

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 932**

51 Int. Cl.:

A61K 35/18 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2010 PCT/EP2010/066269**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11051346**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2010 E 10768979 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2493487**

54 Título: **Composición para inducir una tolerancia inmunitaria específica**

30 Prioridad:

27.10.2009 US 255250 P

19.04.2010 US 325511 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2017

73 Titular/es:

**ERYTECH PHARMA (100.0%)
60 Avenue Rockefeller
69008 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**GODFRIN, YANN y
BANZ, ALICE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 600 932 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

Composición para inducir una tolerancia inmunitaria específica

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a una composición que induce, en un huésped, una tolerancia inmunitaria a un principio activo peptídico o proteico, en particular un péptido, polipéptido o proteína terapéutica, un autoantígeno peptídico o proteico, un péptido, polipéptido o proteína que induce una reacción alérgica o un antígeno peptídico o proteico de trasplante. La invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de un mamífero, incluyendo un ser humano
- 10 **[0002]** Es conocido que el hígado favorece la inducción de tolerancia inmunitaria. Esto se ejemplifica mediante la tolerización de antígenos alimentarios en el hígado y la aceptación de aloinjertos de hígado. También ha habido alguna demostración de tolerancia específica de antígeno a algunos antígenos extraños suministrados al interior del hígado. E. Breous y col., *Hepatology*, agosto de 2009, págs. 612-621 describen que las células T reguladoras hepáticas y las células de Kupffer son mediadores cruciales de la tolerancia de células T sistémicas a antígenos que se dirigen al hígado murino. Ellos describen que, en un modelo de transferencia génica dirigida al hígado, las respuestas de linfocitos T citotóxicos a antígenos que no son no-autoantígenos están controladas por células T reguladoras hepáticas que secretan la citoquina inmunosupresora interleuquina IL-10 en respuesta al antígeno. Además, las células de Kupffer se hacen tolerógenas en lugar de generar una respuesta inmunitaria en este contexto.
- 15 **[0003]** El papel tolerógeno de las células de Kupffer también ha sido descrito por C. Ju y col., *Chem. Res. Toxicol.* 2003, 16: 1514-1519. Véase también A.H. Lau y col., *Gut* 2003, 52: 1075-1078.
- 25 **[0004]** La presente invención pretende proporcionar composiciones que puedan usarse para la inducción de una tolerancia inmunitaria contra diversos principios activos peptídicos o proteicos. La presente invención pretende, en particular, proporcionar una tolerancia inmunitaria específica con respecto a uno o varios principios activos peptídicos o proteicos.
- 30 **[0005]** Un objeto de la invención es, por lo tanto, una composición de acuerdo con la reivindicación 1, para uso para inducir, en un huésped, una tolerancia inmunitaria a un principio activo peptídico o proteico.
- [0006]** El principio activo puede ser de origen natural, sintético o recombinante. Mediante molécula "que contiene", se pretenden abarcar moléculas que contienen el péptido, polipéptido o proteína de interés y otro resto que puede ser de cualquier origen y no es perjudicial para la acción de dicho péptido, polipéptido o proteína. Por ejemplo, dicho resto incluye haptenos.
- 35 **[0007]** Sin desear quedar ligado a una teoría, se considera que la composición de acuerdo con la invención induce células T reguladoras específicas de uno o varios antígenos (Treg) y produce citoquinas o interleuquinas inmunosupresoras, en particular IL-10.
- 40 **[0008]** Péptidos, polipéptidos o proteínas biológicas y/o derivadas de biotecnología se usan cada vez más como agentes terapéuticos. Se ha reconocido, sin embargo, que estos agentes pueden inducir respuestas inmunitarias humorales y/o celulares. Las consecuencias de una reacción inmunitaria a dicho agente terapéutico varían entre aparición transitoria de anticuerpos sin ninguna importancia clínica a varias afecciones potencialmente letales. Las potenciales consecuencias clínicas son reacciones de tipo hipersensibilidad grave, disminución de la eficacia e inducción de autoinmunidad, incluyendo anticuerpos para la forma endógena del péptido, polipéptido o proteína (European Medicines Agency, Committee for Medicinal products for human use (CHMP), Guidelines on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins, Borrador, Londres, 24 de enero de 2007).
- 45 **[0009]** Un péptido, polipéptido o proteína terapéutica es, por definición, un péptido, polipéptido o proteína o una molécula que contiene un péptido, polipéptido o proteína que es eficiente en el tratamiento de una patología, especialmente una patología debida a una deficiencia que puede corregirse mediante administración de esta molécula.
- 50 **[0010]** En una realización, el péptido, polipéptido o proteína terapéutica es un anticuerpo. Esto abarca cualquier fragmento del mismo.
- 55 **[0011]** En otra realización, el péptido, polipéptido o proteína terapéutica es un factor de coagulación. Esto

abarca cualquier fragmento del mismo.

[0012] En otra realización, el péptido, polipéptido o proteína terapéutica es una enzima. Esto abarca cualquier fragmento de la misma.

5

[0013] En otra realización, el péptido, polipéptido o proteína terapéutica es un factor de crecimiento. Esto abarca cualquier fragmento del mismo.

[0014] El término fragmento se usa para abarcar cualquier fragmento del péptido, polipéptido o proteína que es conocido que es eficiente en el tratamiento de la patología asociada en sustitución de la molécula completa.

10

[0015] Las formas glucosiladas también están abarcadas por esta definición.

[0016] En una realización, el principio activo es una enzima lisosómica. La enzima lisosómica puede ser una usada para tratar o corregir una enfermedad de almacenamiento lisosómico mediante terapia enzimática sustitutiva (TES), incluyendo enfermedad de Pompe (enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II), enfermedad de Fabry y trastornos de mucopolisacaridosis MPS I. Como ejemplos, pueden mencionarse:

15

- enzima alfa-glucosidasa, por ejemplo Myozyme® para tratar enfermedad de Pompe;

20

- laronidasa, por ejemplo Aldurazyme® para tratar MPS I;

- alfa-galactosidasa A o agalsidasa alfa, por ejemplo Fabrazyme® y Replagal® para tratar la enfermedad de Fabry.

[0017] En otra realización, el principio activo es un factor de coagulación útil en el tratamiento de hemofilia. El factor de coagulación puede ser factor VIII, en particular para tratar hemofilia A. El factor de coagulación puede ser factor IX, en particular para tratar hemofilia B. El factor de coagulación puede ser factor VII para tratar ambas hemofilias.

25

[0018] Un autoantígeno peptídico o proteico es, por definición, un antígeno que es un tejido normal constituyente y es, en un paciente, la diana de una respuesta inmunitaria humoral o mediada por células perjudicial, como en una enfermedad autoinmunitaria.

30

[0019] En una realización, el principio activo es contra artritis reumatoide (AR).

[0020] En otra realización, el principio activo es contra esclerosis múltiple (EM). Por ejemplo el principio activo es proteína básica de mielina.

35

[0021] En otra realización, el principio activo es contra diabetes juvenil, tal como diabetes de tipo 1 y DALA (diabetes autoinmunitaria latente del adulto). Como ejemplos, puede mencionarse el antígeno de células beta, en particular ácido glutámico descarboxilasa (GAD), la pro-insulina y el factor de crecimiento similar a insulina-2 (IGF2), y mezclas de los mismos.

40

[0022] En otra realización, el principio activo es contra uveitis. Puede mencionarse el antígeno retiniano S.

[0023] En otra realización, el principio activo es contra una enfermedad intestinal inflamatoria (EII), tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

45

[0024] En otra realización, el principio activo es contra lupus eritematoso sistémico.

[0025] En otra realización, el principio activo es contra psoriasis.

50

[0026] En otra realización, el principio activo es contra miastenia grave adquirida. Como ejemplo, puede mencionarse el receptor de acetilcolina.

[0027] Un péptido, polipéptido o proteína que induce una reacción alérgica es, por definición, un péptido, polipéptido o proteína que es responsable de una reacción alérgica en un huésped, reacción que puede incluir un choque anafiláctico.

55

[0028] En una realización, este péptido, polipéptido o proteína que induce una reacción alérgica es un péptido, polipéptido o proteína activa terapéutica tal como se ha mencionado anteriormente, en la que la presente

invención permite evitar alguna o cualquiera reacción alérgica contra él y la neutralización del mismo.

[0029] En otra realización, el péptido, polipéptido o proteína que induce una reacción alérgica es de origen alimentario o cualquier otra molécula proteica o peptídica que pueda entrar en la circulación sanguínea y crear una reacción alérgica, por ejemplo después de ingestión oral.

[0030] Un antígeno peptídico o proteico de trasplante es, por definición, un antígeno que es presentado por el tejido trasplantado y está implicado en el paciente en el rechazo de injerto, digamos Enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

[0031] En una realización, el antígeno de trasplante es uno implicado en rechazo de injerto de riñón.

[0032] En una realización, el antígeno de trasplante es uno implicado en rechazo de injerto de corazón.

[0033] En una realización, el antígeno de trasplante es uno implicado en rechazo de injerto de hígado.

[0034] El término "huésped" se refiere, preferentemente, a seres humanos, pero también a animales, en particular animales de compañía (especialmente perros o gatos) y animales para la práctica deportiva (especialmente caballos).

[0035] De acuerdo con la invención, los glóbulos rojos contienen, es decir encapsulan, el principio activo (PA), lo que significa que el PA es o está esencialmente dentro de los glóbulos rojos.

[0036] En un caso, la composición se dirige a las células presentadoras de antígenos (CPA) del sistema reticuloendotelial. De acuerdo con una característica, los glóbulos rojos se diseñan, seleccionan o modifican para promover el direccionamiento a las células presentadoras de antígenos (CPA) del sistema reticuloendotelial.

[0037] En un caso preferido, la composición se dirige al hígado y especialmente a las células de Kupffer. De acuerdo con una característica, los glóbulos rojos se diseñan, seleccionan o modifican para promover al direccionamiento al hígado. El suministro del PA al hígado da como resultado la inducción de tolerancia al PA y especialmente tolerancia específica del PA. Las CPA tolerógenas del hígado están implicadas en la inducción de esta tolerancia. Estas células son esencialmente células de Kupffer (CK), células dendríticas hepáticas no maduras y células endoteliales sinusoidales de hígado.

[0038] En un caso preferido, la composición se usa para reprimir la respuesta proinflamatoria de las CPA. De acuerdo con una característica, los glóbulos rojos se diseñan o modifican preferentemente para reprimir la respuesta proinflamatoria de las CPA.

[0039] En un caso preferido, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden glóbulos rojos que contienen el PA y se dirigen al hígado. La composición promueve la fagocitosis de estos glóbulos rojos por las CPA del hígado, especialmente las CK.

[0040] De acuerdo con un primer caso, los glóbulos rojos contienen el PA y están en forma de un complejo inmunitario con una inmunoglobulina que reconoce un epítipo en la superficie de dichos glóbulos rojos, para promover la fagocitosis de dichos glóbulos rojos por las CPA del hígado, especialmente las CK.

[0041] La composición también hace posible promover la fagocitosis por macrófagos.

[0042] Preferentemente, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina G.

[0043] Como anticuerpo que puede usarse para realizar una opsonización adecuada, pueden mencionarse anticuerpos anti-rhesus, anticuerpos anti-glucoforina A y anticuerpos anti-CR1 (CR1 = receptor del complemento de tipo 1). Se prefieren anticuerpos anti-rhesus.

[0044] De acuerdo con otro caso, el direccionamiento al hígado y/o la inhibición de la respuesta proinflamatoria se realiza/realizan mediante un tratamiento químico apropiado usando agentes que modifican la superficie de los glóbulos rojos, y en particular agentes de establecimiento de puentes o reticulación tales como suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3 o BS3), glutaraldehído o neuraminidasa.

- [0045]** De acuerdo con otro caso, el direccionamiento al hígado y/o la inhibición de la respuesta proinflamatoria se realiza/realizan usando un ionóforo. Por ionóforo, se entiende, como es bien conocido por el experto en la materia, una molécula soluble en lípidos que permite el transporte de iones a través de la bicapa lipídica de la membrana celular. Los ionóforos pueden ser, en particular, moléculas solubles en lípidos, dado que son sintetizadas por microorganismos para transportar iones a través de la bicapa lipídica de la membrana celular. En general, el ionóforo es capaz de formar un complejo con un ion y sirve como portador de iones.
- [0046]** En un caso, el ionóforo es uno que forma un complejo con un catión divalente tal como calcio. De acuerdo con la invención, el ionóforo puede usarse con calcio, lo que induce un incremento de la concentración de calcio intracelular y una exposición de la fosfatidilserina, causando un envejecimiento temprano de los glóbulos rojos.
- [0047]** Como ejemplo, se puede usar el ionóforo de calcio A23187 (calcimicina). Se considera que el ionóforo tal como A23187 induce una elevación de las concentraciones de calcio intracelular de los GR (glóbulos rojos), causando la senescencia de las células y que la fagocitosis de glóbulos rojos envejecidos reprime la respuesta proinflamatoria. Esto está de acuerdo con Romero P.J., Romero E.A., Blood Cells Mol. Dis. 25 (1999) 9-19; y Bratosin D. y col., Cell Death Differ. 8 (2001) 1143-1156.
- [0048]** En un caso particular, se combinan al menos dos procedimientos de direccionamiento y, por ejemplo, la composición comprende entonces glóbulos rojos que contienen el PA, que están en forma de un complejo inmunitario y son tratados químicamente para promover su captación en el hígado, y fagocitosis por las CPA, en particular por las CK.
- [0049]** En un caso, los glóbulos rojos se originan a partir del propio paciente.
- [0050]** En otro caso, los glóbulos rojos se originan a partir de un donante de hemoclasificación sanguínea compatible.
- [0051]** La composición de acuerdo con la invención puede comprender uno o más PA en los mismos glóbulos rojos o cada uno en glóbulos rojos diferentes.
- [0052]** Técnicas para encapsular ingredientes activos en glóbulos rojos son conocidas y la técnica básica mediante lisis-resellado, se describe en las patentes EP-A-101 341 y EP-A-679 101. De acuerdo con esta técnica, el compartimento primario de un elemento de diálisis (por ejemplo, un tubo de diálisis o un cartucho de diálisis) es alimentado de forma continua con una suspensión de glóbulos rojos, mientras que el compartimento secundario contiene una solución acuosa que es hipotónica con respecto a la suspensión de glóbulos rojos, con el fin de lisar los glóbulos rojos; a continuación, en una unidad de resellado, el resellado de los glóbulos rojos se induce en presencia del PA incrementando la presión osmótica y/o oncótica, y a continuación se recoge una suspensión de glóbulos rojos que contienen el PA.
- [0053]** Entre las variantes descritas hasta ahora, se da preferencia al procedimiento descrito en el documento WO2006/016247, que hace posible encapsular de forma eficiente, reproducible, segura y estable el PA. Este procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 1 - suspensión de un sedimento de glóbulos rojos en una solución isotónica a un nivel de hematocrito mayor que o igual al 65%, refrigeración a entre +1 y +8°C,
 - 2 - medición de la fragilidad osmótica usando una muestra de glóbulos rojos procedente de dicho sedimento de glóbulos rojos, siendo posible que las etapas 1 y 2 se lleven a cabo en cualquier orden (incluyendo en paralelo),
 - 3 - proceso de lisis e internalización del PA, dentro de la misma cámara, a una temperatura mantenida de forma constante entre +1 y +8°C, que comprende hacer pasar la suspensión de glóbulos rojos a un nivel de hematocrito mayor que o igual al 65%, y una solución de lisis hipotónica refrigerada a entre +1 y 8°C, a través de un cartucho de diálisis; y ajustándose los parámetros de lisis de acuerdo con la fragilidad osmótica medida previamente; y
 - 4 - proceso de resellado llevado a cabo en una segunda cámara, dentro de la cual la temperatura está entre +30 y +40°C, y en presencia de una solución hipertónica.
- [0054]** La "internalización" pretende significar penetración del PA dentro de los glóbulos rojos.
- [0055]** En particular, para la diálisis, el sedimento de glóbulos rojos se suspende en una solución isotónica a un nivel de hematocrito elevado, mayor que o igual al 65%, y preferentemente mayor que o igual al 70%, y esta

suspensión se refrigera a entre +1 y +8°C, preferentemente entre +2 y 6°C, normalmente en la región de +4°C. De acuerdo con una realización específica, el nivel de hematocrito está entre el 65% y el 80%, preferentemente entre el 70% y el 80%.

5 **[0056]** La fragilidad osmótica se mide ventajosamente en los glóbulos rojos justo antes de la etapa de lisis. Los glóbulos rojos o la suspensión que los contiene están (está) ventajosamente a una temperatura cercana o idéntica a la temperatura seleccionada para la lisis. De acuerdo con otra característica ventajosa de la invención, la medición de la fragilidad osmótica se aprovecha rápidamente, es decir el proceso de lisis se lleva a cabo poco después de que se haya tomado la muestra. Preferentemente, este periodo de tiempo entre la toma de la muestra y
10 el comienzo de la lisis es menor que o igual a 30 minutos, más preferentemente aún menor que o igual a 25, e incluso menor que o igual a 20 minutos.

[0057] En lo que respecta a la manera en la que se lleva a cabo el proceso de lisis-resellado, con la fragilidad osmótica siendo medida y tenida en cuenta, se describe en el documento WO2006/016247.

15

[0058] De acuerdo con una característica de la invención, la composición de acuerdo con la invención comprende, al final, una suspensión de glóbulos rojos a un nivel de hematocrito de entre aproximadamente el 40% y aproximadamente el 70%, preferentemente entre aproximadamente el 45% y aproximadamente el 55%, aún mejor aproximadamente el 50%. Preferentemente es envasada en un volumen de aproximadamente 1 a aproximadamente
20 250 ml. El envasado es preferentemente en una bolsa de sangre, jeringa y similares, de un tipo adecuado para transfusión o administración sanguínea. La cantidad de PA encapsulado que corresponde a la prescripción médica está preferentemente contenida completamente en la bolsa de sangre, jeringa y similares.

[0059] La invención también describe un procedimiento para inducir, en un huésped, una tolerancia
25 inmunitaria a un principio activo peptídico o proteico, comprendiendo dicha composición glóbulos rojos que contienen un principio activo seleccionado entre el grupo que consiste en un péptido, polipéptido o proteína terapéutica, un autoantígeno peptídico o proteico, un péptido, polipéptido o proteína que induce una reacción alérgica y un antígeno peptídico o proteico de trasplante. Este procedimiento comprende la administración al huésped de una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con la invención, en particular por vía intravenosa,
30 por inyección o infusión, preferentemente por infusión.

[0060] De acuerdo con esta divulgación, se administran de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 ml, especialmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 ml, normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 ml de una suspensión de glóbulos rojos. La suspensión está a un nivel de hematocrito
35 apropiado, generalmente se administra de entre aproximadamente el 40% y aproximadamente el 70%, preferentemente entre aproximadamente el 45% y aproximadamente el 55%, aún mejor aproximadamente el 50%. Los glóbulos rojos pueden tener su propio efecto tolerógeno con respecto al principio activo que es presentado al mismo tiempo (el principio activo encapsulado). Cantidades elevadas de glóbulos rojos pueden favorecer, de este modo, el efecto tolerógeno. Por otro lado, el direccionamiento al hígado, tal como se ha descrito anteriormente,
40 puede permitir usar dosis bajas de glóbulos rojos. El experto en la materia puede seleccionar, de este modo, la cantidad óptima de principio activo y de glóbulos rojos usados en un paciente, y tener en cuenta si los glóbulos rojos han sido o no tratados para dirigirse al hígado.

[0061] Un objeto de la invención es también el uso de una composición de acuerdo con la invención, para la
45 inducción de una tolerancia inmunitaria específica del principio activo o los principios activos que están presentes en los glóbulos rojos administrados.

[0062] Otro objeto de la invención es una composición de acuerdo con la invención, para uso como un medicamento para inducir una tolerancia inmunitaria específica del principio activo o los principios activos que están
50 presentes en los glóbulos rojos administrados.

[0063] La presente invención se describirá a continuación en más detalle por medio de realizaciones tomadas a modo de ejemplos no limitantes, y que se refieren a los dibujos adjuntos, en los que:

55 La figura 1 es un gráfico que representa el porcentaje de células T CD4 que expresan FOXP3
La figura 2 es un gráfico que representa el porcentaje de células T CD4⁺ CD25⁺ reguladoras que producen IL-10.
La figura 3 es un gráfico que representa el porcentaje de células T CD4 que expresan FOXP3 en el bazo.
La figura 4 es un gráfico que representa el porcentaje de células T CD4 que expresan FOXP3 en el hígado.
La figura 5 es un gráfico que representa el porcentaje de células T CD8 específicas de OVA.

Ejemplo 1: encapsulación de FITC-dextrano en glóbulos rojos murinos

[0064] El fluorógeno FITC-dextrano (70 kDa) ha sido encapsulado en glóbulos rojos de origen murino (ratones OF1) usando la diálisis hipotónica en columna. La sangre se centrifuga y a continuación se lava 3 veces con PBS. El hematocrito se ajusta al 70% en presencia de FITC-dextrano añadido a una concentración final del 8 mg/ml antes de la diálisis. Los glóbulos rojos se dializan a una velocidad de 2 ml/min contra un tampón de lisis que tiene una osmolaridad baja (contraflujo a 15 ml/min). Los glóbulos rojos lisados que salen de la columna se resellan usando una solución de elevada osmolaridad e incubación 30 minutos a 37°C. Después de varios lavados con PBS que contenía glucosa, las células se llevan a un hematocrito del 50%.

Ejemplo 2. Tratamiento químico con suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3) 1 mM sobre los glóbulos rojos que contienen FITC-dextrano

[0065] La suspensión de glóbulos rojos que encapsulan FITC-dextrano se lava varias veces antes de ser llevada a $1,7 \times 10^6$ células/ μ l con PBS y se mezcla con un volumen de una solución tampón de BS3 2 mM (la solución de BS3 contiene glucosa al 0,09% y tampón fosfato, pH 7,4), para obtener una concentración de BS3 final de 1 mM. Las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se inactiva añadiendo un volumen de Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM. Después de incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos, la mezcla se centrifuga a 800 g durante 5 min, 4°C. Las células se lavan a continuación dos veces con PBS que contiene glucosa (centrifugado a 800 g) y una vez con al SAG-BSA al 6% (centrifugado a 1000 g) durante 10 min, antes del ajuste a hematocrito al 50% para constituir los productos finales.

Ejemplo 3. Tratamiento químico con suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3) 5 mM sobre los glóbulos rojos que contienen FITC-dextrano

[0066] La suspensión de glóbulos rojos que encapsulan FITC-dextrano se lava varias veces antes de ser llevada a $1,7 \times 10^6$ células/ μ l con PBS y se mezcla con un volumen de una solución tampón de BS3 10 mM (la solución de BS3 contiene glucosa al 0,09% y tampón fosfato, pH 7,4), para obtener una concentración de BS3 final de 5 mM. Las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se inactiva añadiendo un volumen de Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM. Después de incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos, la mezcla se centrifuga a 800 g durante 5 min., 4°C. Las células se lavan a continuación dos veces con PBS que contiene glucosa (centrifugado a 800 g) y una vez con SAG-BSA al 6% (centrifugado a 1000 g) durante 10 min, antes del ajuste a hematocrito al 50% para constituir los productos finales.

Ejemplo 4. Tratamiento de los glóbulos rojos que contienen FITC-dextrano mediante el ionóforo A23187

[0067] La suspensión de glóbulos rojos que contiene FITC-dextrano se lava una vez con un tampón A que contiene Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, BSA al 0,1%, CaCl_2 2,5 mM, y a continuación la suspensión se diluye a 1×10^6 células/microlitro usando tampón A. El ionóforo concentrado en DMSO se diluye con tampón A y a continuación se añade a la suspensión de células con el fin de conseguir una concentración final de 0,15, 0,2 o 0,3 μ M. Las células se incuban 30 min a 37 °C. La mezcla se centrifuga a 800 g durante 6 min, 4°C. A continuación las células se lavan 2 veces con PBS que contiene glucosa (centrifugado a 800 g) y una vez con SAG-BSA al 6% (centrifugado a 1000 g), y se obtienen los productos finales.

Ejemplo 5. Biodistribución de FITC-dextrano después de la inyección de los glóbulos rojos en ratones

[0068] Se prepararon 5 lotes de glóbulos rojos de ratones OF1 que contenían FITC-dextrano, tal como se obtuvieron en el ejemplo 1 y tratados o no con BS3 o ionóforo (basado en los ejemplos 2-4), de la siguiente manera:

- Lote 1: sin tratamiento
- Lote 2: BS3 1 mM
- Lote 3: BS3 5 mM
- Lote 4: ionóforo 0,2 μ M
- Lote 5: ionóforo 0,3 μ M.

[0069] Cada lote se inyecta IV a D1 en ratones OF1. Los ratones se sacrifican 1 h 30 minutos después de la inyección, y se recuperan sangre, el bazo, el hígado y la médula ósea: alícuotas de 50 μ l de sangre y para el bazo, el hígado y la médula ósea, alícuotas de 50 μ l después de la trituración y la homogeneización de las células

completas de cada órgano. Las alícuotas se congelan durante al menos 20 min a -20°C, a continuación se descongelan lentamente a temperatura ambiente. Las alícuotas de los ratones de control se usan para preparar una gama de concentración estándar de FITC-dextrano: las alícuotas se lisan a continuación con 125 µl de diferentes concentraciones de FITC-dextrano para constituir la gama de concentración estándar.

5

[0070] Las alícuotas de la muestra analizar se lisan usando 125 µl de agua destilada. A continuación, se añaden 175 µl de TCA al 12% a las alícuotas. Las mezclas se centrifugan a continuación a 15.000 g, 10 min, 4°C. Se toman 200 µl de sobrenadante de ácido y se añaden 500 µl de trietanolamina 0,4 M antes de la detección por fluorimetría (excitación a 494 nm, emisión 521 nm). La concentración de FITC-dextrano de cada muestra puede determinarse usando la gama de concentración estándar y la proporción de FITC-dextrano presente en el órgano correspondiente puede deducirse a continuación.

10

[0071] Biodistribución de FITC-dextrano 1 h 30 minutos después de la inyección de los glóbulos rojos en ratones OF1 (tabla 1):

15

Lotes	Sangre	Hígado	Bazo
1	57%	19,8 ± 7,6%	7,7 ± 1,9 %
2	35,5 ± 8%	32 ± 4,6%	22,8 ± 14 %
3	11%	20,6%	13,30%
4	19,9 ± 12,6%	24 ± 1,3%	7,2 ± 1,2%
5	14,7 ± 1,3%	36,7 ± 7,2 %	9,2 ± 0,8 %

[0072] El tratamiento con BS3 1 mM induce direccionamiento de los eritrocitos al hígado y el bazo mientras que el tratamiento con ionóforo induce direccionamiento de los eritrocitos al hígado solamente. Incrementar la dosis de ionóforo mejora el direccionamiento.

20

Ejemplo 6. Medición de la fagocitosis en ratones de glóbulos rojos que contienen FITC-dextrano

[0073] Se prepararon 5 lotes de glóbulos rojos de ratones OF1 que contenían FITC-dextrano tal como se obtienen en el ejemplo 1 y tratados o no con BS3 o ionóforo (basado en los ejemplos 2-4):

25

- Lote 1: sin tratamiento
- Lote 2: BS3 1 mM
- Lote 3: BS3 5 mM
- Lote 4: ionóforo 0,2 µM
- 30 Lote 5 ionóforo 0,3 µM.

[0074] Cada lote se inyecta IV a D1 en ratones OF1. Los ratones se sacrifican 1 h 30 minutos después de la inyección, y se recuperan los hígados. La fluorescencia incorporada en los macrófagos del hígado que expresan el marcador F4/80, las células del hígado que expresan el marcador CD11b y las células dendríticas del hígado que expresan el marcador CD11c se midieron usando citometría de flujo.

35

[0075] Porcentaje de células del hígado que han fagocitado los glóbulos rojos que contienen FITC-dextrano 1 h 30 minutos después de la inyección en ratones (tabla 2):

Lotes	Macrófagos F4/80	Células CD 11b	Células dendríticas
1	7,8%	1,7%	3,4%
2	7,2%	6,4%	7,1%
3	13,0%	7,8%	10,2%
4	10,7%	6,4%	11,4%
5	7,4%	3,3%	7,2%

40

[0076] Los tratamientos con BS3 e ionóforo inducen eritrofagocitosis por macrófagos (P4/80 y CD 11b) y células dendríticas. Para el tratamiento con BS3, el porcentaje de células que fagocitan glóbulos rojos tratados es dependiente de la dosis de la cantidad de BS3 usada para el tratamiento.

45 **Ejemplo 7.** Procedimiento para encapsular ovoalbúmina en glóbulos rojos murinos y humanos

Variante 1:

[0077] Ovoalbúmina (proteína de 45 kDa, ovoalbúmina de huevo de gallina) se encapsuló en glóbulos rojos murinos (ratones OF1 o ratones C57Bl/6) mediante el procedimiento de diálisis hipotónica en tubo de diálisis. La suspensión de glóbulos rojos se lavó varias veces antes de ser llevada a un hematocrito del 70% para la diálisis. La diálisis se llevó a cabo en tubo de diálisis en un tampón de lisis de baja osmolaridad durante aproximadamente 1 hora o 30 min cuando la diálisis se producía después de un tratamiento térmico. Los glóbulos rojos se resellaron a continuación por medio de una solución de alta osmolaridad durante 30 minutos. Después de unos pocos lavados, el producto final se recogió en un tampón, Sag-manitol, y el hematocrito se llevó al 50%.

10

Variante 2:

[0078] En el presente documento se encapsuló ovoalbúmina en los glóbulos rojos murinos mediante el procedimiento de diálisis hipotónica en una columna de diálisis. La suspensión de glóbulos rojos se lavó varias veces antes de ser llevada a un hematocrito del 70% para la diálisis. La diálisis se llevó a cabo en una columna de diálisis en un tampón de lisis de baja osmolaridad durante aproximadamente 10 min. En cuanto abandonaron la columna, los glóbulos rojos fueron resellados por medio de una solución de alta osmolaridad durante 30 minutos a 37°C. Después de unos pocos lavados, el producto final se recogió en un tampón de NaCl glucosa que contenía glucosa SAG manitol, o plasma descomplementado, y el hematocrito se llevó de vuelta al 50%.

20

Ejemplo 8: procedimiento para encapsular ovoalbúmina en glóbulos rojos de ratón

[0079] Ovoalbúmina (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) se encapsuló en glóbulos rojos de ratón mediante diálisis hipotónicas. Se prepararon suspensiones de glóbulos rojos a partir de sangre de ratón C57BL/6 recogida en heparina de litio. En resumen, los glóbulos rojos se lavaron tres veces con solución salina y el hematocrito (Hct) de la sangre se ajustó al 70% antes de la diálisis. Se añadió OVA a la suspensión de glóbulos rojos a una concentración final de 5, o 0,5 mg/ml. Se realizó diálisis (caudal de células de 2 ml/min) contra un tampón de lisis celular (osmolalidad de 50 mOsmol/kg) que circula a contracorriente (15 ml/min) en un dializador de fibra hueca 80 (Gambro, Lyon, Francia). Los glóbulos rojos se resellaron "en línea" añadiendo (volumen final del 10%) una solución hipertónica (1900 mOsmol/kg) que contenía 0,4 g/l de adenina (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI), 15,6 g/l de inosina (Sigma-Aldrich), 6,4 g/l de piruvato sódico (Sigma-Aldrich), 4,9 g/l de fosfato monosódico deshidratado (Sigma-Aldrich), 10,9 g/l de fosfato disódico dodecahidratado (Sigma-Aldrich), 11,5 g/l monohidrato de glucosa (Sigma-Aldrich) y 50 g/l de NaCl (Sigma-Aldrich). Los glóbulos rojos se incubaron 30 min a 37°C con la solución hipertónica. Después de varios lavados con NaCl al 0,9%, glucosa al 0,2% (Bioluz, Saint-Jean-de-Luz, Francia), el producto se lavó una vez con el tampón A que contenía Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, BSA al 0,1%, CaCl₂ 2,5 mM, diluido con tampón A a 1x10⁶ células/μl y se tratan con 0,15 μM de ionóforo de calcio A23187 (Sigma) durante 30 min a 37°C, tal como se describe en el ejemplo 15. Después de 3 lavados con NaCl al 0,9% glucosa al 0,2%, el producto final se resuspendió y su hematocrito se ajustó al 50% con plasma de ratón C57BL/6 descomplementado (volumen final del 15%). El producto obtenido de este modo se almacenó a 2-8°C.

40

Ejemplo 9: procedimiento para encapsular ovoalbúmina en glóbulos rojos de ratón

[0080] Ovoalbúmina (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) se encapsuló en glóbulos rojos de ratón mediante diálisis hipotónica. Se prepararon suspensiones de glóbulos rojos a partir de sangre de ratón C57BL/6 recogida en heparina de litio. En resumen, los glóbulos rojos se lavaron tres veces con solución salina y el hematocrito (Hct) de la sangre se ajustó al 70% antes de la diálisis. Se añadió OVA a la suspensión de glóbulos rojos a una concentración final de 5, o 0,5 mg/ml. Se realizó diálisis (caudal de células de 2 ml/min) contra un tampón de lisis celular (osmolalidad de 50 mOsmol/kg) que circula a contracorriente (15 ml/min) en tubo de diálisis. Después de la diálisis, los glóbulos rojos se resellaron añadiendo (volumen final del 10%) una solución hipertónica (1900 mOsmol/kg) que contenía 0,4 g/l de adenina (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI), 15,6 g/l de inosina (Sigma-Aldrich), 6,4 g/l de piruvato sódico (Sigma-Aldrich), 4,9 g/l de fosfato monosódico deshidratado (Sigma-Aldrich), 10,9 g/l de fosfato disódico dodecahidratado (Sigma-Aldrich), 11,5 g/l de monohidrato de glucosa (Sigma-Aldrich) y 50 g/l NaCl (Sigma-Aldrich). Se incubaron glóbulos rojos 30 min a 37°C con la solución hipertónica y a continuación se trataron químicamente con BS3, tal como se describe en el ejemplo 14.

55

[0081] Después de varios lavados con NaCl al 0,9%, glucosa al 0,2% (Bioluz, Saint-Jean-de-Luz, Francia), el producto final se resuspendió y su hematocrito se ajustó al 50% con plasma de ratón C57BL/6 descomplementado (volumen final del 15%). El producto obtenido de este modo se almacenó a 2-8°C.

Ejemplo 10. Tratamiento con anticuerpos sobre los glóbulos rojos que contienen ovoalbúmina

[0082] La suspensión de glóbulos rojos que encapsulan ovoalbúmina se lava varias veces antes de llevarla a 109 células/ml para el ensayo in vivo y 108 células/ml para el ensayo in vitro. Se incuba con el anticuerpo anti-TER119 (1,0 µg/ml para el ensayo in vitro y 23 µg/ml o 5 µg/ml para el ensayo in vivo) durante 30 minutos a 4°C. Después de unos pocos lavados, el producto final se recoge en un tampón con cualidades inyectables, y el hematocrito se lleva al 50%.

Ejemplo 11. Medición de la fagocitosis de glóbulos rojos que contienen ovoalbúmina mediante células dendríticas in vitro

[0083] El efecto del tratamiento con anticuerpos sobre la eficiencia de fagocitosis de los glóbulos rojos obtenidos de acuerdo con el ejemplo 9, mediante células dendríticas, se mide in vitro. Los glóbulos rojos se marcan con una marca fluorescente, CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína), durante 20 min a 4°C. La CFSE es un colorante no fluorescente que se difunde a través de la membrana celular. Una vez dentro de la célula, la molécula se vuelve fluorescente posteriormente a su escisión mediante esterasas intracelulares.

[0084] Las células dendríticas se aíslan del bazo de ratones C57Bl/6 usando perlas magnéticas. Estas perlas portan anticuerpos que reconocen el marcador CD11c, haciendo posible de este modo aislar la fracción de células dendríticas CD11c*.

[0085] Los glóbulos rojos marcados con CFSE o sin marcar, se incuban a continuación con las células dendríticas (10 × 10⁶ células/ml) a una relación de 20:1 en un volumen final de 200 µl/pocillo de placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo durante 4 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Después de cultivar durante 4 horas, los glóbulos rojos no ingeridos por las células dendríticas se lisan con NH₄Cl, y se llevan a cabo varios lavados. La captura del fluoróforo CFSE por las células dendríticas se mide a continuación mediante citometría de flujo (R. Segura y col., J. Immunol, enero de 2006, 176(1): 441-50).

[0086] Se ensayaron tres poblaciones de glóbulos rojos:

- (A) glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina y no marcados con el fluoróforo CFSE.
- (B) glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina y marcados con CFSE.
- (C) glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina, tratados con el anticuerpo anti-TER 119 y marcados con CFSE.

Resultados

[0087]

Tabla 3: porcentaje de células dendríticas que tienen glóbulos rojos fluorescentes fagocitados:

<i>Población de glóbulos rojos</i>	<i>% de células dendríticas</i>
(A)	4%
(B)	27%
(C)	36%

[0088] Los glóbulos rojos murinos cargados con ovoalbúmina y tratados con el anticuerpo anti-TER 119 fueron fagocitados de forma más eficiente por las células dendríticas aisladas del bazo que los glóbulos rojos no tratados in vitro, después de 4 horas de cocultivo. El 36% de las células dendríticas fagocitaron los glóbulos rojos que portan el anticuerpo, frente a solamente el 27% en ausencia de anticuerpo.

Ejemplo 12. Medición de la fagocitosis de glóbulos rojos que contienen ovoalbúmina, por macrófagos y células dendríticas del bazo y el hígado in vivo en ratones

[0089] Este estudio es un estudio alógeno dado que glóbulos rojos de ratones OF1 que contienen ovoalbúmina se inyectan en ratones C57Bl/6 no consanguíneos.

[0090] Se preparan tres lotes de 74 × 10⁷ glóbulos rojos, de ratones OF1, cargados con ovoalbúmina (ejemplo 9) tratados con el anticuerpo anti-TER 119 (tal como se describe en el ejemplo 10) o no tratados. Estos lotes se dividen de la siguiente manera:

Lote 1: sin tratamiento con anticuerpo
 Lote 2: tratado con el anticuerpo anti-TER 119.

5 **[0091]** Cada lote se marca con CFSE y se inyecta por vía intravenosa en ratones C57Bl/6. Tres horas después de la inyección, se recogen la sangre, el bazo y el hígado de los ratones. El porcentaje de glóbulos rojos fluorescentes que circulan en la sangre de los ratones se mide mediante citometría de flujo. La fluorescencia incorporada en los macrófagos de bazo que expresan el marcador F4/80, en los macrófagos del hígado que expresan el marcador F4/80 y en las células dendríticas del bazo que expresan el marcador CD11c se mide mediante citometría de flujo.

10

Resultados

[0092]

15 Tabla 4: porcentaje de macrófagos o células dendríticas del bazo, que han fagocitado glóbulos rojos fluorescentes 3 horas después de la inyección en el ratón:

Lotes	Macrófagos	Células dendríticas
1	28%	5%
2	81%	11 22%

20 **[0093]** 3 horas después de la inyección, los glóbulos rojos murinos cargados con ovoalbúmina y tratados con el anticuerpo anti-TER 119 ya casi no están presentes en la sangre del ratón (1%), mientras que aún hay glóbulos rojos no tratados, cargados de ovoalbúmina en la sangre del ratón (4,6%).

25 **[0094]** Los glóbulos rojos que han sido tratados con el anticuerpo anti-TER 119 son fagocitados por los macrófagos F4/80 y las células dendríticas CD11c del bazo.

[0095] Los glóbulos rojos tratados con el anticuerpo anti-TER 119 fueron fagocitados de forma más eficiente por los macrófagos F4/80 del bazo que los glóbulos rojos no tratados. El 81% de los macrófagos del bazo fagocitaron los glóbulos rojos tratados con anticuerpo, frente a solamente el 28% en el lote no tratado (tabla 4).

30 **[0096]** Los glóbulos rojos tratados con anticuerpo fueron también fagocitados de forma más eficiente por las células dendríticas CD11c del bazo que los glóbulos rojos no tratados. Respectivamente, el 22% de las células dendríticas fagocitaron los glóbulos rojos tratados con anticuerpo frente a solamente el 5% en el caso de los glóbulos rojos no tratados (tabla 4).

35 Tabla 5: porcentaje de macrófagos del hígado que han fagocitado glóbulos rojos fluorescentes 3 horas después de la inyección en el ratón.

Lotes	Macrófagos
1	24%
2	50%

40 **[0097]** Los glóbulos rojos tratados con el anticuerpo anti-TER 119 son fagocitados por los macrófagos F4/80 del hígado.

[0098] Los glóbulos rojos tratados con el anticuerpo anti-TER 119 fueron fagocitados de forma más eficiente por los macrófagos F4/80 del hígado que los glóbulos rojos no tratados. El 50% de los macrófagos del hígado fagocitaron los glóbulos rojos tratados con anticuerpo, frente a solamente el 24% en el lote no tratado (tabla 5).

45

[0099] En conclusión, la unión del anticuerpo a los glóbulos rojos permitía el direccionamiento eficiente a los glóbulos rojos en el bazo y el hígado, y un incremento significativo del porcentaje de células dendríticas y de macrófagos capaces de fagocitar estos glóbulos rojos.

50 **Ejemplo 13.** Medida del porcentaje de células T reguladoras y su producción de interleuquina-10 antiinflamatoria (IL-10) después de una inyección de Poli(I:C) y eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados con anticuerpo o no tratados en ratones

[0100] El propósito de este estudio era medir el porcentaje de células T reguladoras en ratones C57Bl/6 después de la inyección de Poli(I:C) y eritrocitos cargados de ovoalbúmina tratados con anticuerpo (anti-TER 119) o no tratados.

5 **[0101]** Dos lotes de 30×10^7 eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados con anticuerpo o no tratados de ratones OF1 se prepararon de acuerdo con el ejemplo 8. En este estudio, una cantidad equivalente de ovoalbúmina atrapada se inyectó libre y el control negativo era la solución conservante de eritrocitos (NaCl glucosado que contenía el 33% de plasma de ratones descomplementado). La cantidad de OVA libre o atrapada inyectada a ratones fue de 2 μ g. La cantidad de Poli(I:C) libre inyectada a ratones fue de 25 μ g.

10

Lote 1: eritrocitos cargados con ovoalbúmina y Poli(I:C)

Lote 2: eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados con anticuerpo y Poli(I:C)

15 **[0102]** Los lotes se inyectaron por vía intravenosa a ratones C57Bl/6 (4 ratones por grupo). Siete días después de la inyección del lote, los ratones fueron sacrificados y sus bazo se recogieron. Para medir el porcentaje de células T CD4+ que expresan FOXP3 por citometría de flujo (figura 1, tabla 6), se usaron $2,5 \times 10^6$ células del bazo. En resumen, después de lisis de los GR usando solución de NH₄Cl (StemCell Technologies, número de catálogo 7850). Las células del bazo se tiñeron en primer lugar con anticuerpos monoclonales PC5-anti-CD4 (Biolegend, número de catálogo BLE100514) y FITC-anti-CD25 (Biolegend, número de catálogo BLE110569), y a continuación se incubaron con tampones de fijación y permeabilización (Biolegend, número de catálogo 421303) antes de ser incubadas con mAb PE-anti-FOXP3 (Biolegend, número de catálogo 320008) o control con isotipo.

25 **[0103]** Para medir el porcentaje de células T reguladoras (CD4+ CD25+) que producen IL-10 por citometría de flujo (figura 2), células del bazo (5×10^6 células/ml) se cultivaron con 0,1 μ g/ml de péptido OVA323-339 (Genscript, número de catálogo 41007-1) durante 4 horas a 37°C en CO₂ al 5%-aire en placas de cultivo de 24 pocillos. Una hora después del comienzo del cultivo, se añadió Brefeldina A (Ebioscience, número de catálogo 420601) para bloquear la secreción de citoquina. Al final del cultivo, las células se tiñeron en primer lugar con anticuerpos monoclonales PC5-anti-CD4 y FITC-anti-CD25, y a continuación se incubaron con tampón de fijación (Biolegend, número de catálogo 420801), y tampón de permeabilización (Biolegend, número de catálogo 421002) antes de ser incubadas con mAb PE-anti-IL-10 (Biolegend, número de catálogo 505008) o control con isotipo.

30 **[0104]** El porcentaje de células T CD4 reguladoras que expresan el factor de transcripción FOXP3 se había incrementado significativamente después de la inyección de Poli(I:C) y eritrocitos cargados con OVA tratados con anticuerpo u OVA libre se compararon para controlar ratones inyectados con la solución conservante (figura 1., tabla 6, test de Student, $p < 0,007$ y $p < 0,05$ respectivamente).

Tabla 6: porcentaje de células T CD4 que expresan FOXP3

ELEMENTO	% de células T CD4 que expresan FOXP3 (\pm desviación estándar)
Lote 1	9,3 \pm 1,1
Lote 2	11,6 \pm 0,9
OVA libre y Poli(I:C)	8,6 \pm 1,5
Solución conservante	7,0 \pm 1,7

40

[0105] No obstante, solamente células T reguladoras inducidas por inyección de eritrocitos cargados con OVA, tratados con anticuerpo y Poli(I:C) pueden producir la citoquina antiinflamatoria (IL-10) después de reestimulación in vitro con péptido OVA (figura 2, tabla 7).

45

Tabla 7: porcentaje de células T CD4+ CD25+ reguladoras que producen IL-10

ELEMENTOS	% de células CD4 CD25 que producen IL-10 (\pm desviación estándar)
Lote 1	1,8 \pm 0,5
Lote 2	5,5 \pm 2
OVA libre y Poli(I:C)	1,7 \pm 0,6
Solución conservante	1,6 \pm 0,4

[0106] En resumen, la inyección de eritrocitos cargados con OVA y tratados con anticuerpo y Poli(I:C) indujo

la generación de células T reguladoras capaces de producir IL-10 después de reestimulación con antígeno.

[0107] En la figura 1, el porcentaje de células T CD4⁺ FOXP3⁺ en el bazo se determinó por citometría de flujo 7 días después de inyección intravenosa en ratones C57BL/6 de eritrocitos cargados con OVA tratados con anticuerpo (barras de color negro) o no tratados (barras de color gris oscuro) y Poli(I:C) u OVA libre y Poli(I:C) (barras de color gris claro), o medio de control (barras de color blanco). La cantidad de OVA libre o atrapada inyectada a ratones fue de 2 µg y la cantidad de Poli(I:C) fue de 25 µg.

[0108] En la figura 2, la producción de IL-10 por células T CD4⁺ CD25⁺ reguladoras se determinó por citometría de flujo después de reestimulación in vitro con péptido OVA, 0,1 µg/ml de células del bazo aisladas de ratones C57BL/6 se inyectaron 7 días con eritrocitos cargados con OVA tratados con anticuerpo (barras de color negro) o no tratadas (barras de color gris oscuro) y Poli(I:C) u OVA libre (barras de color gris claro) y Poli(I:C), o medio de control (barras de color blanco). La cantidad de OVA libre o atrapada inyectada a ratones fue de 2 µg y la cantidad de Poli(I:C) fue de 25 µg.

Ejemplo 14. Tratamiento con BS3 sobre los glóbulos rojos que contiene ovoalbúmina

[0109] La suspensión de glóbulos rojos que encapsulan OVA (ejemplo 8) se lavó varias veces antes de ser llevada a 1,7x10⁶ células/µl con PBS y se mezcló con un volumen de una solución tampón de BS3 2 mM (la solución de BS3 contenía glucosa al 0,09% y tampón fosfato, pH 7,4), para obtener una concentración de BS3 final de 1 mM. Las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se inactivó añadiendo un volumen de Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM. Después de incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos, la mezcla se centrifugó a 800 g durante 5 min, 4°C. Las células se lavaron a continuación tres veces con NaCl glucosa (centrifugado a 800 g) durante 10 min, antes del ajuste a hematocrito al 50% con plasma descomplementado.

Ejemplo 15. Tratamiento con ionóforo sobre los glóbulos rojos que contienen ovoalbúmina

[0110] La suspensión de glóbulos rojos que encapsula OVA (ejemplo 8) se lavó una vez con un tampón A que contenía Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, BSA al 0,1%. CaCl₂ 2,5 mM, y a continuación la suspensión se diluyó a 1x10⁸ células/µl usando tampón A. Ionóforo concentrado en DMSO se diluyó con tampón A y a continuación se añadió a la suspensión celular con el fin de conseguir una concentración final de 0,15 µM. Las células se incubaron 30 min a 37°C. La mezcla se centrifugó a 800 g durante 6 min, 4°C. Las células se lavaron a continuación tres veces con NaCl glucosa (centrifugado a 800 g) durante 10 min, antes del ajuste a hematocrito al 50% con plasma descomplementado.

Ejemplo 16. Medida del porcentaje de células T reguladoras en el hígado y en los bazos después de una inyección de eritrocitos cargados con ovoalbúmina en ratones tratados para direccionar al hígado y/o para reprimir la respuesta proinflamación de CPA

[0111] El propósito de este estudio era demostrar que el uso de GR, tratados para dirigirse al hígado y para reprimir las respuestas proinflamación de CPA, como sistema de suministro de antígenos inducía un incremento en el porcentaje de células T reguladoras en ratones.

[0112] Lotes de 126x10⁷ eritrocitos tratados con anticuerpo cargados con ovoalbúmina, tratados con BS3 o tratados con ionóforo, de ratones C57BL/6 se prepararon de acuerdo con el ejemplo 8. La cantidad de OVA atrapada inyectada a ratones fue de 8 µg.

Lote 1: eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados con ionóforo

Lote 2: eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados con BS3

Lote 3: eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados con anticuerpo

Lote 4: eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados con anticuerpo y Poli(I:C)

[0113] Los lotes se inyectaron por vía intravenosa a ratones C57BL/6 (3 ratones por grupo). Siete días después de la inyección del lote, los ratones fueron sacrificados y se recogieron sus bazos e hígados. Para medir el porcentaje de células T CD4⁺ que expresan FOXP3 por citometría de flujo en el bazo (figura 3, tabla 8) y en el hígado (figura 4, tabla 8), se usaron 1x10⁶ y 2,5x10⁶ de células del hígado y células del bazo. En resumen, después de lisis de GR usando solución de NH₄Cl (StemCell Technologies, n.º de cat. 7850), las células se tiñeron en primer lugar con anticuerpos monoclonales PC5-anti-CD4 (Biolegend, n.º de cat. BLE100514) y FITC-anti-CD25 (Biolegend,

n.º de cat. BLE110569), y a continuación se incubaron con tampones de fijación y permeabilización (Biolegend, n.º de cat. 421303) antes de ser incubadas con mAb PE-anti-FOXP3 (Biolegend, n.º de cat. 320008) o control con isotipo.

5 **[0114]** En la figura 3, el porcentaje de células T CD4+ FOXP3+ en el bazo se determinó por citometría de flujo 7 días después de inyección intravenosa en ratones C57BL/6 de eritrocitos cargados con OVA tratados con ionóforo (barra de color gris oscuro), tratados con BS3 (barra de color gris) o tratados con anticuerpo (barra de color gris claro) o eritrocitos cargados con OVA tratados con anticuerpo y Poli(I:C) (barra de color negro) o medio de control (barra de color blanco). La cantidad de OVA atrapada inyectada a ratones fue de 8 µg.

10 **[0115]** En la figura 4, el porcentaje de células T CD4+ FOXP3+ en el hígado se determinó por citometría de flujo 7 días después de inyección intravenosa en ratones C57BL/6 de eritrocitos cargados con OVA tratados con ionóforo (barra de color gris oscuro), tratados con BS3 (barra de color gris) o tratados con anticuerpo (barra de color gris claro) o eritrocitos cargados con OVA tratados con anticuerpo y Poli(I:C) (barra de color negro) o medio de control (barra de color blanco). La cantidad de OVA atrapada inyectada a ratones fue de 8 µg.

[0116] Para medir el porcentaje de células T CD8 específicas de OVA por citometría de flujo (figura 5, tabla 9), se tiñeron células del bazo con anticuerpos monoclonales PC7-anti-CD8 (Biolegend, n.º de cat. BLE100722), FITC-anti-CD3 (Biolegend, n.º de cat. BLE100203) y PC5-anti-CD62L (Biolegend, n.º de cat. BLE104410) y PE-OVA-tetrámero (Beckman Coulter, n.º de cat. T20076).

25 **[0117]** En la figura 5, el porcentaje de células T CD8+ específicas de OVA en el bazo se determinó por citometría de flujo 7 días después de inyección intravenosa en ratones C57BL/6 de eritrocitos cargados con OVA tratados con ionóforo (barra gris oscura), tratados con BS3 (barra gris) o tratados con anticuerpo (barra gris clara) o eritrocitos cargados con OVA tratados con anticuerpo y Poli(I:C) (barra negra) o medio de control (barra blanca). La cantidad de OVA atrapada inyectada a ratones fue de 8 µg.

30 **[0118]** Para medir el porcentaje de células T reguladoras (CD4+ CD25+) que producen IL-10 por citometría de flujo (tabla 10), células del bazo (5 x 10⁶ células/ml) se cultivaron con 0,1 µg/ml de péptido OVA323-339 (Genscript, n.º de cat. 4100T-1) o sin péptido durante 4 horas a 37°C en CO₂ al 5%-aire en placas de cultivo de 24 pocillos. Una hora después del comienzo del cultivo, se añadió Brefeldina A (Ebioscience, n.º de cat. 420601) para bloquear la secreción de citoquina. Al final del cultivo, las células se tiñeron en primer lugar con anticuerpos monoclonales PC5-anti-CD4 y FITC-anti-CD25, y a continuación se incubaron con tampón de fijación (Biolegend, n.º de cat. 420801), y tampón de permeabilización (Biolegend, n.º de cat. 421002) antes de ser incubadas con mAb PE-anti-IL-10 (Biolegend, n.º de cat. 505008) o control con isotipo.

40 **[0119]** El tratamiento con ionóforo fue el único tratamiento capaz de inducir un incremento significativo de células T CD4 reguladoras que expresan FOXP3 tanto en el bazo como en el hígado (tabla 8 y figuras 3 y 4, p < 0,05). El tratamiento con anticuerpo fue capaz de inducir un incremento significativo de células T CD4 reguladoras que expresan FOXP3 en el bazo solamente (tabla 8, figura 3, p < 0,05).

Tabla 8: porcentaje de células T CD4+ FOXP3 reguladoras en el bazo y el hígado

ELEMENTOS	% de CD4 que expresan FOXP3 en el bazo (± desviación estándar)	% de CD4 que expresan FOXP3 en el hígado (± desviación estándar)
Lote 1	20 ± 3	5 ± 1
Lote 2	17 ± 3	2 ± 1
Lote 3	21 ± 0	3 ± 1
Lote 4	14 ± 2	2 ± 1
Solución conservante	12 ± 2	2 ± 0

45 **[0120]** Solamente la coinyección de GR cargados con OVA, tratados con Ab y Poli(I:C) indujo un incremento del porcentaje de células T CD8 específicas de OVA (tabla 9, figura 5).

Tabla 9: porcentaje de células T CD8+ específicas de OVA en el bazo

ELEMENTOS	% de células T CD8 específicas de OVA (\pm desviación estándar)
Lote 1	2 \pm 0
Lote 2	2 \pm 0
Lote 3	3 \pm 1
Lote 4	16 \pm 7
Solución conservante	2 \pm 0

[0121] Solamente la coinyección de GR cargados con OVA, tratados con Ab y Poli(I:C) indujo un incremento del porcentaje de T CD4+ CD25+ que producen IL-10 en el bazo y esta producción no era específica de OVA (tabla 10).

Tabla 10: porcentaje de T CD4+ CD25+ reguladoras que producen IL-10 en el bazo

ELEMENTOS	Reestimulación con péptido OVA (\pm desviación estándar)	Reestimulación sin péptido OVA (\pm desviación estándar)
Lote 1	5 \pm 1	6 \pm 1
Lote 2	4 \pm 0	7 \pm 7
Lote 3	7 \pm 6	9 \pm 1
Lote 4	16 \pm 5	21 \pm 7
Solución conservante	4 \pm 1	7 \pm 1

10

Ejemplo 17. Medida de la tolerancia inmunitaria a OVA después de tres inyecciones de eritrocitos cargados con ovoalbúmina en ratones tratados para dirigirse al hígado y reprimir la respuesta proinflamación de CPA

[0122] El propósito de este estudio era demostrar que inyecciones de GR cargados con OVA, tratados para dirigirse al hígado y reprimir la respuesta proinflamación de CPA, inhibían las respuestas de células T y B OVA inducidas por OVA y Poli(I:C).

[0123] Antes del tratamiento, se recogieron muestras de sangre (200 μ l) de los ratones C57BL/6 mediante punción retro-orbital en tubo con gel separador de suero (Becton Dickinson, Microtainer TM SST, ref 365951) para obtener los sueros preinmunización. A los ratones se les inyectó a continuación por vía intravenosa tres veces los días -7, -3 y -1 con medio de control, OVA libre o un lote de eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados con ionóforo preparado con sangre de ratones C57BL/6 y de acuerdo con el ejemplo 8 (3 a 4 ratones por grupo). La cantidad de OVA libre y atrapada inyectada a ratones fue de 120 y 90 μ g, respectivamente. El día 0 y 21, los ratones fueron provocados con OVA y Poli(I:C) (100 μ g y 50 μ g/ratón, respectivamente). Algunos ratones recibieron el medio de control solamente. Seis días después de la última inyección, se recogieron muestras de sangre (200 μ l) de los ratones para obtener los sueros postinmunización y una suspensión de esplenocitos de C57BL/6 marcados con CFSE que presentan o no el péptido OVA257-264 a una relación 1:1 se inyectaron a los ratones para evaluar la capacidad de células T CD8 citotóxicas para lisar células SIINFEKL. 16 horas después de la inyección de células OVA257-264, los ratones fueron sacrificados y sus bazos se recogieron.

30

[0124] Para medir el porcentaje de células T CD8 activadas y específicas de OVA por citometría de flujo (tabla 11), se tiñeron células del bazo con anticuerpos monoclonales PC7-anti-CD8 (Biolegend, n.º de cat. BLE100722), FITC-anti-CD3 (Biolegend, n.º de cat. BLE100203) y PC5-anti-CD62L (Biolegend, n.º de cat. BLE104410) y PE-OVA-tetrámero (Beckman Coulter, n.º de cat. T20076).

35

[0125] Para medir el porcentaje de lisis in vivo específica de OVA (tabla 12), el porcentaje de células CFSElow (con poca cantidad de CFSE) y CFSEhigh (con gran cantidad de CFSE) se midieron por citometría de flujo y se determinaron mediante la siguiente fórmula:

40 % = [1 - (relación de ratones tratados/relación de ratones no tratados)] \times 100, con relación = porcentaje de CFSEhigh/porcentaje de CFSElow

[0126] Para medir el valor cuantitativo de IgG1 e IgG2a anti-OVA en los sueros (tabla 13), diversas diluciones de los sueros pre- y postinmunización (de 1/50 a 1/36450) se incubaron en placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, n.º de cat. 442404) revestidas previamente con OVA (Serlabo, n.º de cat. WQ-LS003054, 5 μ g/ml). La presencia de

45

IgG1 e IgG2a anti-OVA se reveló mediante incubación de peroxidasa de rábano picante (HRP)-conjugada a IgG1 anti-ratón (Thermo Scientific, n.º de cat. PA1-86031, dilución 1/4000) o IgG2a anti-ratón (Thermo Scientific, n.º de cat. PA1-86039, dilución 1/4000) seguida por la incubación en sustrato tetrametilbencidina (TMB) (Biolegend, n.º de cat. 421101). La reacción se interrumpió mediante una solución de H2SO4 2 N y la densidad óptica se midió a 450 nm y 630 nm usando un lector de placas (Biotek, n.º de cat. ELx808). Los datos obtenidos a 630 nm se restaron de los datos obtenidos a 450 nm y el valor cuantitativo de anticuerpo se determinó como la dilución para la cual la densidad óptica es mayor que 3 veces la D.O. obtenida para los sueros preinmunización diluidos a 1/50.

[0127] Las inyecciones de GR cargados con OVA tratados con ionóforo fueron capaces de reducir significativamente la proliferación y activación de células T CD8 específicas de OVA inducida por OVA y Poli(I:C) en comparación con las inyecciones de OVA (tabla 11; $p < 0,05$).

Tabla 11: porcentaje de células T CD8+ activadas y específicas de OVA en el bazo

Tratamiento de los ratones	% de células T CD8 específicas de OVA (\pm desviación estándar)	% de células T CD8 específicas de OVA activadas (\pm desviación estándar)
3x Lote + 2xOVA y Poli(I:C)	1,5 \pm 0,1	19 \pm 9
3x OVA + 2xOVA y Poli(I:C)	2,1 \pm 0,9	45 \pm 15
2 x OVA y Poli(I:C)	4,8 \pm 1,3	76 \pm 7
Solución conservante	1,1 \pm 0,1	6 \pm 3

15

[0128] Las inyecciones de GR cargados con OVA tratados con ionóforo fueron capaces de reducir significativamente la lisis celular específica de OVA inducida por OVA y Poli(I:C) (tabla 12; $p < 0,01$).

Tabla 12: Porcentaje de lisis *in vivo* específica de OVA

Tratamiento de los ratones	% de lisis <i>in vivo</i> específica de OVA (\pm desviación estándar)
3x Lote + 2xOVA y Poli(I:C)	61 \pm 15
3x OVA + 2xOVA y Poli(I:C)	73 \pm 19
2 x OVA y Poli(I:C)	98 \pm 1
Solución conservante	1 \pm 2

20

[0129] Ratones pretratados con GR cargados con OVA tratados con ionóforo presentaban valores cuantitativos de anticuerpo IgG1 e IgG2a anti-OVA muy bajos y/o ninguno en comparación con ratones pretratados con OVA (tabla 13).

25

Tabla 13: Valor cuantitativo de anticuerpo IgG1 1 e IgG2a anti-OVA en los sueros

Tratamiento de los ratones	Resultados para cada ratón	
	Valor cuantitativo de IgG1 anti-OVA	Valor cuantitativo de IgG2a anti-OVA
3x Lote + 2xOVA y Poli(I:C)	0	0
	900	0
	100	0
	100	0
3x OVA + 2xOVA y Poli(I:C)	12150	2700
	20250	450
	4050	900
	300	0
2 x OVA y Poli(I:C)	12150	8100
	1350	0
	150	150
Solución conservante	0	0
	0	0
	0	0
	0	0

Ejemplo 18. Medida de la tolerancia inmunitaria a OVA después de inyecciones de diversas cantidades de eritrocitos cargados con ovoalbúmina en ratones

[0130] El experimento se realizó tal como se describe en el ejemplo 17, excepto que se prepararon 2 lotes diferentes de eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados con ionóforo con 2 diferentes concentraciones de OVA, conduciendo a un lote, el lote 1, con 53250 ± 6800 moléculas de OVA por GR como en el ejemplo 17 y otro lote, el lote 2 con 8250 ± 840 moléculas por GR.

[0131] A ratones C57Bl/6 se les inyectó por vía intravenosa tres veces los días -7, -3 y ~1 con 110 μ l o 30 μ l del lote 1, 110 μ l del lote 2, 110 μ l de OVA libre o 110 μ l de solución conservante. La cantidad de OVA y GR inyectada a ratones se presentan en la tabla 14. El día 0 y el día 21, los ratones fueron provocados con OVA y Poli(I:C) (100 μ g y 50 μ g/ratón, respectivamente). Seis días después de la última inyección, los ratones fueron sacrificados, los bazos se recogieron y la cantidad de IgG1, IgG2b e IgG2c se midió en los sueros, tal como se describe en el ejemplo 17, usando HRP conjugada a IgG2b anti-ratón (Southern Biotech, 1090-05) e IgG2c anti-ratón (Southern Biotech, 1079-05). Para medir la producción de IFNY, células del bazo (5×10^6 células/ml) se cultivaron en primer lugar con 0,1 μ g/ml de péptido OVA323-339 (Genscript, n.º de cat. 41007-1) o sin péptido durante 48 horas a 37°C en CO2 al 5%-aire en placas de cultivo de 24 pocillos. A continuación, se midió IFNY en el sobrenadante por citometría de flujo usando la matriz Cytometric Bead Array (BD Bioscience, 558296 y 558266). Para medir el porcentaje de antígeno 4 de linfocito T citotóxico (CTLA-4) que expresan células T CD4+ CD25+ por citometría de flujo, células del bazo se tiñeron en primer lugar con anticuerpos monoclonales PC5-anti-CD4 (Biolegend, n.º de cat. BLE100514) y FITC-anti-CD25 (Biolegend, n.º de cat. BLE110569), y a continuación se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS (Sigma Aldrich, F1635-25ml) y se permeabilizaron con saponina al 0,3% (Sigma Aldrich, 84510) antes de ser incubadas con mAb PE-anti-CTLA-4 (BD Pharmingen, n.º de cat. 553720) o control con isotipo.

25

Tabla 14: cantidades de OVA y GR inyectadas a ratones en cada inyección

Tratamiento de los ratones	OVA (μ g/ratón)			GR cargados con OVA ($\times 10^9$ GR/ratón)		
	1	2	3	1	2	3
Número de inyección	1	2	3	1	2	3
Lote 1 dosis alta (110 μ l/ratón)	99	86	86	1,7	1,5	1,5
Lote 1 dosis baja (30 μ l/ratón)	24	23	23	0,4	0,4	0,4
Lote 2 (110 μ l/ratón)	11	8	11	1,6	1,6	1,6
OVA (110 μ l/ratón)	110	110	113			

[0132] Ratones pretratados con lote 1 dosis alta, cantidad elevada de OVA y GR, presentaban valores cuantitativos de anticuerpo IgG1, IgG2b e IgG2c anti-OVA significativamente más bajos que ratones pretratados con OVA (tabla 15, IgG1: $p < 0,002$, IgG2b e IgG2c: $p \leq 0,05$). Además, ratones pretratados con lote 2, mismo número de GR pero dosis más baja de OVA (8 a 11 μ g/ratón), presentaban también valores cuantitativos de anticuerpo IgG1 e IgG2c anti-OVA significativamente más bajos que ratones pretratados con OVA (tabla 15, IgG1: $p < 0,006$, e IgG2c: $p \leq 0,05$). Sin embargo, ratones pretratados con lote 1 dosis baja, cantidad pequeña de OVA y GR, presentaban valores cuantitativos de anticuerpo significativos. Por lo tanto, la cantidad de OVA y GR inyectada por ratón desempeña un papel clave en la inducción de tolerancia inmunitaria.

40

Tabla 15: Valor cuantitativo de anticuerpo IgG1, IgG2b e IgG2c anti-OVA en los sueros

Tratamiento de los ratones	Valor cuantitativo de IgG para cada ratón		
	Valor cuantitativo de IgG1 anti-OVA	Valor cuantitativo de IgG2b anti-OVA	Valor cuantitativo de IgG2c anti-OVA
3x Lote1 dosis alta + 2xOVA y Poli(I:C)	900	8100	2700
	4050	450	2700
	50	300	100
	12150	900	1350
3x Lote1 dosis baja + 2xOVA y Poli(I:C)	36450	27.00	24300
	12150	12150	24300
	12150	2700	36450
3x Lote2 + 2xOVA y	0	0	300

Poli(I:C)	2700 8100	24300 4050	8100 900
3x OVA + 2xOVA y Poli(I:C)	36450 36450 36450 36450	36450 2700 36450 36450	36450 2700 36450 36450
2 x OVA y Poli(I:C)	36450 12150 1350 8100	2700 8100 12150 24300	4050 12150 12150 36450
Solución conservante	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0

[0133] La provocación con OVA y Poli(I:C) indujo un incremento de la producción de IFN γ en respuesta a la estimulación con OVA. Este incremento se observó en los ratones pretratados con OVA libre pero no con ratones pretratados con GR cargados con OVA tratados con ionóforo, tabla 16, ($p < 0,005$).

5

Tabla 16: producción de IFN γ por esplenocitos estimulados con péptido restringido con OVA de clase 2 (media \pm desviación estándar)

Tratamiento de los ratones	IFN γ (pg/ml)
3x Lote1 dosis alta + 2xOVA y Poli(I:C)	43 \pm 6
3x Lote 1 dosis baja + 2xOVA y Poli(I:C)	38 \pm 18
3x Lote2 + 2xOVA y Poli(I:C)	41 \pm 10
3x OVA + 2xOVA y Poli(I:C)	82 \pm 9
2 x OVA y Poli(I:C)	90 \pm 36
Solución conservante	47 \pm 25

10 **[0134]** Dado que CTLA-4 es una proteína que desempeña un importante papel regulador en el sistema inmunitario mediante la transmisión de una señal inhibitoria a células T, su expresión se midió en células T CD4 CD25 reguladoras por citometría de flujo. Los ratones pretratados con el lote 1 dosis alta y el lote 2 presentaban un porcentaje de expresión de CTLA-4 significativamente mayor en células T CD4 CD25 reguladoras que los ratones pretratados con OVA y los ratones que habían recibido la provocación con OVA + Poli(I:C) solamente (tabla 17, lote 1: $p \leq 0,03$ y $p \leq 0,02$, respectivamente y lote 2: $p \leq 0,05$). Además, los ratones pretratados con el lote 1 dosis alta presentaban también una intensidad de fluorescencia media (MFI) significativamente mayor de expresión de CTLA-4 en células T CD4 CD25 reguladoras (tabla 17, $p \leq 0,03$). Finalmente, los ratones pretratados con lote 1 dosis baja presentaban un porcentaje de expresión de CTLA-4 en células T CD4 CD25 reguladoras significativamente mayor que ratones que habían recibido la provocación con OVA + Poli(I:C) solamente (tabla 17, $p \leq 0,04$).

15

Tabla 17: Porcentaje e intensidad de fluorescencia media (MFI) de CTLA-4 en células T CD4 CD25 reguladoras (media \pm desviación estándar)

Tratamiento de los ratones	% de células CTLA-4+ en células T CD4 CD25	MFI de CTLA-4 en células T CD4 CD25
3x Lote 1 dosis alta + 2xOVA y Poli(I:C)	38 \pm 3	361 \pm 12
3x Lote 1 dosis baja + 2xOVA y Poli(I:C)	38 \pm 3	363 \pm 13
3x Lote 2 +2xOVA y Poli(I:C)	37 \pm 2	357 \pm 10
3x OVA + 2xOVA y Poli(I:C)	32 \pm 3	341 \pm 15
2 x OVA y Poli(I:C)	31 \pm 3	341 \pm 6
Solución conservante	34 \pm 6	348 \pm 26

25 **[0135]** En conclusión, el tratamiento con GR cargados con antígeno, tratados con ionóforo permite prevenir o reducir la respuesta de células T y B específicas de antígeno en un modelo preventivo. No solamente la cantidad de

antígeno, sino también la cantidad de GR inyectada por ratón desempeña un papel clave en esta terapia.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende glóbulos rojos que encapsulan un principio activo peptídico o proteico seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 5
- un péptido, polipéptido o proteína terapéutica,
 - un autoantígeno peptídico o proteico,
 - un antígeno peptídico o proteico de trasplante, y
 - un péptido, polipéptido o proteína que induce una reacción alérgica,
- 10 para uso para inducir, en un huésped, una tolerancia inmunitaria a dicho principio activo peptídico o proteico.
2. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido, polipéptido o proteína terapéutica es un anticuerpo o un fragmento del mismo, un factor de coagulación o un fragmento del mismo, una enzima o un fragmento de la misma o un factor de crecimiento o un fragmento del mismo.
- 15
3. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el principio activo es una enzima para uso en terapia enzimática sustitutiva (TES).
- 20
4. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el principio activo es una enzima lisosómica.
5. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la enzima lisosómica es una enzima para terapia sustitutiva (TES) en enfermedad de Pompe (Enfermedad de almacenamiento glucógeno de tipo II), enfermedad de Fabry o trastornos de mucopolisacaridosis MPS I.
- 25
6. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la enzima lisosómica se selecciona entre el grupo que consiste en enzima alfa-glucosidasa, laronidasa y alfa-galactosidasa A y agalsidasa alfa.
- 30
7. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el principio activo es un factor de coagulación para tratar hemofilia.
8. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el factor de coagulación es factor VII, factor VIII o factor IX.
- 35
9. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el principio activo es un autoantígeno peptídico o proteico.
- 40
10. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el principio activo es contra artritis reumatoide (AR), Esclerosis múltiple (EM), diabetes juvenil, uveítis, y enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, o miastenia grave adquirida.
- 45
11. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el principio activo es proteína básica de mielina contra esclerosis múltiple (EM), antígeno de células beta, pro-insulina, factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF2) o mezclas de los mismos contra diabetes juvenil, antígeno retiniano S contra uveítis, o receptor de acetilcolina contra miastenia grave adquirida.
- 50
12. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el principio activo es un antígeno peptídico o proteico de trasplante, y la composición de glóbulos rojos que contienen dicho antígeno es contra rechazo de injerto, preferentemente rechazo de injerto de riñón, corazón o hígado.
- 55
13. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido, polipéptido o proteína es uno que induce una reacción alérgica, y es preferentemente de origen alimentario.
14. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los glóbulos rojos (1) contienen el principio activo y (2) están en forma de un complejo inmunitario con una inmunoglobulina, preferentemente una IgG, que reconoce un epítipo en la superficie de los glóbulos rojos, para promover direccionamiento al hígado.

15. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que los glóbulos rojos forman un complejo inmunitario con un anticuerpo anti-rhesus o anti-glucoforina A o anti-CR1.

5 16. Composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los glóbulos rojos son tratados químicamente para dirigirlos al hígado.

17. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que los glóbulos rojos son tratados con BS3.

10

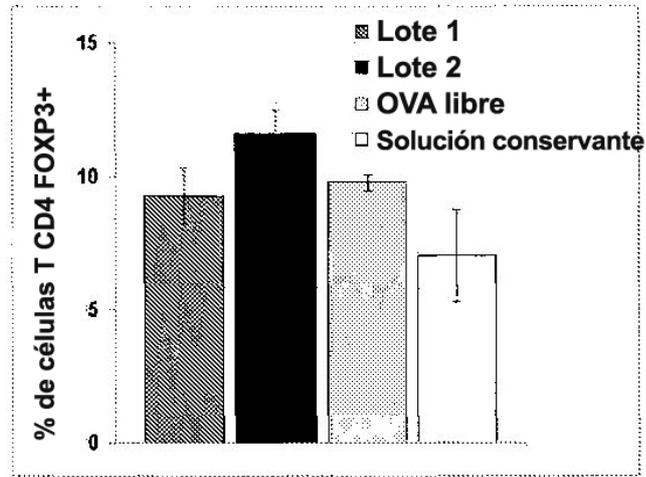


Figura 1

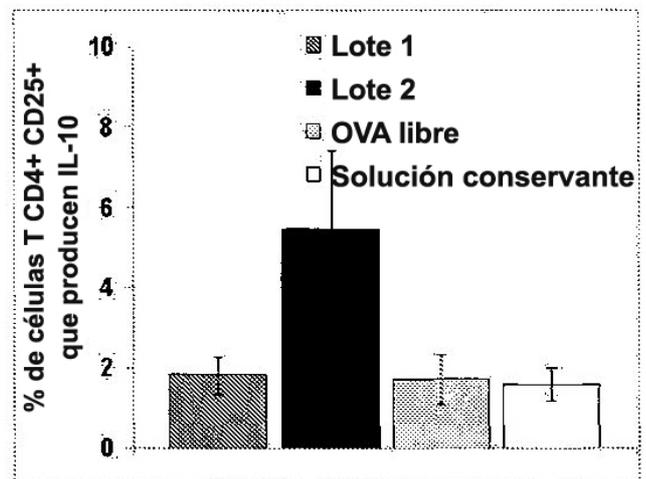


Figura 2

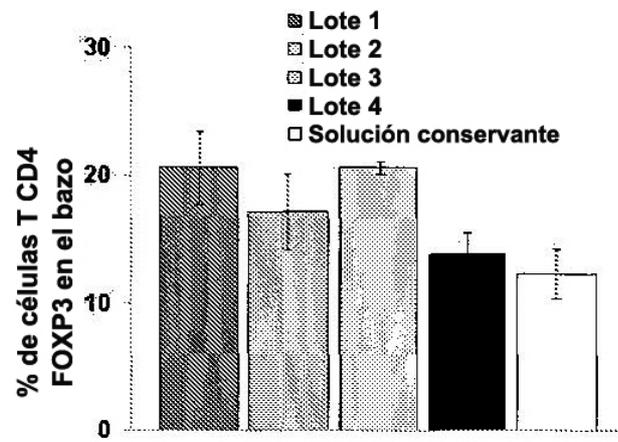


Figura 3

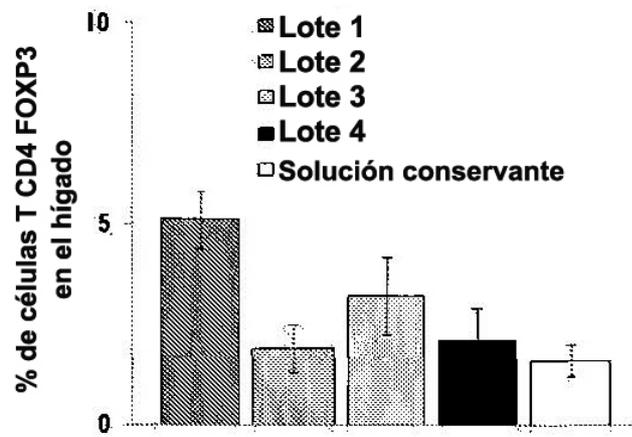


Figura 4

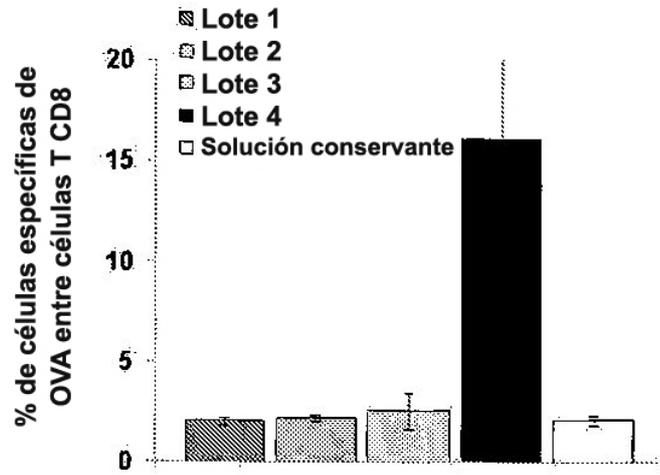


Figura 5