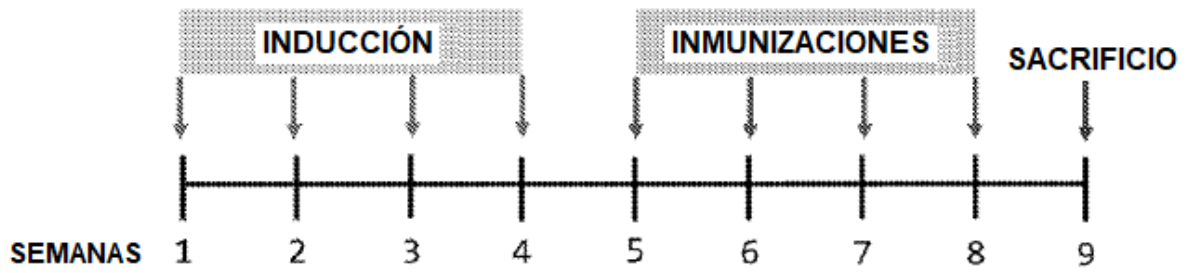


Figura 6

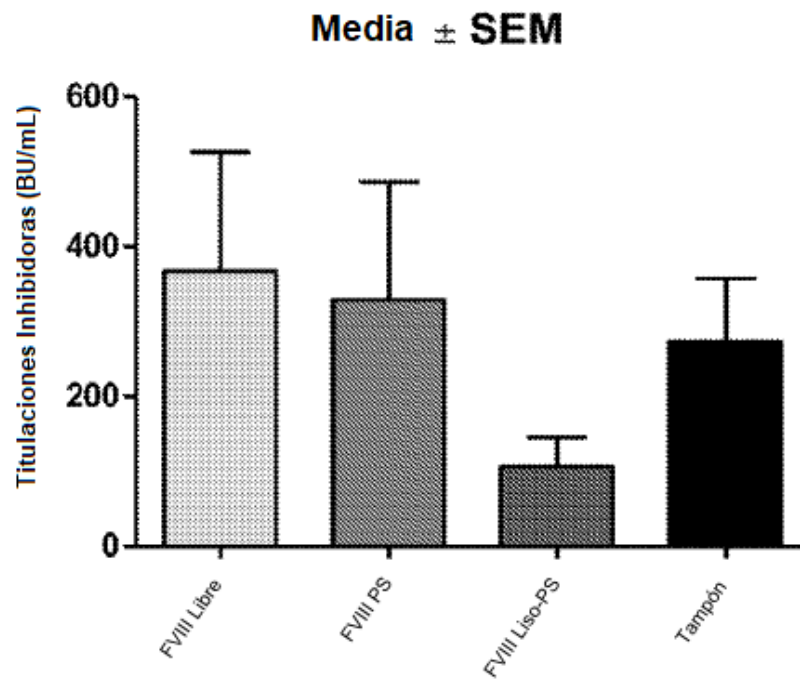


Figura 7

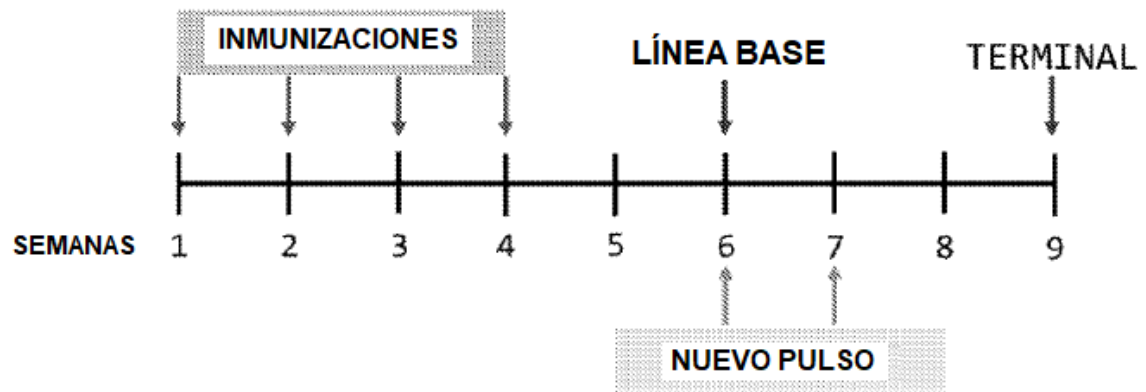


Figura 8

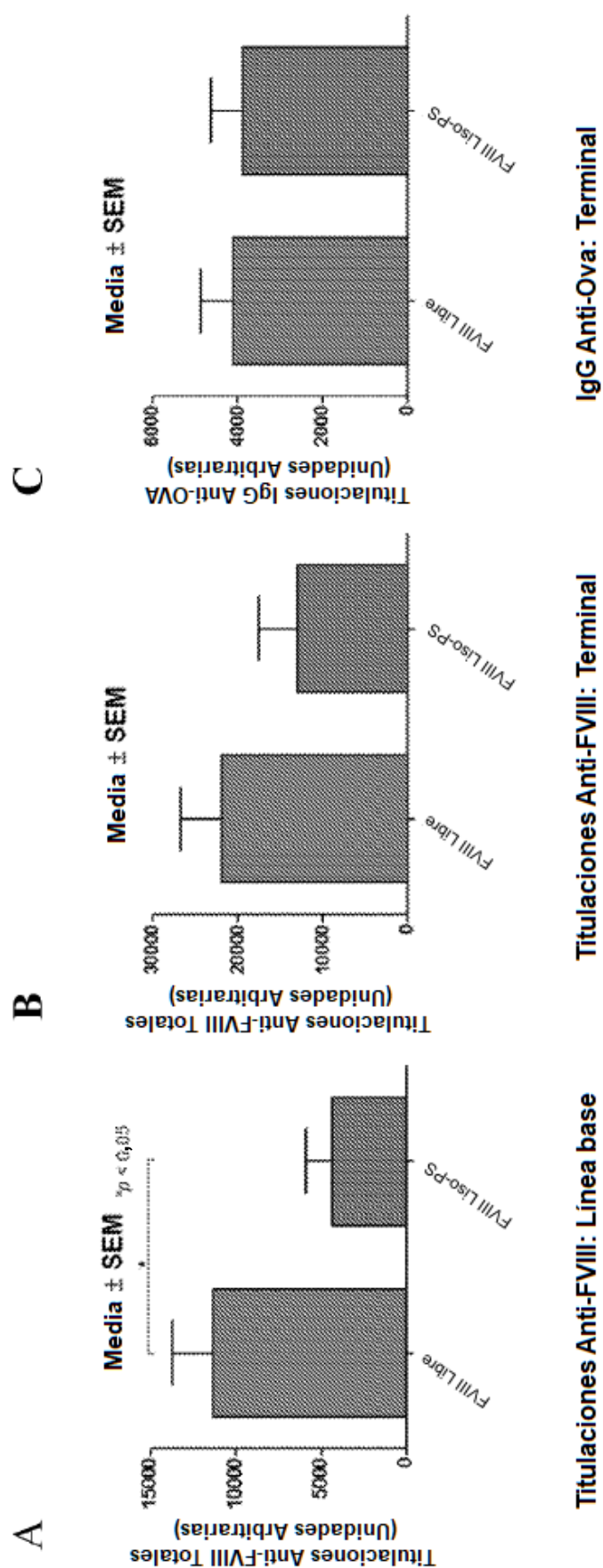


Figura 9

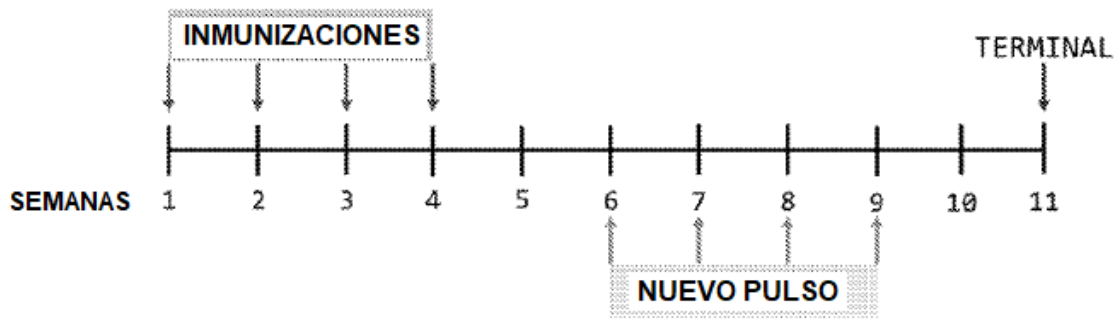


Figura 10

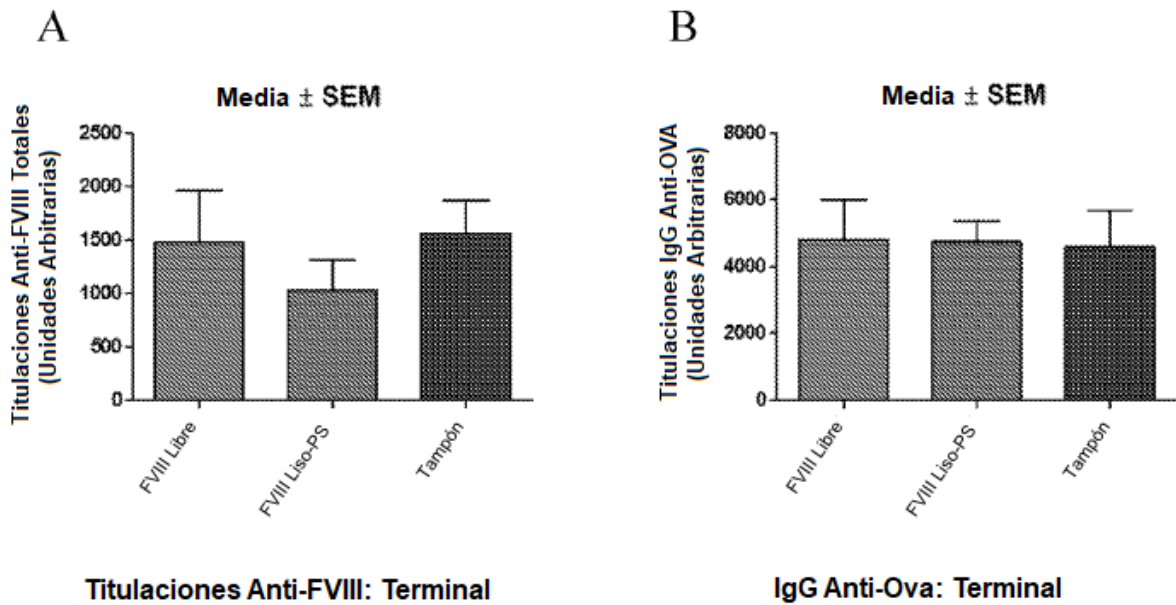


Figura 11

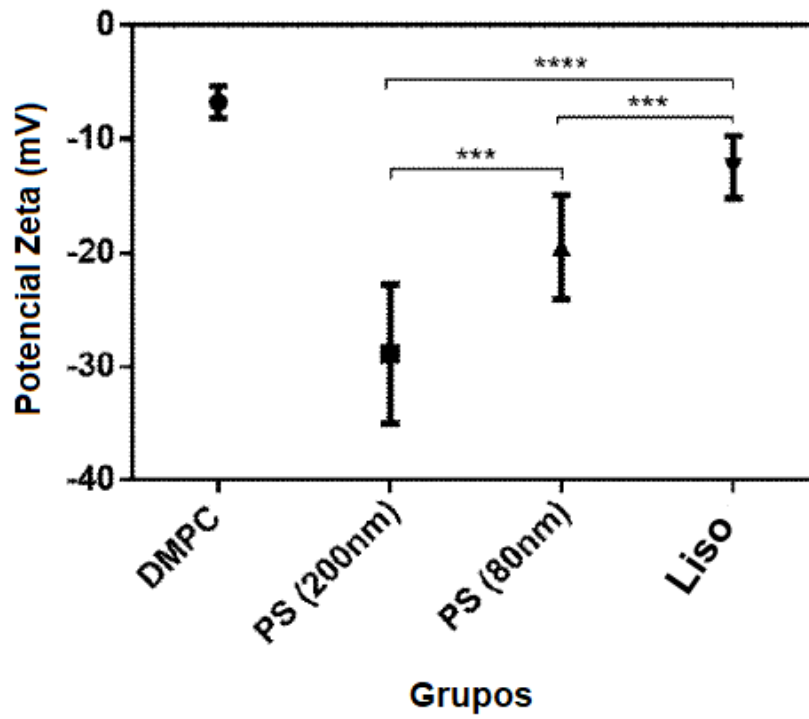


Figura 12

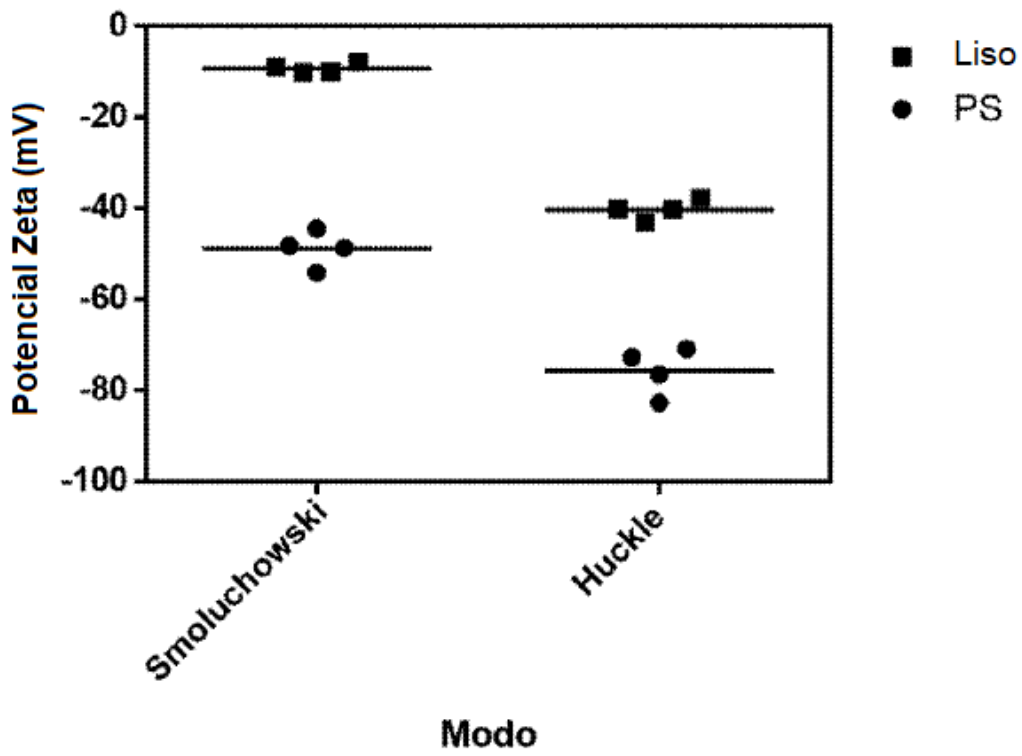


Figura 13

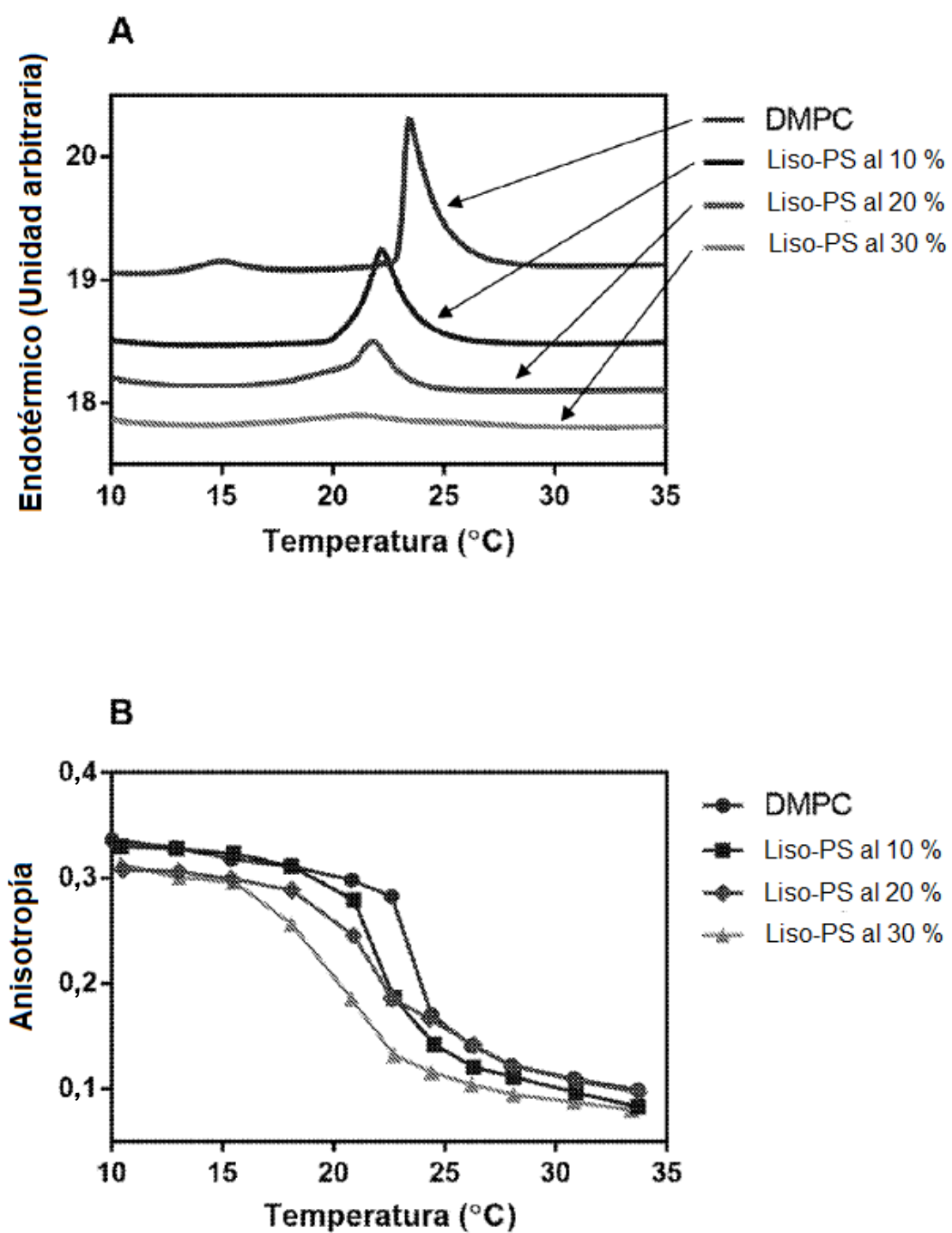


Figura 14

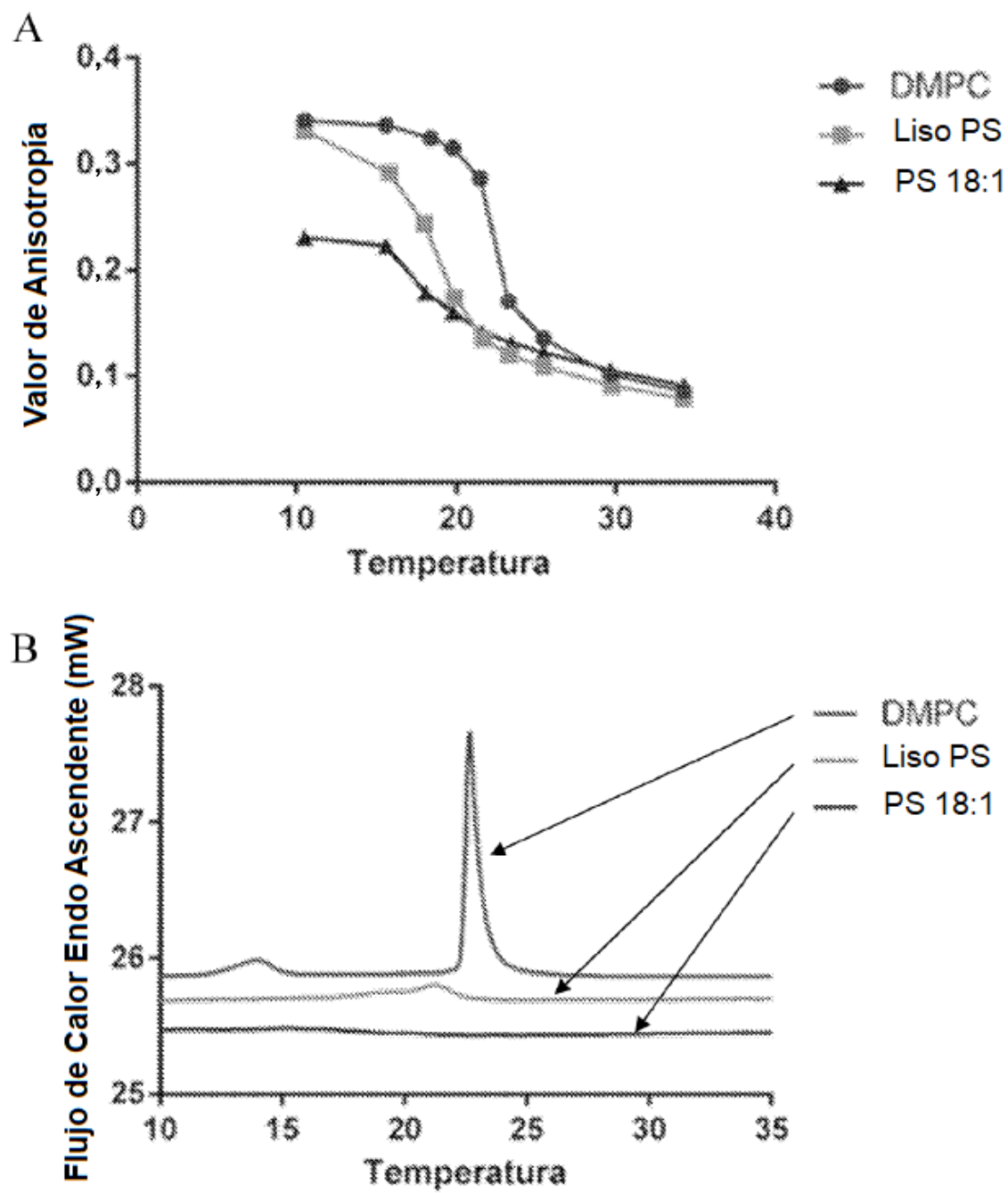


Figura 15

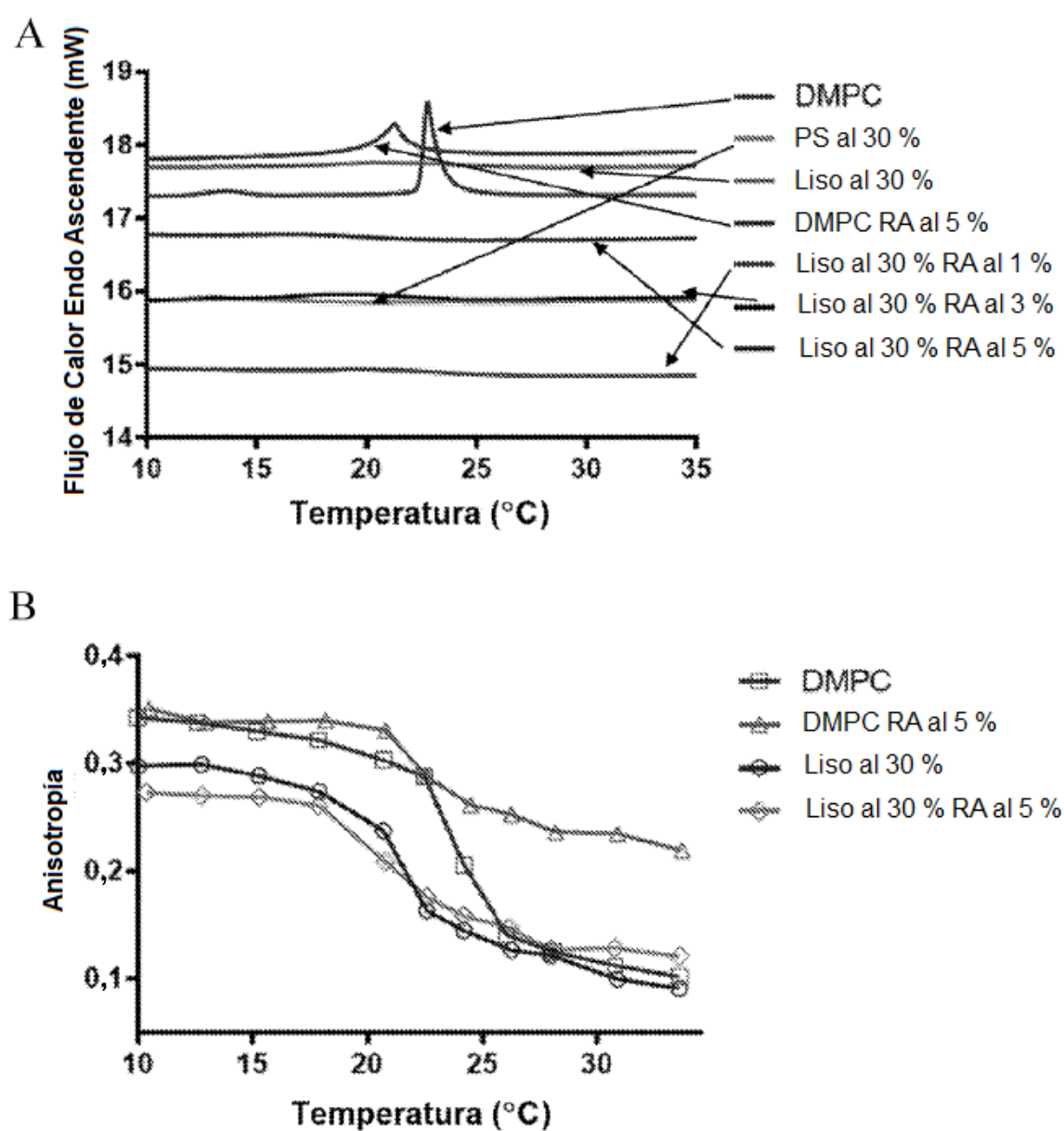


Figura 16

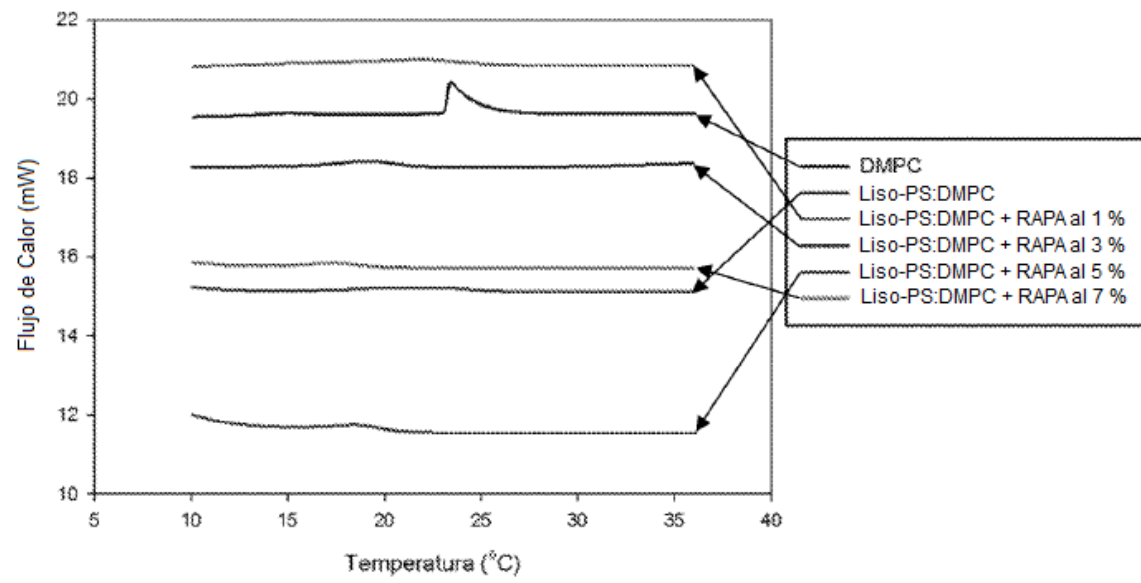


Figura 16 (cont.)

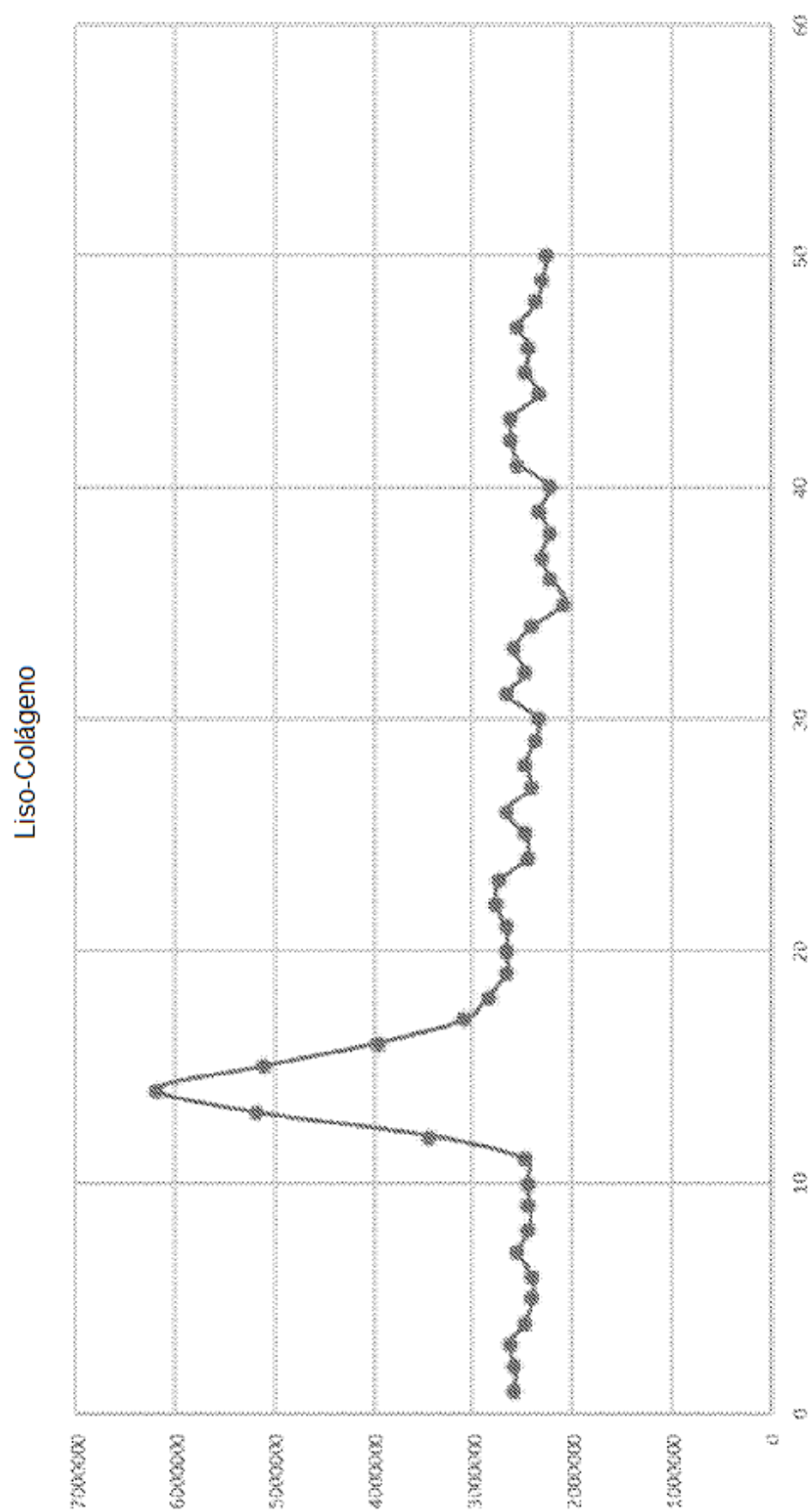


Figura 17

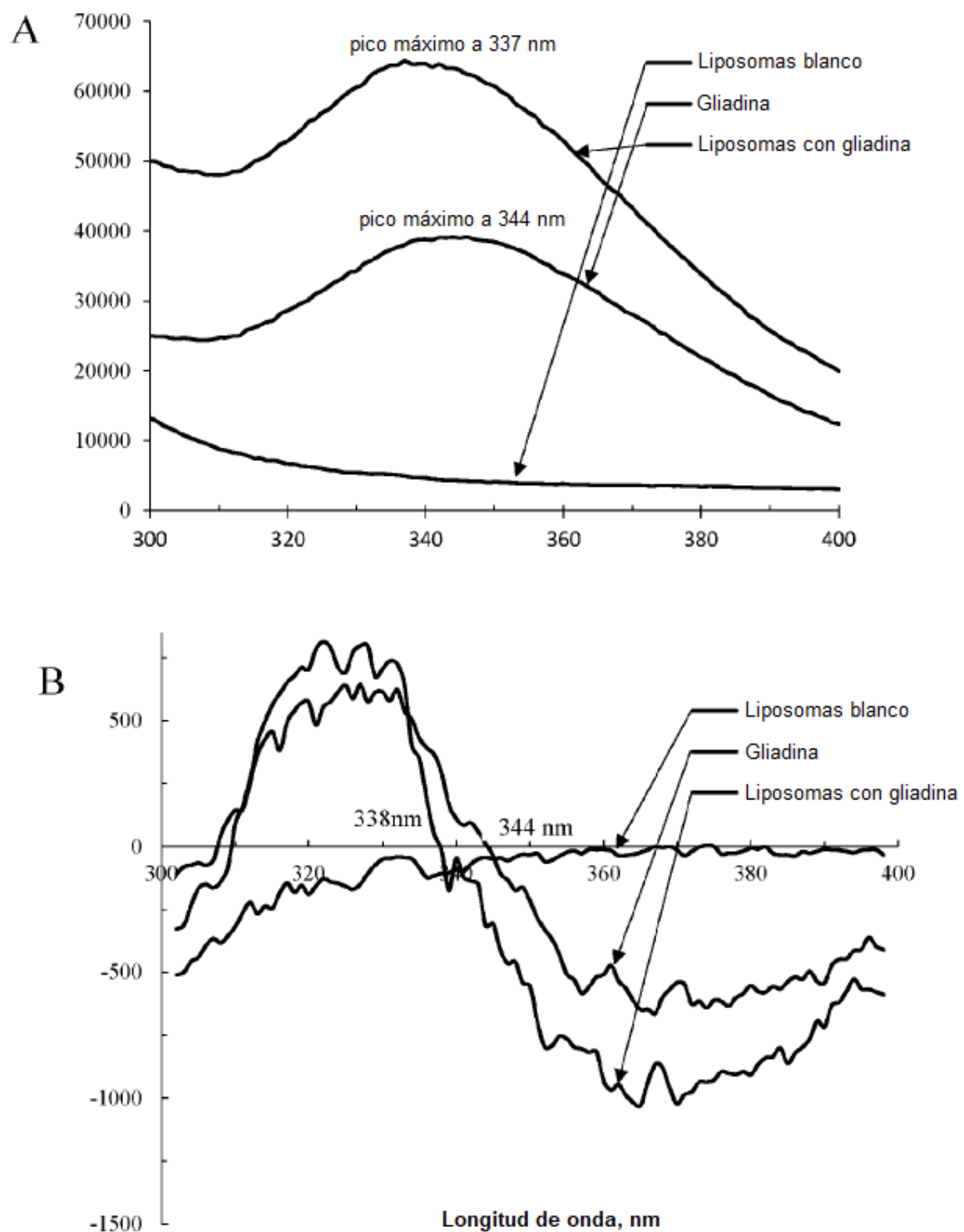


Figura 18